

Analyse der MACF1 Isoform-3 Funktionen, einem Spektraplakin Protein mit dualen Rollen im Zytoplasma und dem Nukleus

Inaugural-Dissertation

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



vorgelegt von
Verena-Maren Jaeger
aus Flensburg

Köln 2009

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2006 bis Oktober 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. J. Brüning

Tag der mündlichen Prüfung: 06. Februar 2009

Im stillen Gedenken an
Hermann

Öffne der Veränderung deine Arme, aber verliere dabei deine Werte nicht aus den Augen...

Dalai Lama XIV.

Für meine Eltern

INHALT

INHALT	1
Abkürzungen	4
I EINLEITUNG	6
1. Das Zytoskelett.	6
2.1. Die Plakin Protein Domänenkomposition.....	7
2.2. Die Spektraplakin Protein Domänenkomposition.	9
2.3. Die Spektraplakin Funktionen in Invertebraten.....	12
3. Die Rolle von MACF1 in Vertebraten.....	13
3.1. Die Isoform Diversität des murinen und humanen <i>MACF1</i> Gens.	14
3.2. Grundlegende zelluläre Funktionen von MACF1 beeinflussen die murine Embryonalentwicklung.	16
4. Die Integration des Zellkerns in das Zytoskelett.....	18
5. Ziel der Arbeit	21
II MATERIAL und METHODEN	22
1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	22
1.1. Kits.....	22
1.2. DNA-Konstrukte	22
1.3. DNA-Oligonukleotide (Sigma).....	24
1.4. RNA Isolation und RT-PCR Analyse.....	25
1.5. Zellkultur und transiente Transfektion von Säugerzellen durch Elektroporation.....	26
1.6. Fixieren und permeabilisieren von Säugetierzellen	26
1.7. Antikörper und Immunfluoreszenz Mikroskopie	26
1.8. Proteinlysate aus Geweben und Präparation von Gefrierschnitten	28
1.9. Proteinbindungsanalysen von Fusionsprotein mit COS7 Zelllysaten	28
1.10. Immunpräzipitation.....	29
1.11. Silberfärbung.....	29
1.12. Chromatin Immunpräzipitation (ChIP)	30
1.13. Hefe-Zwei-Hybrid System.....	30
1.14. Statistische Auswertung	30
III ERGEBNISSE	31
1. <i>In silico</i> Analyse des N-Terminus von MACF1 Isoform-3.	31
1.1. Datenbankanalyse zur Identifizierung von putativen posttranslationalen Modifikationsstellen und funktionellen Sequenzmotiven des MACF1 Isoform-3 N-Terminus.	31

1.2.	Der N-Terminus von MACF1 Isoform-3 ist hochkonserviert in Säugetieren.	33
2.	Charakterisierung polyklonaler Antiseren gegen das MACF1 Protein.....	34
2.1.	Herstellung der polyklonalen Antikörper MACF1 iso-3 pAb und MACF1 Rod pAb.	34
2.2.	MACF1 iso-3 pAb ist ein spezifischer Antikörper.	35
3.	Verteilung des MACF1 Isoform-3 Proteins in Geweben und Zelllinien.	37
3.2.	Die MACF1 Isoform-3 Lokalisation in Mausgeweben und Zelllinien.	38
3.3.	Das MACF1 Isoform-3 Protein kolokalisiert mit Mikrotubuli- und nicht mit Aktinfilamenten in Glioma C6 und COS7 Zellen.	45
4.	Domänenanalyse und Charakterisierung der MACF-1 Isoform-3 spezifischen Sequenzen.	48
4.1.	Generierung von MACF1 Isoform-3 N-terminalen Fusionsmutanten.....	48
4.2.	Charakterisierung der MACF1 Isoform-3 Fusionsproteine in Transfektionstudien.	49
4.3.	Punktmutationsstudien deuten eine Myristylierung des MACF1 Isoform-3 Proteins an...	50
4.4.	COS7 Zellen, die transient die MACF1 Isoform-3 GFP Fusionsproteine exprimieren, weisen keine Kontaktinhibition auf.	51
4.5.	Die G2A MACF1 iso3 GFP Fusionsmutante induziert das Auftreten von vielkernigen Zellen.	52
4.6.	Das MACF1 Isoform-3 Protein und die Rho-GTPase RhoA interagieren <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	53
5.	Die MACF1 Isoform-3 Lokalisation an der äußeren Kernhülle wird durch Nesprin-3 vermittelt.	56
5.1.	Lokalisationsstudien des MACF1 Isoform-3 Proteins an der äußeren Kernmembran.	56
5.2.	Die Lamin B Δ^{2+} Mutante beeinflusst die Lokalisation von MACF1 Isoform-3 in Glioma C6 Zellen.	57
5.3.	KASH Proteine beeinflussen die Lokalisation von MACF1 Isoform-3 an der Kernhülle. .	59
5.4.	MACF1 Isoform-3 interagiert mit Nesprin-3.	65
5.5.	Die N-Termini von Nesprin-3 und MACF1 Isoform-3 interagieren <i>in vitro</i>	66
5.6.	Die transiente Expression von Nesprin-3 rekrutiert MACF1 Isoform-3 an die Kernhülle in COS7 Zellen.	68
5.7.	Die Mikrotubuli Verteilung an der äußeren Kernhülle in Nesprin-3-positiven COS7 Zellen.	68
5.8.	Nesprin-3 interagiert mit MACF1 Isoform-3 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	71
6.	MACF1 Isoform-3 lokalisiert im Zellkern und assoziiert mit Kernproteinen.	74
6.1.	Die Verteilung des MACF1 Isoform-3 Proteins während des Zellzyklus.	74
6.2.	MACF1 Isoform-3 interagiert mit Chromatin.	76
7.	Das MACF1 Isoform-3 Protein weist verschiedene subzelluläre Verteilung auf.	76

7.1.	Durch Serumentzug transloziert MACF1 Isoform-3 aus dem Kern und kolokalisiert mit Mitochondrien.	77
7.2.	Das DISC1 (<i>Disrupted in Schizophrenia 1</i>) Protein interagiert mit MACF1 Isoform-3.	78
7.3.	Eine erhöhte Calcium-Ionen Konzentration verändert die Lokalisation von MACF1 Isoform-3 in HaCaT Zellen.	82
7.4.	Wachstumsfaktoren beeinflussen die Lokalisation von MACF1 Isoform-3.....	83
IV	DISKUSSION	87
1.	Der N-Terminus von MACF1 Isoform-3 bindet nicht an F-Aktin und scheint durch eine N-Myristilierung an der Plasmamembran verankert zu werden.	87
2.	MACF1 Isoform-3 weist eine nukleäre Lokalisation auf.	88
3.	MACF1 Isoform-3 wird durch externe Stimuli in seiner zellulären Funktion reguliert.....	90
4.	Interaktionen mit Nesprin-3 und Mikrotubuli beeinflussen die Lokalisierung von MACF1 Isoform-3 an der Außenseite der Kernhülle.....	92
5.	Mögliche Beteiligung der MACF1 Isoform-3 an genetischen Erkrankungen.....	95
6.	Ein Modell der MACF1 Isoform-3 Funktionen.	97
	ZUSAMMENFASSUNG.....	98
	ABSTRACT	99
	LITERATUR	100
	Erklärung	111
	Curriculum Vitae	112
	Danksagung.....	113

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABD	Aktin-Bindungs-Domäne
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	zirka
cDNA	komplementäre DNA (durch reverse Transkription von mRNA)
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
°C	Grad Celsius
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
<i>D. discoideum</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
d. h.	das heißt
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
DNase	Desoxyribonuklease
<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
g	Gramm, Erdbeschleunigung
G	Guanin
GFP	grün fluoreszierendes Protein (engl.: „green fluorescent protein“)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
IgG	Immunglobulin
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
Luminol	5-Amino-2,3-Dihydro-1,4-Phthalazindion
M	Molar
mA	Milliampere
mAk	monoklonaler Antikörper
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar

mRNA	Boten-RNA
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung
PFA	Paraformaldehyd
PIPES	1,4-Piperazindiethansulfonsäure
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pAb	polyklonaler Antikörper
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur, reverse Transkriptase
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
siRNA	kleine interferierende RNA (engl.: „small interfering RNA“)
Std	Stunde(n)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMD	Transmembran-Domäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
X-gal	5-Brom-4-chlor-3-indazol-β-D-galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel

I EINLEITUNG

1. Das Zytoskelett.

Das Zytoskelett der höheren Eukaryoten besteht aus drei Hauptelementen: Aktin-, Mikrotubuli- und Intermediärfilamenten. Deren Struktur und Aufbau wird von einer großen Anzahl von Zytoskelett-assoziierten Proteinen reguliert. Diese Proteine konfigurieren und verknüpfen einzelne Filamente durch Bündelung und Quervernetzung in einem Netzwerk untereinander und vermitteln die Verknüpfung an Membranen, Vesikel und Zell-Zell-Kontakte (Ruhrberg und Watt; 1997; Fuchs und Cleveland, 1998; Leung *et al.*, 2001; Leung *et al.*, 2002). Des Weiteren organisieren diese Proteine den Transport von Organellen und Vesikeln entlang der Filamente. Dabei weist jeder Filamenttyp ein Set an akzessorischen Proteinen auf (Drabek, 2005). Obwohl die drei Filamentsysteme unabhängig voneinander arbeiten können, wird eine kooperative Kommunikation zwischen ihnen benötigt, um eine koordinierte Zellaktivität bereitzustellen. Nur für die Mitglieder der Plakin und Spektrplakin Proteinfamilie ist zurzeit bekannt, dass sie mit mehr als einem Filamenttyp assoziieren (zur Übersicht Röper *et al.*, 2002; Jefferson *et al.*, 2004; Sonnenberg und Liem, 2007).

2. Die Plakin und Spektrplakin Proteinfamilie in Vertebraten.

Die Plakin und Spektrplakin Proteine sind große multifunktionale Zytoskelettproteine und können alle drei Zytoskelett-Filamente koordinieren. Wie der Name andeutet, sind Spektrplakine mit zwei eigenständigen Proteinteilstrukturen ausgestattet: der Spektrin und der Plakin Domäne, die charakteristisch für die Mitglieder der Spektrin und Plakin Familie sind (Röper *et al.*, 2002; Sonnenberg und Liem, 2007). Die bekanntesten Vertreter der Plakine sind Bullous Pemphigoid Antigen-1 (Bpag1/BP180/BP230), Plectin, Desmoplakin, Envoplakin, Periplakin und Epiplakin (zur Übersicht Ruhrberg und Watt, 1997; Jefferson *et al.*, 2004; Leung *et al.*, 2002). Entdeckt wurden sie als Bestandteile von Desmosomen und Hemidesmosomen, in denen sie Intermediärfilamente an Adhäsionsrezeptoren verknüpfen.

Mitglieder der Spektrinfamilie in Vertebraten sind α -Actinin, Dystrophin, Utrophin, Spektrplakine, Spektrine und die Nesprine (Rosenberg-Hasson *et al.*, 1996; Zhen *et al.*, 2002; zur Übersicht Starr 2007, Star und Fisher, 2005). Diese Proteine binden und verknüpfen Aktinfilamente und verbinden sie mit Membranrezeptoren. Spektrplakine umfassen die beiden Säugetierparaloge Bpag1 (Dystonin/MACF2) und MACF1 (ACF7), Shot Stop (Shot) aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und VAB-10B aus dem Nematoden *Caenorhabditis elegans*.

2.1. Die Plakin Protein Domänenkomposition.

Säugetiere sowie Invertebraten Plakine und Spektraplakine weisen eine charakteristische Domänenkomposition auf, die in Abbildung 1 schematisch dargestellt ist. Im Folgenden werden die Vertebraten Plakine und ihre Domänenkomposition näher beschrieben.

Das Merkmal der Plakine, auch epithelale Plakine genannt (in der Abb. 1, Stern), ist die Bindung an Intermediärfilamente (IF) mit ihrem Carboxyl (C)-Terminus. Dadurch fungieren sie als Adaptormoleküle, die das Zytoskelett-Filamentsystem mit Integrinen und Cadherinen der epithelialen Zell-Zell-Kontakte verknüpfen.

Die Verwendung verschiedener Promotoren, alternatives Spleißen der Transkripte und verschiedene Transkriptionsstartpunkte resultieren in einer enormen Vielfalt an Isoformen (zur Übersicht Jefferson *et al.*, 2004). Die große Anzahl an Isoformen führte in den letzten Jahren zu Irritationen in der Nomenklatur der Plakine und im Verständnis der gewebespezifischen Funktionen und subzellulären Lokalisationen dieser Proteine. So wurden für Plectin bisher 11 Isoformen beschrieben, die unterschiedliche Amino (N)-Termini aufweisen. Diese N-terminale Sequenz beeinflusst die subzelluläre Verteilung und die einzelnen Isoformen werden in Geweben unterschiedlich exprimiert (Reznicek *et al.*, 2003). Die Bpag1 Proteine weisen sehr unterschiedliche Isoformen auf, die deshalb in zwei Klassen unterteilt werden: Die epithelialen Bpag1e (BP230 und BP180) und neuronalen Bpag1n Isoformen (Abb. 1.), die in ihrem strukturellen Aufbau den Plakinen gleichen, die neuronalen Bpag1a (Dystonin-a) und die muskelspezifischen Bpag1b (Dystonin-b) Isoformen, die zu den Spektraplakinen eingegliedert werden. Zudem werden weitere Isoformen der jeweiligen Klassen beschrieben, die unterschiedliche N-Termini aufweisen (Brown *et al.*, 1995, zur Übersicht Jefferson *et al.*, 2004; Young *et al.*, 2006). Beispielsweise wird für die dritte neuronale Plakin Isoform gezeigt, dass Bpag1n3 nicht an F-Aktin bindet (Yang *et al.*, 1996, Young *et al.*, 2003). Dafür wird eine kryptische Mikrotubuli-bindende Domäne in der Plakin Domäne (M1) aktiv, wodurch Bpag1n3 an Mikrotubuli, jedoch nicht an Aktin binden kann (Yang *et al.*, 1999).

Bpage1e, Bpag1n, Desmoplakin und Plectin zeigen eine dreigeteilte Domänenstruktur: einen globulären N-Terminus (Plakin-Box Domäne), eine zentrale Coiled-coil und einen C-Terminus, der aus zahlreichen Wiederholungen (*Plakin Repeat Domain*, PRD) aufgebaut ist. Epiplakin zeichnet sich durch eine ungewöhnliche Domänenkomposition aus; es ist nur aus PR Domänen zusammen gesetzt. Diese charakteristische PRD befindet sich am C-Terminus der epithelialen Plakine. Eine PRD ist aus 4.5 Kopien einer 38 Aminosäuresequenz aufgebaut, wodurch eine globuläre Struktur erzielt wird, die eine ungewöhnliche Faltung ausbildet (Choi *et al.*, 2002). Basierend auf der Übereinstimmung der Aminosäuresequenz werden PRDs in drei Klassen, nämlich A, B und C unterteilt. Sie können durch Verknüpfungsdomänen (sogenannte Linker) verbunden sein, die ebenfalls Plakin-ähnliche Wiederholungsdomänen aufweisen (zur Übersicht Leung *et al.*, 2002). Diese Domäne vermittelt die Interaktion an Intermediärfilamente (IF). Dabei steht die Bindungsaffinität an IFs in direktem Bezug zu der An-

zahl an Plakin-Wiederholungen (Ruhrberg und Watt, 1997; zur Übersicht Stappenbeck *et al.*, 1993; Kouklis *et al.*, 1994; Meng *et al.*, 1997; Nikolic *et al.*, 1996).

Bis auf Epiplakin besitzen die Plakine eine N-terminale Plakin-Box Domäne (Abb. 1. lilafarbene Box) Diese besteht aus einer α -helikalen Spektrinwiederholungssequenz (SR Sequenz) und einer putativen SH3 Domäne, die eine Rolle in der Vermittlung von Protein-Protein Interaktionen spielt (Leung *et al.*, 2002; Rezniczek *et al.*, 2004; Jefferson *et al.*, 2004). So ist diese N-terminale Domäne für die Lokalisation der Plakine an der Plasmamembran und die Bindung an Komponenten der Desmosomen und Hemidesmosomen verantwortlich (Reznick *et al.*, 1998; Koster *et al.*, 2003).

Im Anschluss daran liegt eine Coiled-Coil Domäne vor, welche aus sieben Wiederholungssequenzen aufgebaut ist (Abb.1. beigefarbene Box). Jede dieser sieben Sequenzen ist aus einer charakteristischen 38 Aminosäuresequenz zusammengesetzt (Green *et al.*, 1990). Diese Domäne ist für die Ausbildung von Homodimeren (z. B. Plectin) bzw. Heterodimeren (Envoplakin mit Periplakin) von Bedeutung. (zur Übersicht Uitto *et al.*, 1996; Chan *et al.*, 1998).

Am Ende des C-Terminus weisen Plectin, Desmoplakin I und II eine Glyzin-Serin-Arginin-reiche Sequenz (GSR) auf. Über diese Struktur bindet Plectin an Mikrotubulifilamente. Weiterhin scheint diese Domäne modulierend auf die Bindung der Intermediärfilamente an ihre PRDs zu wirken: wird das Serin in der GSR Domäne phosphoryliert, so findet keine Interaktion mit IFs mehr statt (Stappenbeck *et al.*, 1993).

Plectin und Bpag1n weisen zusätzlich eine Aktin-bindende Domäne (ABD), aufgebaut aus zwei Calponin Homologie Domänen (CH) an ihren N-Termini, auf. Diese ~100 AS großen Domänen bestehen aus vier parallelen α -Helixen und drei weiteren kleinen Helixen, die über eine Schleife verbunden sind (Broderick und Winder, 2002). Obwohl die CH Domänen eine hohe strukturelle Übereinstimmung besitzen, zeigt die Tertiärstruktur Unterschiede. Aus diesem Grunde werden Calponin Homologie Domänen in die Subgruppen CH1 und CH2 unterteilt (Kronbaum und Rivero, 2002), denn die CH1 Subdomäne bindet F-Aktin mit niedrigerer Affinität als CH1 und CH2 zusammen. Die CH2 Domäne weist im Vergleich zur CH1 eine nochmals deutlich geringere Affinität zu F-Aktin auf (zur Übersicht Way *et al.*, 1992; Winder *et al.*, 1995). Darüberhinaus ist die ABD der Plakine durch die Fähigkeit Homo- und Heterodimere zu bilden gekennzeichnet. Diese Eigenschaft unterstützt die Verknüpfungsfunktion des Aktin-Netzwerkes (Fontao *et al.*, 2001; Young *et al.*, 2003). Zusätzlich vermittelt die ABD Domäne von Plectin die Bindung an β 4 Integrin (Geerts *et al.*, 1999; Litjens *et al.*, 2003).

Aufgrund ihrer Domänenkomposition sind die Plakine in der Lage, als Adaptermoleküle zwischen Zell-Zell-Kontakten und dem Zytoskelett zu fungieren. Epithel Bpag1e/BP230 und Plectin sind in Hemidesmosomen lokalisiert. Dort vermitteln sie die Verbindung von Epithelzellen an die darunterliegende Basalmembran. Desmoplakin, Periplakin und Envoplakin sind darüberhinaus Bestandteile der zytoplasmatischen Plaques von Desmosomen, die für die Zell-Adhäsion zwischen benachbarten Epithelzellen wichtig sind (zur Übersicht Green und Jones, 1996). Für das noch nicht so gut charakteri-

sierte Epiplakin wird vermutet, dass es die Bündelung von Keratin IFs induziert (Spazierer *et al.*, 2008; Walsh und Brown, 1998).

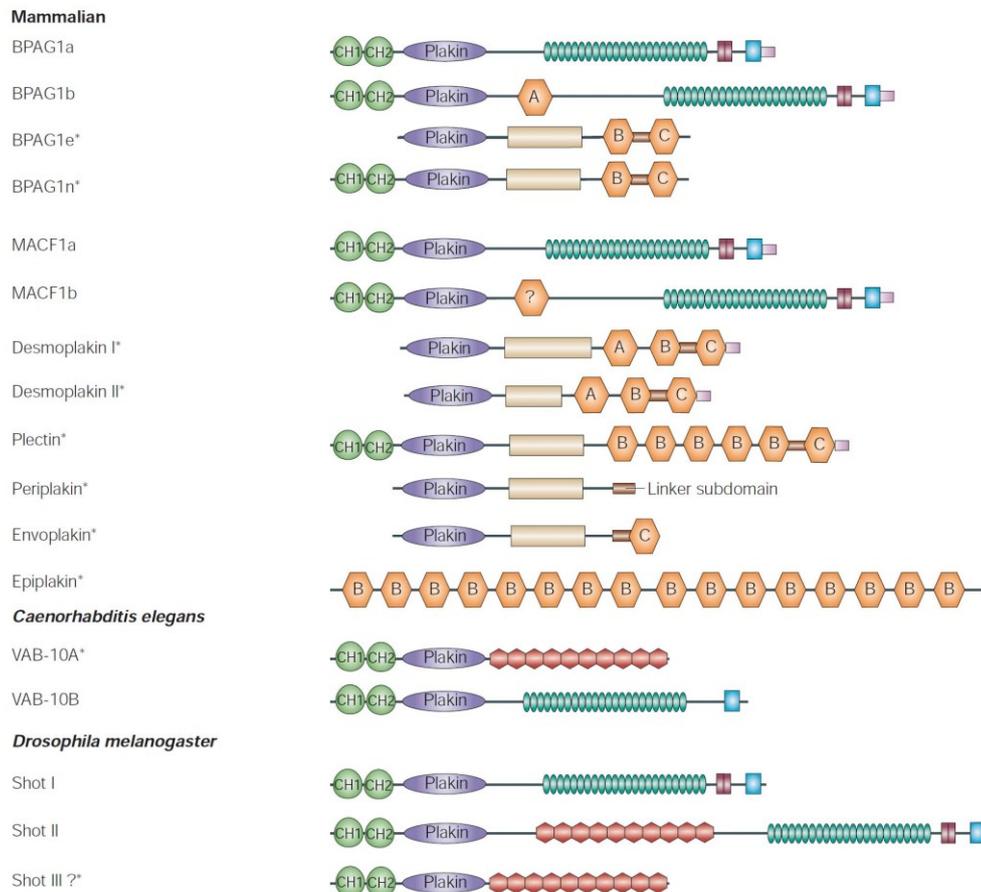


Abb.1: Die Säuger und Invertebraten Plakin Isoformen.

Die epithelen Plakine (Stern) weisen eine charakteristische dreigeteilte-Domänen Struktur auf. Diese setzt sich aus einer globulären Domäne am N-Terminus (lila), einer zentralen Coiled-Coil Domäne (beige), und einer unterschiedlich langen Plakin-Wiederholungsdomänen (PRD) am C-Terminus (orange) zusammen. PRDs unterteilen sich in die drei Subgruppen A, B und C, die durch Linker-Domänen voneinander separiert werden. Diese können Plakin-ähnliche Wiederholungsdomänen (PR) in sich tragen (braun). Die Domänenstruktur von Periplakin und Epiplakin weicht deutlich von den oben beschriebenen Proteinen ab. In Spektraplakinen (ohne Stern) wird die zentrale Rod-Domäne durch eine unterschiedliche Anzahl an Spektinwiederholungen ersetzt. Zur Übersicht sind die verschiedenen N-Terminale Isoformen von MACF1, Bpag1 und Plectin nicht dargestellt, sondern nur die jeweiligen alternativ gespleißten Hauptisoformen. Ob das Shot III Protein wirklich existiert, ist bisher noch nicht erwiesen, da seit seiner ersten Beschreibung es bisher nicht gelungen ist, dieses Ergebnis zu reproduzieren. Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu und wurde aus Jefferson *et al.*, 2004, entnommen.

2.2. Die Spektraplakin Protein Domänenkomposition.

Microtubule Actin Cross-linking Factor 1 (MACF1), auch bekannt als ACF7 (*Actin Cross-linking Family 7*), Trabeculin- α und Makrophin sowie das paraloge Bullous Pemphigoid Antigen 1 (Bpag1/Dystonin) repräsentieren die einzigen Spektraplakine in Vertebraten. Dystonin und MACF1 sind strukturell hoch konserviert und spielen vergleichbare Rollen bezüglich der zytoskelettalen Kreuzvernetzung in statischen aber auch dynamischen zellulären Prozessen (zur Übersicht Jefferson *et al.*, 2004; Röper *et al.*, 2003).

Im Folgenden werden die Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Spektraplakine und der Plakine aufgeführt. Dabei wird der strukturelle Aufbau der erstgenannten vom N-Terminus zum C-Terminus behandelt.

Die auffälligste Gemeinsamkeit der Plakine und Spektraplakine ist das Vorhandensein einer Plakin-Box Domäne (Abb. 1.) Des Weiteren kommen diese Proteine in vielen Isoformen vor und weisen durch alternative Transkriptionsstartpunkte verschiedene N-Termini auf (Fuchs und Karakesisoglou, 2001; Fuchs und Yang, 1999; zur Übersicht Klymkowsky, 1999; Lee *et al.*, 2000; Gong 2001; Lin *et al.*, 2005). Die Dystonin-a und -b Isoformen werden zudem gewebespezifisch exprimiert (Brown *et al.*, 1995b; Bernier *et al.*, 1995). So wird Dystonin-b1 und b2 in der Muskulatur (Brown *et al.*, 1995a; Leung *et al.*, 2001, Goriounov *et al.*, 2003) und die neuronalen Isoformen (Dystonin-a1 und a2) im Nervengewebe exprimiert (Brown *et al.*, 1995a; Bernier *et al.*, 1995; Leung *et al.*, 2001; Young *et al.*, 2006). 2003;) und die neuronalen Isoformen (Dystonin-a1 und a2) im Nervengewebe exprimiert (Brown *et al.*, 1995a; Bernier *et al.*, 1995; Leung *et al.*, 2001; Young *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu scheinen die MACF1 Isoformen mit unterschiedlichen Tendenzen ubiquitär exprimiert zu werden. Für MACF1 wurden bisher vier Isoformen (MACF1 1-3a und b) beschrieben, die näher unter 4.2. dargestellt werden.

Im Gegensatz zu den Plakinen (mit Ausnahme von Plectin) weisen die meisten Spektraplakin Isoformen an ihrem N-Terminus eine vollständige ABD Domäne auf. Diese ist, wie schon in 2.1. näher beschrieben, aus zwei Calponin Homologie Domänen aufgebaut (zur Übersicht Stradal *et al.*, 1998; Korenbaum und Rivero, 2002). Interessanterweise weisen die dritten Isoformen von Dystonin-a, -b und MACF1 nur eine CH2 Domäne auf. Die Funktionen dieser Isoformen sind bisher noch nicht bekannt, jedoch wurde für die Dystonin-a3 eine Myristylierung des N-Terminus postuliert (Leung *et al.*, 2001; Jefferson *et al.*, 2006).

Die größte Gemeinsamkeit der Spektraplakine und Plakine ist das Vorhandensein der bereits erwähnten Plakin-Box Sequenz (zur Übersicht Jefferson *et al.*, 2004) (Abb. 1.). Die MACF1 Isoformen weisen in dieser Domäne eine zusätzliche Mikrotubuli-bindende Domäne (M1) auf (Karakesisoglou *et al.*, 2000). Diese zeigt eine deutliche Homologie (63%) zu der M1 Domäne der Plakin Bpag1n3 Isoform auf (Yang *et al.*, 1999). Die M1 Domäne von MACF1 besitzt jedoch eine geringere Affinität zu Mikrotubulifilamenten als die von Bpag1n3 (Karakesisoglou *et al.*, 2000).

Im Unterschied zu den Plakinen weisen Spektraplakine eine große zentrale Rod Domäne auf, die einem variablen Anteil an Spektrinwiederholungssequenzen (26-29 SR Domänen) aufgebaut ist. Jede SR Domäne setzt sich aus einer 106 großen Aminosäuresequenz zusammen, die erstmals in dem Erythrozytenprotein Spektrin beschrieben wurde (Speicher *et al.*, 1984). Eine SR Sequenz wird aus drei α -Helixes aufgebaut, die ein charakteristisches Muster aus geladenen und hydrophoben Aminosäureresten aufweisen. Diese Helixes bilden zusammen eine anti-parallele Coiled-Coil Struktur aus (Rod Domäne) (Lovejoy *et al.*, 1993). Bisher wird angenommen, dass diese große Region in den

Spektraplakinen der Membran Elastizität verleiht und als Gerüst für Protein-Protein Interaktionen fungiert (Hartwig *et al.*, 1994; Gimona *et al.*, 2002; Leung *et al.*, 2002; Röper *et al.*, 2002; Jefferson *et al.*, 2004). Beispielsweise interagiert der Dynein/Dynactin Komplex mit der Rod Domäne von Dystonin-a. In den beteiligten SR Sequenzen befindet sich das ERM (*e_zrin/radixin/moesin domain* (Burrige und Mangeat, 1984; Lankes und Furthmayr, 1991) Motiv, das für diese Interaktion verantwortlich ist (Liu *et al.*, 2003; Jefferson *et al.*, 2004).

Spektraplakine weisen einen charakteristischen C-Terminus auf, der nicht mit denen der Plakine vergleichbar ist. Dieser setzt sich aus drei Domänen zusammen: zwei EF Hand Domänen (Burgoyne *et al.*, 2004; Ikura, 1996, Sun *et al.*, 1999), einer Gas2/GAR (*Growth arrest specific 2*) Domäne (Scheider *et al.*, 1988) und der Glyzin-Serin-Arginin-reichen Sequenz (GSR). Über die genauen Funktionen der EF Hand Domänen Domäne in Spektraplakinen ist noch nicht viel bekannt. Erste Hinweise kommen von Analysen des MACF1 Proteins, dass durch Calcium-Ionen seine subzelluläre Verteilung verändert und dadurch an Zell-Zell-Kontakten in murinen primären Keratinozyten lokalisiert (Karakeskioglou *et al.*, 2000). Hinsichtlich Shot, dem *Drosophila* Homolog von MACF1, wurde gezeigt, dass die beiden EF Hand Domänen eine wichtige Funktion für das Auswachsen von motorischen und sensorischen Axonen hat (Lee und Kolodziej *et al.*, 2002). Am Anschluss an die EF Hand Domänen liegt eine Mikrotubuli-bindende Domäne, die auch als Gas2/GAR Domäne bezeichnet wird (Sun *et al.*, 2001; Lee und Kolodziej 2002; Gorionuv *et al.*, 2003). Die MACF1 und Dystonin Proteine weisen wie die Plakine eine weitere Mikrotubuli-bindende und -stabilisierende Domäne stromabwärts von der GAR Domäne auf. Diese GSR Sequenz arbeitet mit der GAR Domäne zusammen, um so die Mikrotubuli-Bündelung zu induzieren (Sun *et al.*, 2001). C-terminal schließt sich ein EB1 Bindemotiv an. Dadurch werden die Spektraplakine mit den Plus-Enden von Mikrotubuli verknüpft (Slep *et al.*, 2005, Wu *et al.*, 2008). EB1 ist ein gut charakterisiertes und hoch-konserviertes Plus-Enden Mikrotubuli Bindeprotein. Es ist notwendig für biologische Prozesse wie dem Aufbau der mitotischen Spindel (Rogers *et al.*, 2002; Lansbergen und Akhmanova, 2006).

Interessanterweise verfügen die großen Isoformen der Spektraplakine ebenfalls über PRDs. Jedoch sind diese nicht am C-Terminus sondern nach der Plakin Domäne lokalisiert und in einer kleinen Anzahl vorhanden (Baines *et al.*, 2003). Daraus begründet sich auch die Nomenklatur der MACF1 und Dystonin Isoformen: die Anwesenheit der PRDs in einer Isoform wird durch b, die Abwesenheit dieser Domänen durch ein a gekennzeichnet (Abb. 1; zur Übersicht Jefferson *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2005). Innerhalb der Zelle lokalisiert die mMACF1b Isoform bevorzugt an dem Golgi Apparat (Lin *et al.*, 2005). MACF1b wurde aus cDNA von murinen Lungengewebe gewonnen und ist mit 23.4 kb (809 kDa) die größte bisher beschriebene Vertebraten Isoform (Lin *et al.*, 2005). Ob die PRDs der Dystonin-b oder MACF1b Isoformen die Interaktion an Intermediärfilamente vermitteln können, ist bislang nicht bekannt.

2.3. Die Spektraplakin Funktionen in Invertebraten.

Es gibt einige Parallelen zwischen den Zellkontaktstrukturen in Säugetieren und Invertebraten. Beide sind an den Kontaktstellen durch ähnliche Grundkomponenten aufgebaut und verknüpft. Bisher sind zwei Spektraplakin und Plakin Homologe in *Drosophila melanogaster* (*Drosophila*) und *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (Abb. 1.) entdeckt worden: Shot in *Drosophila* und VAB 10B in *C. elegans*. Shot (alias Kakapo, Kopupu, Groovin) wurde in verschiedenen genetischen Screens entdeckt (zur Übersicht Röper *et al.*, 2002) deren Ziel es war Gene zu identifizieren, die in der Integrin-vermittelten Adhäsion und dem Nervenwachstum eine Rolle spielen (Brown und Kafatos, 1988; Prout *et al.*, 1997; Gregory und Brown, 1998). Es ist das einzige *Drosophila*-Spektraplakin und vereinigt daher stabilisierende, aber auch dynamische Funktionen. So ist Shot essenziell für den Strukturhalt epidermaler Muskelansatzzellen und für das Wachstum von Nervenzellen (Prokop *et al.*, 1998, Lee *et al.*, 2000). Durch einen RhoA-abhängigen Mechanismus ist Shot für den Auf- und Abbau der Zell-Zell-Kontakte wichtig (Stumpf *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2002) und fungiert in der Signaltransduktionskaskade der Rho-GTPasen *Downstream* von RhoA (Lee und Kolodziej, 2002a). *Drosophila* weist keine zytoplasmatischen Intermediärfilamente auf (Übersichtsartikel von Tepass, 1997; Müller, 2000). Mikrotubuli vermitteln anstelle von Intermediärfilamenten die mechanische Stabilität epidermaler Zellen, welche von den Shot Isoformen verankert werden können (Prokop *et al.*, 1998; Gregory und Brown, 1998) (Abb. 2. Zelle (1) und Zelle (2)). Weitere Funktionen von Shot sind die Kompartimentierung des Zellkortex (Abb. 2. (3)), Beteiligung an der Fusion trachealer Zellen während der Embryonalentwicklung und Assemblierung von Adhärenzverbindungen in der Epidermis. Ebenfalls wird für Shot eine Funktion im Transport von Entwicklungsdeterminanten während der Oogenese und eine Beteiligung an Aspekten der Neuregulin- und Notch-Signalwege postuliert (zur Übersicht Röper *et al.*, 2002) (Abb. 2. (3)).

VAB-10 aus *C. elegans* ist das bislang am Wenigsten untersuchte Plakin/Spektraplakin. Es weist eine kurze (VAB-10A) und eine lange (VAB-10B) Isoform auf (Abb. 1.). VAB-10A ist homolog zu dem Plakin Plectin und seinen Funktionen, wohingegen VAB-10B funktionelle Homologie zu den Spektraplakin Dystonin und MACF1 aufweist (Bosher *et al.*, 2003). Diese beiden Isoformen sind für die Integrität der epidermalen Muskelkontaktstellen wichtig und weisen eine räumlich deutlich getrennte Position in Epidermiszellen zueinander auf (Bosher *et al.*, 2003).

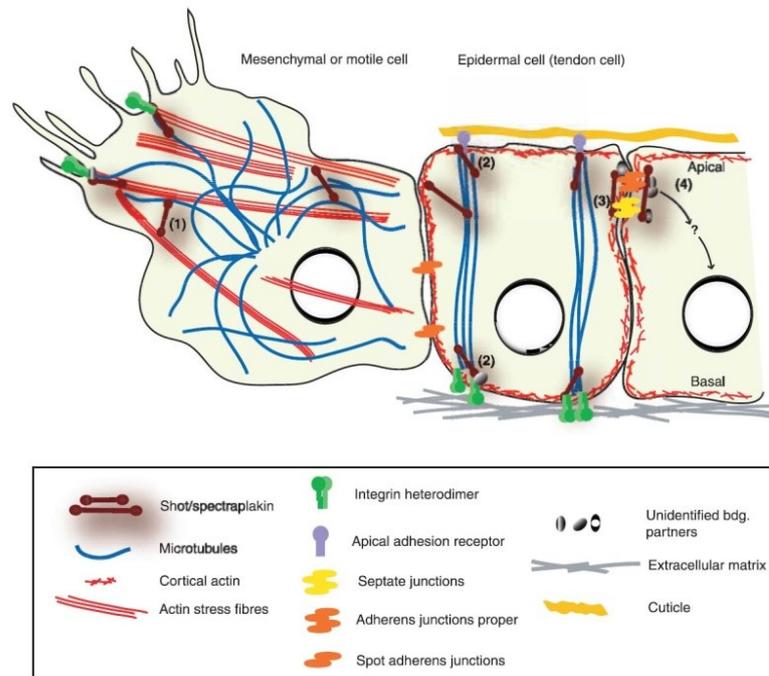


Abb.2.: Schematische Darstellung der zellulären Funktion von Shot in *Drosophila*.

Shot Proteine in *Drosophila* Zellen üben mindestens vier verschiedene Funktionen aus: (1) Quervernetzung der Zytoskelett-Filamente (2), Verknüpfung des Zytoskeletts mit Membranproteinen; (3) Organisation von Interaktionen zwischen dem kortikalem Zytoskelett und den Plasmamembranproteinen um spezifische Membransubdomänen zu formen. Weiterhin agieren sie als Gerüstproteine, die Signalproteine zu Bereichen hoher Zytoskelett-Aktivität rekrutieren (4). Die Abbildung wurde aus Röper *et al.*, 2002 entnommen.

3. Die Rolle von MACF1 in Vertebraten.

Erstmals beschrieben wurde MACF1 in der Studie von Byers *et al.*, 1995. Dort wurde MACF1 auf der Basis einer Sequenzhomologie zur Dystrophin Aktin-bindende Domäne identifiziert und kloniert (Leung *et al.*, 1999; zur Übersicht Röper *et al.*, 2002). Wie oben bereits näher beschrieben ist MACF1 in der Lage Aktin- und Mikrotubulifilamente innerhalb der Zelle miteinander zu verknüpfen. Innerhalb der Zelle übernehmen MACF1 Proteine wichtige Funktionen für die Zellpolarisierung, der Dynamik und Stabilität von Mikrotubuli und sind in die Aktinpolymerisierung und Bündelung involviert (Kodama *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2001; Karakesisoglou *et al.*, 2000; Leung *et al.*, 1999). Neben seiner Affinität zu EB1 interagiert MACF1 mit CLASP2, wodurch es die Möglichkeit hat, in die Migration der Zellen einzugreifen (Drabek *et al.*, 2006, Wu *et al.*, 2008). CLASP bildet zusammen mit CLIP-170, IQGAP, APC, und mDia die Gruppe der Mikrotubuli Plus-End wanderenden Proteinen (TIPs) (Cassimeris und Spittle, 2001). Diese Proteine stabilisieren und koordinieren die polarisierten Mikrotubuli bei der Zellbewegung. Des Weiteren weist MACF1 eine Aktin-abhängige ATPase Aktivität auf, die notwendig für die Regulation der Fokalkontakte ist. Diese liegt in der zentralen Rod Domäne vor und ist mit der des Myosins vergleichbar (Wu *et al.*, 2008). Es wird angenommen, dass MACF1 entlang von Aktin-Stressfasern Mikrotubuli und die gebundenen TIP Proteine zu den neu entstanden Fokalkontakten leitet, um so Mikrotubuli in die migrierende Front der Zelle einzuführen (Wu *et al.*, 2008).

Des Weiteren interagiert MACF1 mit seinem C-Terminus mit dem Trans-Golgi Protein p230. Es wird angenommen, dass durch diese Interaktion p230-positive Vesikel des Golgi Apparates entlang von Mikrotubuli an die Plasmembran transportiert werden (Kakinuma *et al.*, 2004).

Für MACF1 wird eine Funktion in der Verankerung der Acetylcholin Rezeptoren (AChR) der Motorneurone im Skelettmuskel postuliert. Dies wird durch eine direkte Interaktion der Aktin-bindenden Domäne von MACF1 an Rapsyn, dass die Aggregation von AchR im postsynaptischen Sarkolemma induziert, vermittelt. Durch die Rapsyn-MACF1 Interaktion wird angenommen, dass das Zytoskelett durch MACF1 an die Rezeptoren angeschlossen wird und so die Verankerung der Rezeptoren in der Membran induziert (Antolik *et al.*, 2007).

Darüber hinaus implizieren Studien, dass MACF1 eine Funktion in der Signaltransduktion der Zellen ausübt. Es wurde gezeigt, dass MACF1 in der Lage, ist direkt mit den Wnt-Signaltransduktions-Komponenten Axin und LRP5/6 zu interagieren. Durch die Assoziation von MACF1 mit Axin wird ein großer Komplex aus GSK3 β , APC und β -Catenin im Zytoplasma aufgebaut. Durch die Bindung des Liganden Wnt-3 an den Lrp5/6 Rezeptor transloziert MACF1 an den Rezeptor und verankert den gebundenen Komplex dort. Dadurch wird Axin abgebaut, die GSK3 β Kinase wird inhibiert und β -Catenin transloziert in den Zellkern (Chen *et al.*, 2006).

3.1. Die Isoform Diversität des murinen und humanen *MACF1* Gens.

Das murine (m) bzw. humane (h) *MACF1* Gen umfasst mehr als 100 Exons und kodiert für bisher vier beschriebene Isoformen, die in unterschiedlichen Genprodukten (620 (m,h), 670 (h) und 809 (m) kDa) resultieren. Die MACF1 Isoformen sind ähnlich aufgebaut und weisen eine 90%ige Homologie zueinander auf. Weiterhin werden sie mit Variationen bezüglich der Transkript- und Porteinmenge, ubiquitär exprimiert (Lin *et al.*, 2005, Gong *et al.*, 2001; Leung *et al.*, 2001; Bernier *et al.*, 1996, 1999; Sun *et al.*, 1999).

Das humane *MACF1* Gen liegt auf Chromosom 1p32 zwischen den Genen NDUFS5 (telomerisch) und BMP8/MYC1 (zentromerisch) und wird von 102 Exonen kodiert, die insgesamt eine Länge von 270 kb auf dem Chromosom einnehmen (Okuda *et al.*, 1999; Byers *et al.*, 2000). Das murine *MACF1* Gen ist auf Chromosom 4p55 lokalisiert (Bernier *et al.*, 1996). Die vier humanen und murinen Isoformen zeigen viele Gemeinsamkeiten auf. So sind sie strukturell und funktionell hoch-homolog zueinander und weisen eine fast identische Domänenkomposition auf. Die Unterschiede zwischen den Isoformen liegen in ihrem N-Terminus begründet. Jeder N-Terminus wird durch ein Exon kodiert. So beinhaltet das Exon 1 die spezifische Sequenz der Isoform-2a, das Exon 2 kodiert für die Isoform-1a, und Exon 7 stellt die Sequenz des N-Terminus der dritten Isoform zur Verfügung.

Die Aktin-bindende Domäne wird im murinen und humanen MACF1 durch die Exone 3-6 (CH1) und 8-10 (CH2) kodiert. Da ein interner Promoter vor Exon 7 lokalisiert ist, wird die Isoform-3a ohne eine

CH1 Domäne transkribiert und weist so eine unvollständige ABD Domäne auf (Abb. 3.) (Leung *et al.*, 2001; Gong *et al.*, 2001). Die Anzahl an SR Sequenzen variiert in den humanen und murinen MACF1 Proteinen. Während die humanen MACF1 Isoformen 1a, 2a und 3a 29 SR, die MACF1b 27 SR Domänen aufweisen, werden nur 23 SRs für die murinen Isoformen beschrieben (Sun *et al.*, 1999; Leung *et al.*, 2001; Gong *et al.*, 2001).

Den jedoch größten Unterschied zwischen den murinen und humanen MACF1 Isoformen zeigen die vierten Isoformen (m,h MACF1b): in diesen werden zusätzliche PRD Sequenzen vorgefunden (Gong *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2005). Darüber hinaus ist die humane Isoform (670 kDa) kleiner als ihr murines Homolog (809 kDa) (Gong *et al.*, 2001, Lin *et al.*, 2005). Diese PRD Sequenzen werden durch exklusive MACF1b Exone kodiert. Im murinen *MACF1* Gen wird diese Domäne von einem 6 kb großen Exon kodiert. Das daraus resultierende Produkt setzt sich aus zwei Typ A, einem C Typ, und zwei unvollständigen (einen B und einen A Typ) PRDs zusammen. Diese ist nach der N-terminalen ABD Domäne lokalisiert (Lin *et al.*, 2005). Die acht PRDs der humanen MACF1b Isoform werden durch das Exon 38 kodiert. Die PRDs sind fast identisch zu denen von Plectin und hoch-homolog zu denen im murinen MACF1b.

Bisher wurden nur die murine Isoform-2a, MACF1b sowie die humane Isoform-2a oder ihre spezifischen N-Termini und MACF1b vollständig sequenziert (Bernier *et al.*, 1996; Ling *et al.*, 2005; Okuda, *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 1999; Gong *et al.*, 2001; Bernier *et al.*, 1999). Jedoch wird angenommen, dass sich die humanen und murinen Isoformen nicht mehr in ihrem C-Terminus unterscheiden, da keine alternativen Spleißpunkte gefunden werden (Gong *et al.*, 2001). (Bernier *et al.*, 1996; Gong *et al.*, 1999 Gong *et al.*, 2001, Leung *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2005). An die Exone, die für die einzelnen SR Sequenzen kodieren, schließen sich die Exone an, die für die zwei EF Hand Domänen, eine Gas2 Homologie Domäne sowie eine Glyzin-Serin-Arginin-reiche Region kodieren (Gong *et al.*, 2001; Leung *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2005).

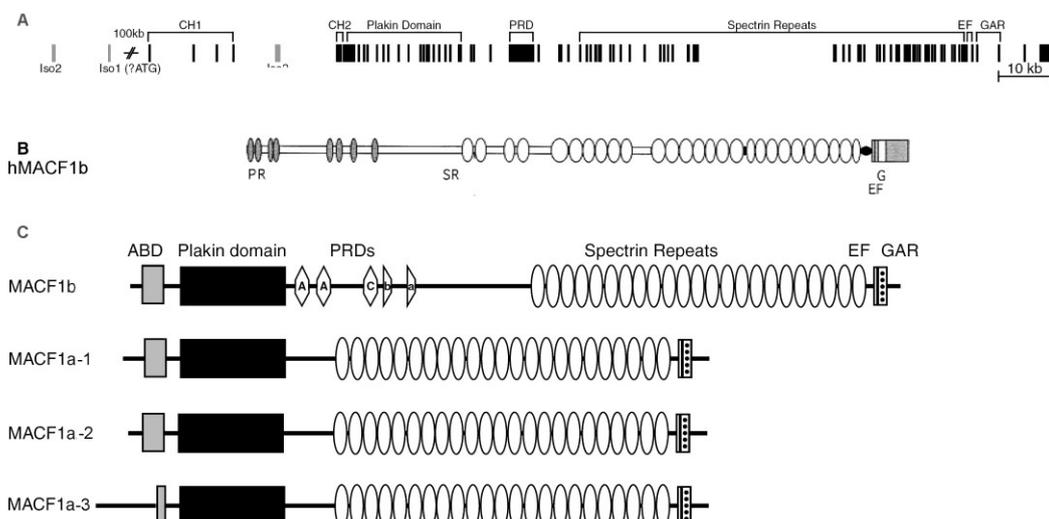


Abb.3: Schematische Darstellung der murinen MACF1 Isoformen.

A. Organisation des *MACF1* Gens. Die Exonstrukturen, die für die folgenden Domänen kodieren, sind dargestellt: CH Domäne, Plakin (Box) Domäne, Plakin Wiederholungsdomäne (PRD), Spektrinwiederholungen (SR), EF Hand Domänen (EF), und die Gas2-verwandte Domäne (GAR). Alternativ gespleißte erste Exone, die verantwortlich für die Generierung der Isoform-1 (iso1), Isoform-2 (iso2) und Isoform-3 (iso3) sind, werden in grau dargestellt. B. Hier ist schematisch die Domänenstruktur der humanen MACF1b Isoform gezeigt. Diese unterscheidet sich von der Murinen in ihrem N-Terminus durch die Anwesenheit von acht Plakin-ähnlichen Wiederholungen (PR) und der additionalen SR 3 Sequenz. Die Plakin-Box Domäne ist nicht dargestellt. Die runden Kreise stellen die SR Domänen dar. C. Die Domänenorganisation der murinen MACF1 Isoformen ist schematisch dargestellt. MACF1b beinhaltet zwei PRDs (A), eine C PRD (C), eine unvollständige B (b) und A (a). Die ABD (Grau) grenzt an die Plakin-Box Domäne (Schwarz) und schließt sich der Rod Domäne an, die aus SR Sequenzen (Kreis) aufgebaut ist. Am C-Terminus liegen die EF Hand Domänen (Graue Balken) und die Mikrotubuli-bindende Domäne (GAR). Die Abbildung wurde modifiziert und aus Lin *et al.*, 2005 und Gong *et al.*, 2001 entnommen.

3.2. Grundlegende zelluläre Funktionen von MACF1 beeinflussen die murine Embryonalentwicklung.

MACF1 wird im murinen neuronalen Gewebe, im Muskel und in der Lunge früh während der Embryonalentwicklung exprimiert (Tag 7.5). Später in der Entwicklung werden MACF1 Transkripte in allen Geweben detektiert (Bernier *et al.*, 2000). Dabei werden die verschiedenen Isoformen von MACF1 zeitlich gestaffelt exprimiert und zeigen eine unterschiedliche Verteilung innerhalb der Gewebearten auf (Bernier *et al.*, 2000): ab Tag 7.5 der Embryonalentwicklung wird MACF1 Isoform-1 ubiquitär exprimiert. MACF1 Isoform-2 wird im Gehirn, der Lunge, dem Spinalkortex und in geringeren Mengen in der Niere, dem Herzen, der Leber und dem Magen gefunden. Diese Isoform wird erst am Tag 10.5 der Embryonalentwicklung exprimiert. Die dritte Isoform weist ab dem 7.5ten Tag eine hohe Expression im Gehirn und in der Spinalkortex auf. Ebenfalls wird sie in der Haut, Lunge und Niere detektiert. MACF1 wird am Tag 8.5 in dem dermomyotomen Somitenkompartiment exprimiert. Aus den Zellen des Dermomyotoms entwickeln sich später Haut und Skelettmuskulatur (Bernier *et al.*, 1999).

Am Tag 10.5 wird MACF1 fast ausschließlich im myotomalen Kompartiment exprimiert. Mit fortschreitender Entwicklung der Maus kann MACF1 stark im zentralen Nervensystem nachgewiesen werden. Kurz vor der Geburt kommt es zu einem dramatischen Anstieg der MACF1 Expression in der Lunge, genauer in den Alveolar Zellen Typ II. In der erwachsenen Maus wird MACF1 dann ubiquitär im Gehirn exprimiert. So können Transkripte in Purkinje Zellen, der Substantia grisea, dem Cerebellum, dem Hippokampus und dem Zerebralkortex deutlich detektiert werden (Bernier *et al.*, 2000).

Deletion des *MACF1* Gens erzeugen definierte Phänotypen im Tiermodell und führen zur Letalität während der Embryonalentwicklung (Bernier *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2000; Kodama *et al.*, 2003; Jefferson *et al.*, 2004). Wird Exon 5 als Ziel für die Herstellung einer Kock-Out Maus gewählt, so sterben die Mäuse bereits am Tag 7.5 der Embryonalentwicklung (Kodama *et al.*, 2003). In dem Knock-Out Modell von Chen *et al.* wurde ein später folgendes Exon (Exon 25) gewählt. Diese Mäuse sterben am Tag 12.5 der Embryonalentwicklung (Chen *et al.*, 2006). Dabei wurde beobachtet, dass ihnen das Mesoderm fehlt (Chen *et al.*, 2006), einen Phänotyp, wie er für die Wnt-3 und Lrp5/6 Doppel-Knock-Out

Mäuseembryonen beschrieben wird. Davon ausgehend wurde in weiterführenden Studien entdeckt, dass MACF1 eine wichtige Funktion in der Wnt-Signaltransduktion ausübt (Chen *et al.*, 2006).

3.3. MACF1 und seine Involvierung in die humane Pathogenese.

Bisher liegen keine Studien vor, die MACF1 als direkte Ursache mit einer genetischen Krankheit in Verbindung bringen. Da der Knock-Out des MACF1 Proteins zur Letalität in Mäusen führt (Kodama *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2006), wird angenommen, dass dieses Protein eine wichtige Funktion auch im Menschen ausübt.

Durch die Verwendung der Mikroarray Technik und breit angelegter Hefe-Zwei-Hybrid Screens sind in letzter Zeit einige Publikationen veröffentlicht worden, die Anomalien des MACF1 Proteins oder ein verändertes Expressionsmuster in erkrankten Geweben zeigten (Kerr *et al.*, 2005; Camargo *et al.*, 2006; Bertram *et al.*, 2008). So verstärkt zum Beispiel das human pathogene Parvovirus B19 die MACF1 Proteinexpression in infizierten Patienten (Kerr *et al.*, 2005). Dieses Virus induziert, neben der akuten Infektion (Ringelröteln, rote Blutkörperchen Anämie), auch eine chronische Infektion. Diese äußert sich in den Krankheitsbildern der Arthritis, dem chronischem Müdigkeitssyndrom (CFS), Enzephalitis und Myokarditis. In einem Mikroarray Test sowie einer zusätzlicher *Real-Time* PCR wurde eine Hochregulation der MACF1 mRNA in diesen Studien belegt (Kerr *et al.*, 2005).

Für das humane Neuroblastom wurde gezeigt, dass eine Fusion der Chromosomen 1q mit 17q (unbalancierte Translokation) in der Mitte des Genlocus von *MACF1* stattfindet, wodurch dieser unterbrochen wird (Schleiermacher *et al.*, 2005). Diese Translokation tritt in 50-70% aller Neuroblastome auf, beeinträchtigt weitere Genloci und gilt als Auslöser für die Tumorgenese (Brown *et al.*, 1999; Lastowska *et al.*, 2001). Des Weiteren deuten Mikroarray Daten darauf hin, dass MACF1 in 12% aller Brust- und Dickdarmkrebsarten hochreguliert ist (Sjoblom *et al.*, 2006).

Interessant erscheint eine Hefe-Zwei-Hybrid Studie, in der MACF1 in Zusammenhang mit der Entstehung von Schizophrenie gebracht wird (Camargo *et al.*, 2006). In dieser Studie wurde MACF1 als Interaktionspartner für das *Disrupted-In-Schizophrenia-1* (DISC1) Protein gefunden. In der Studie wurde eine Interaktion von MACF1 mit dem DISC1 Protein gefunden. DISC1 ist ein viel diskutiertes Protein, welches als Kandidat für die Entstehung von Schizophrenie und bipolare (manisch-depressive) Erkrankung gehandelt wird (zur Übersicht Muir *et al.*, 2008). Durch eine balancierte Translokation wird das DISC1 Protein erst ab Exon 8 transkribiert, wodurch das Protein nicht mehr voll funktionsfähig ist (Millar *et al.*, 2000). Zytogenetische und zellbiologische Studien zeigen konsistent, dass der Verlust der DISC1 Funktion mit Schizophrenie, manisch-depressive Erkrankung und Depression assoziiert ist (St Clair *et al.*, 1990; Blackwood *et al.*, 2001). Das DISC1 Protein wird in vielen Isoformen im Gehirn exprimiert. Weiterhin können den einzelnen Isoformen unterschiedliche Funktionen innerhalb der Dendriten und Axone zugeordnet werden (James *et al.*, 2004). Durch den N-

Terminus assoziiert DISC1 mit Mitochondrien. Der C-Terminus ermöglicht die Bindung an die Zentrosomen (Ozeki *et al.*, 2003; Brandon *et al.*, 2004; Millar *et al.*, 2005).

4. Die Integration des Zellkerns in das Zytoskelett.

Der eukaryotische Zellkern ist der Ort der DNA- und RNA-Synthese sowie der RNA-Prozessierung. Während der Interphase des Zellzyklus ist er durch zwei Membranen räumlich von dem Zytoskelett der Zelle getrennt. Diese Kernhülle setzt sich aus der äußeren Kernmembran, den Kernporenkomplexen, der inneren Kernmembran und der Kernlamina zusammen. Die beiden Membranen umschließen den 30 bis 100 nm breiten perinukleären Raum (Gerace und Burke, 1988; Broers *et al.*, 2006). Obwohl die äußere und innere Kernmembran eine recht ähnliche Phospholipidmobilität und Lipidzusammensetzung zeigen (Schindler *et al.*, 1985), unterscheiden sie sich in Bezug auf ihre integralen Membranproteine und ihrer Funktion.

Die innere Kernmembran enthält eine Reihe von integralen Membranproteinen, die in der Lage sind sowohl mit der unterliegenden Lamina als auch mit dem im Zellkern vorhandenen Chromatin zu interagieren (zur Übersicht Stuurman *et al.*, 1998). Zu den mittlerweile detailliert analysierten integralen Membranproteinen gehören der Lamin B Rezeptor (LBR), Lamina-assoziierte Proteine 1 und 2, Emerin, MAN1, Nurim und Sun 1/2 (Holmer und Worman, 2001). Die Lamina bildet eine fibrilläre Schicht unterhalb der inneren Kernmembran und ist über die Interaktion mit integralen Membranproteinen mit dieser verbunden (Dwyer und Blobel, 1976). Lamine besitzen eine molekulare Masse von 60-80 kDa und gehören zur Familie der Typ V Intermediärfilamente (McKeon *et al.*, 1986; Krohne *et al.*, 1987) und werden in zwei Klassen eingeteilt, Typ A (Lamin A und C) und Typ B (Lamin B1 und B2).

Die äußere Membran steht in direkter Verbindung mit dem Endoplasmatischem Retikulum (ER), wodurch eine freie Diffusion von größeren Proteinen aus dem Lumen des ERs und in den perinukleären Raum ermöglicht wird (Gerace und Burke 1988, Broers *et al.*, 2006).

An der äußeren Kernmembran lokalisieren die integralen KASH Proteine (*Klarsicht/Anc/syne-1 homology*) (Starr, 2007; Starr und Fisher 2005). In Vertebraten sind bisher drei Vertreter beschrieben worden, die als Nesprin-1,-2 und -3 (*nuclear envelope Spectrin repeat proteins*) bezeichnet werden (zur Übersicht Tzur *et al.*, 2006; Warren *et al.*, 2005). Diese Proteine zeichnen sich durch die KASH Domäne an ihrem C-Terminus aus. Die Domäne beinhaltet eine Transmembrandomäne und eine evolutionär konservierte 9 bis 32 Aminosäuren lange Sequenz (zur Übersicht Schneider *et al.*, 2008; Starr und Fischer, 2005). Die KASH Domäne lokalisiert im perinukleären Raum und ist essentiell für die Verankerung der Nesprine an der äußeren Kernhülle (Starr und Fisher 2005; Padmakumar *et al.*, 2005; Ketama *et al.*, 2007). N-terminal unterscheiden sich die Nesprine in dem Vorhandensein einer ABD (Nesprin-1, -2) und dessen Fehlen (Nesprin-3). Nesprin-1 (1001,4 kDa) und -2 (796 kDa) weisen eine lange SR Rod Domäne auf (Padmakumar *et al.*, 2004; Zhen *et al.*, 2002). Im Vergleich zu den übrigen

Nesprinen ist das kürzlich entdeckte Nesprin-3 Protein (Wilhelmsens *et al.*, 2005) ein kleines 116 kDa Molekül, welches keine ABD Domäne besitzt. Die beiden, bisher beschriebenen Nesprin-3 Isoformen α und β , unterscheiden sich nur in der Anwesenheit (Nesprin-3 α) oder der Abwesenheit (Nesprin-3 β) der ersten SR Sequenz. Insgesamt acht SR Domänen und eine KASH Domäne am C-Terminus zeichnen dieses Protein aus (Wilhelmsen *et al.*, 2005).

Eine Eigenschaft aller Nesprine ist die Interaktion ihrer KASH Domäne mit der C-terminalen SUN (Sad1p und UNC-84 Homologie Domäne; Malone *et al.*, 1999) Domäne der Sun 1/2 Proteine im perinukleären Raum. Die Sun (Sun1 und Sun2) Proteine weisen drei Transmembrandomänen (Tm) auf, dabei liegt ihr N-Terminus im Nukleoplasma und der C-Terminus ragt in den perinukleären Raum (zur Übersicht Tzur *et al.*, 2006; Crisp *et al.*, 2006). Die Sun Proteine können mit Lamin A, Emerin und Heterochromatin über ihre luminale Domäne interagieren und bilden so einen Verankerungspunkt innerhalb des Kerns (Padmakumar *et al.*, 2004; Crisp *et al.*, 2006, Lu, 2007). Des Weiteren können die Nesprine an Lamin A/C und Emerin binden. Durch die Interaktion dieser Proteine (Lamina, Nesprine, Sun) werden das Nukleoskelett und die innere Kernmembran über den perinukleären Raum hinweg mit der äußeren Kernmembran und dem Zytoskelett verbunden. Dieser Komplex wird als LINC Komplex bezeichnet (Tzur *et al.*, 2006).

KASH Proteine bilden die Verknüpfungspunkte des Zellkerns mit dem Zytoskelett. Nesprin-1/-2 können an Aktinfilamente (Padmakumar *et al.*, 2005; Zhen *et al.*, 2002) binden. Weiterhin interagiert Nesprin-3 α mit der ABD Domäne von Plectin (Wilhelmsen *et al.*, 2005). Beide Proteine können dimerisieren und so einen Komplex an der äußeren Kernmembran bilden (Ketama *et al.*, 2007). Durch die Bindung von Plectin wird der Nukleus an das Intermediär-Filamentsystem und möglicherweise auch an Hemidesmosomen angebunden (Wilhelmsen *et al.*, 2005; Ketama *et al.*, 2007). Darüberhinaus kann Plectin mit Mikrotubuli assoziieren (Svitkina *et al.*, 1996). In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde gezeigt, dass Dystonin-a2 ebenfalls in der Lage ist an Nesprin-3 zu binden (Young *et al.*, 2008). Dieses Protein kann sowohl Mikrotubuli- als auch Aktinfilamente binden und stellt so einen weiteren Verknüpfungspunkt zwischen dem Nukleus und dem Zytoskelett dar (Young *et al.*, 2008).

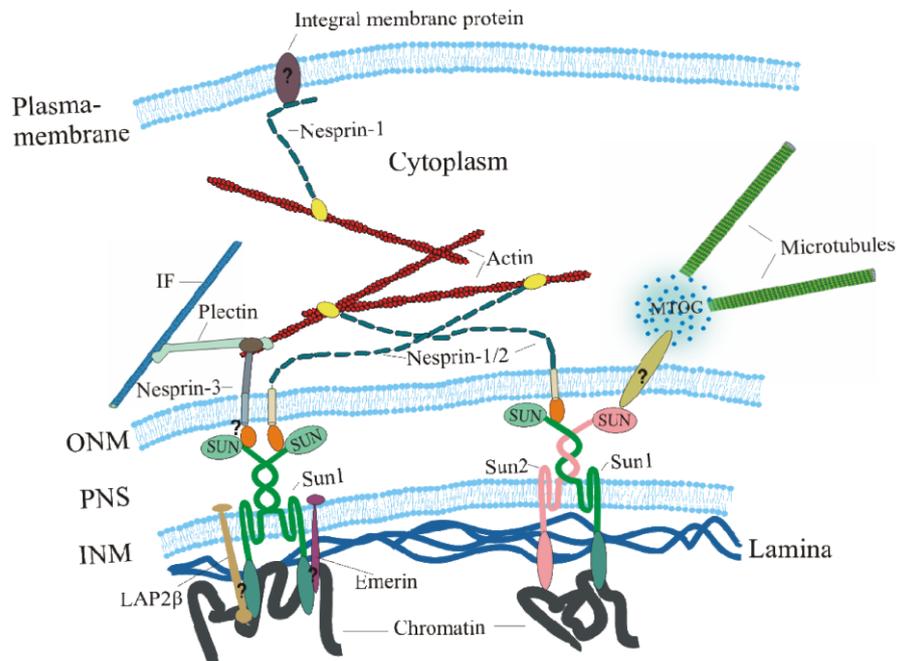


Abb. 3: Schematische Darstellung der Proteinzusammensetzung der Kernhülle in Vertebraten.

In der inneren Membran dimerisieren Sun1 und Sun2 Proteine mit- und untereinander. Diese können mit ihrem N-Terminus Emerin, Lap2 β und Chromatin binden und tragen so zu der Stabilität des Lamina-Netzwerkes bei (Lu *et al.*, 2008). Im perinukleären Raum interagiert der C-Terminus mit der KASH-Domäne der Nesprine und verankert sie so an der Kernmembran. Nesprin-3 kann mit Plectin interagieren und so Intermediärfilamente an den Nukleus translozieren. Nesprin-1/-2 können durch ihre ABD Domäne Aktin binden. In *Dictyostelium discoideum* (Xiong *et al.*, 2008) binden SUN Proteine an das Mikrotubuli organisierende Zentrum (MTOC). Fragezeichen deuten auf noch nicht bestätigte Interaktionen hin (entnommen aus der Dissertation von Lu, 2007).

5. Ziel der Arbeit

MACF1 (*Microtubule Actin cross-linking Factor 1*) ist ein Mitglied der Spektraplaklin Familie. Dieses Protein wurde vor über zehn Jahren entdeckt und über seine zellulären Funktionen ist nur wenig bekannt. Bisher sind vier Isoformen des Proteins beschrieben worden, die durch unterschiedliche Transkriptionsstartpunkte und alternatives Spleißen generiert werden. Die am wenigsten charakterisierte Isoform ist MACF1 Isoform-3. Sie zeichnet sich durch einen besonderen N-Terminus aus, der aus einer spezifischen 35 kDa großen N-terminalen Sequenz und einer CH2 Domäne gebildet wird.

Aufgrund der Tatsache, dass diese Isoform früh in der Embryonalentwicklung exprimiert wird und einen ungewöhnlichen N-Terminus aufweist, ist das Ziel dieser Arbeit das MACF1 Isoform-3 Protein zu charakterisieren.

Dafür soll zunächst der N-Terminus genauer untersucht werden. Zum Einen soll die 35 kDa N-terminale Aminosäuresequenz eingehender *in silico* auf neue funktionelle Proteindomänen und Motive untersucht werden, um so Hinweise auf neue Interaktionspartner zu erlangen. Zum Anderen soll die unvollständige Aktin-bindende Domäne (CH2) des MACF1 Isoform-3 Proteins auf ihre Funktionalität überprüft werden. In weiteren Experimenten sollen N-terminale Teilfragmente des MACF1 Isoform-3 Proteins in Zelllinien exprimiert werden und die subzelluläre Lokalisation der Fusionsproteine und ihr Einfluss auf das Zytoskelett untersucht werden.

Für die Charakterisierung des MACF1 Isoform-3 Proteins soll dessen Expression und Lokalisation in immunohistochemischen, zellbiologischen und biochemischen Studien analysiert werden.

II MATERIAL und METHODEN

1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien der Qualität pro analysis (p.a.) und Enzyme wurden von den Firmen Biozym, Fluka bzw. Sigma, Gibco, Invitrogen, Life Technologies, Merck, New England Biolabs, WR oder Roche bezogen. Falls von weiteren Firmen Chemikalien, Enzyme oder andere Verbrauchsmaterialien genutzt wurden, sind diese an entsprechender Stelle aufgeführt. Standardlaborgeräte, die im Institut für Biochemie I vorhanden sind, wurden verwendet. Verwendete Lösungen und molekularbiologische Techniken, die im Folgenden nicht angeführt sind, wurden nach Sambrook *et al.*, 2001 hergestellt.

1.1. Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten kommerziell erhältlichen Kits wurden nach Herstellerangaben verwendet.

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

1.2. DNA-Konstrukte

Folgende Konstrukte wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

MACF1 spezifische Konstrukte

(murine MACF1 Isoform-3 cDNA Sequenzen wurde mit diversen Markerproteinen fusioniert)

G2A MACF1 Iso-3 eGFP-N3	Sall/EcoRI	(AS 1-330)	(diese Arbeit)
MACF1 iso-3 eGFP-N3	EcoRI/KpnI	(AS 1-330)	(generiert von M.Munck)
MACF1 iso-3 eGFP-C2	EcoRI/KpNI	(AS 1-330)	(generiert von M.Munck)
MACF1 iso-3 CH2 eGFP-N3	KpnI/XmaI	(AS 1-449)	(generiert von M.Munck)
MACF1 iso-2 CT-eGFP-C2	EcoRI/Sall	(AS 4805-5129)	(generiert von M.Munck)
MACF1 iso-3 pGEX-T4	EcoRI/XmaI	(AS 1-330)	(generiert von M.Munck)
MACF1 iso-3 pBKT7	EcoRI/XmaI	(AS 1-330)	(generiert von M.Munck)
MACF1 iso-3 CH2 pGADT7	EcoRI/XhoI	(AS 1-449)	(diese Arbeit)
MACF1 iso-3 CH2 pGBKT7	EcoRI/XmaI	(AS 1-449)	(diese Arbeit)

Nesprin-3 spezifische Konstrukte

(Humane Nesprin-3 Fusionsproteine wurden mit diversen Markerproteinen N-terminal fusioniert.)

Die komplette cDNA von hNesprin-3 wurde aus den Klonen *Accessionr.* AKo98471 FLJ25605 JTH14272 und AK131436 FLJ16564 pUC19FL3 und cDNA aus humaner Skelettmuskulatur (45102 RNA) generiert.

Dafür wurde zunächst das SR1 320bp große Fragment durch PCR Amplifikation aus humaner Skelettmuskulatur generiert, mit EcoRI/SaLI Endonukleasen verdaut und anschließend in den eGFP-C2 Vektor ligiert (Nesprin-3 SR1 eGFP-C2). Anschließend wurde jeweils der Klon AK131436 und das Nesprin-3 SR1 eGFP-C2 Konstrukt mit AhdI und SacII (interne Schnittstellen in hNesprin-3) Restriktionsendonukleasen verdaut und zusammen ligiert. Dieses Konstrukt wird als Nesprin-3 ΔC eGFP-C2 bezeichnet. Anschließend wurde die fehlende C-terminale Sequenz des hNesprin-3 Gens aus Klon AK098471 amplifiziert und über (5' SacII und 3' XbaI) mit dem Nesprin-3ΔC (SacII und XbaI verdaut) C2-eGFP Vektor ligiert.

Nesprin-3 eGFP-C2	EcoRI/XbaI	(AS 1-975)	(generiert von M.Munck)
Nesprin-3 pCMV-Myc	KpnI/NotI	(AS 1-975)	(diese Arbeit)
Nesprin-3 pCMV-HA	KpnI/NotI	(AS 1-975)	(diese Arbeit)
Nesprin-3 SR1 pGEX-T4	EcoRI/SaII	(AS 1-105)	(generiert von M.Munck)
Nesprin-3 SR1 eGFP-C2	EcoRI/SaII	(AS 1-105)	(generiert von M.Munck)
Nesprin-3 SR1+SR2 pGEX-T4	BamHI/XhoI	(AS 1-229)	(generiert von M.Munck)
Nesprin-3 SR1+SR2+SR3pGEX-T4	BamHI/XhoI	(AS 1-325)	(generiert von M.Munck)
Nesprin-3 ΔC eGFP-C2	EcoRI/SacI	(AS 1-429)	(generiert von M.Munck)
Nesprin-3 ΔC pGBKT7	EcoRI/SaLI	(AS 1-429)	(diese Arbeit)
Nesprin-3 ΔC pGADT7	EcoRI/XhoI	(AS 1-429)	(diese Arbeit)
Nesprin-3 KASH pCMV Myc	KpnI/Not	(AS 913-975)	(diese Arbeit)
Nesprin-3 KASH pCMV HA	KpnI/NotI	(AS 913-975)	(diese Arbeit)

Plectin 1C spezifische Konstrukte

(Diese Konstrukte enthalten den Plectin 1C spezifischen N-Terminus (AS 1-339))

Plectin 1C eGFP N-3		(A.Määttä, University of Durham, U.K.)
Plectin 1C pGBKT7	EcoRI/XmaI	(diese Arbeit)
Plectin 1C pGADT7	EcoRI/XmaI	(diese Arbeit)

Weitere Konstrukte

DISC1 pHA		(P.Shazot, University of Durham, U.K.)
SP SUN1 eGFP-N3		(generiert von W.Lu)
SP GFP-N3		(generiert von W.Lu)
Nesprin-2 ABD eGFP-N3		(generiert von M.Munck)

Vektoren

pCR [®] -2.1-TOPO [®]	Invitrogen
pCR [®] -BLUNT II-TOPO [®]	Invitrogen
pEGFP-C2	Clontech

pN3 eGFP	Invirtogen
pGADT7 (GAL4 AD)	Clontech
pGBKT7 (GAL4 DNA-BD)	Clontech
pGem-Teasy [®]	Promega
pGEX-4T-1	Amersham
<u>Bakterienstämme:</u>	
<i>E. coli</i> DH5 α	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> M15	Rüther, 1982

1.3. DNA-Oligonukleotide (Sigma)

MACF1 iso-3 G2A GFP-N3

5' GCGAATTCGCCGCCACCATGGCTAATTCACCTGGGCTGTGTAAAG
5' GCGTCGACCACCAAAGACAGGGTACCATC

MACF1 Isoform-3 pMH HA Vector (Roche) (Iakowos Karakesisoglou)

5' GGGAATTCGCCGCCAVVATGGGAAATTCACCTGGGCTGTGTAAAGGAGCCGAAAG
5' GGGGCGGCCGCTCCAAAGACAGGGTACCATCCTCTTCTGAGAAGGGTGTG

MACF1 Isoform-3 CH2 eGFP-N3

5' GAATTCATGCGTTGGATGAATCACA
5' GTCGACTTATCGCTTGGGACCTGGAG

Plectin 1C eGFP-N3

5' GCCGAATTCATGTTCGGGTGAG
5' GCGGATCCGATCCTGCACGTCCGGCA

Plectin 1C pGADT7

5' GCCGAATTCATGTTCGGGTGAG
5' GCGGATCCGATCCTGCACGTCCGGCA

Plectin 1C pBGKT7

5' GCCGAATTCATGTTCGGGTGAG
5' GCGGATCCGATCCT

Nesprin-3 pCMV Myc/HA

5' GCGGTACCATGACTCAGCAGCCCCAGGACGACTTTGAC
5' GCCGGCGCGGCCGCGTTAGGTGGGTGGTGGGCCATT

Nesprin-3 eGFP-C2

5' GCTCGAGCTATGACTCAGCAGCCCCAGGAC
5' GAAGCTTAGGTGGGTGGTGGGCCATTGTA

Nesprin-3 Δ C eGFP-C2

5' GCTCGAGCTATGACTCAGCAGCCCCAGGAC
5' GCGGTACCGCCGCCACCATGACTCAGCAGCCCCAGGACGACTTTGAC

Nesprin-3 ΔC pGADT7

5'GCGGTACCGCCGCCACCATGACTCAGCAGCCCCAGGACGACTTTGAC
5'TTGACTCTCGAGGCCGCGGCATTGCG

Nesprin-3 ΔC pBKT7

5'GCGGTACCGCCGCCACCATGACTCAGCAGCCCCAGGACGACTTTGAC
5'TTGACTGTCGACGCCGCGGCATTGCG

Nesprin-3 SR1 eGFP-C2

5'GCGGTACCGCCGCCACCATGACTCAGCAGCCCCAGGACGACTTTGAC
5'GCGTCGACGCTGTGACAGTGAGTAGTCATGTAGGT

SR1+SR2 Nesprin-3 pGEX 4T.1

5'GCGTTCGACACCTGCCTGGTACTCCTCATGCTC
5'GCGAATTCATGACTCAGCAGCCCCAGGACGAC

SR1+SR2+SR3Nesprin-3 pGEX 4T.1

5'GCGTTCGACGCCCCGCAGCCGCTCCTCCT
5'GCGAATTCATGACTCAGCAGCCCCAGGACGAC

Nesprin-3 KASH pCMV Myc/HA

5'GCGGTACCATGTGCTGTGTGGCGCTCCCA
5'GCCGGCGCGCCGCGTTAGATTGGGAGCAGGAACAG

1.4. RNA Isolation und RT-PCR Analyse

Gesamt RNA wurde von Mausgeweben mit dem TRIZOL Reagenz (Invitrogen Life Technologie, Carlsbad, CA) nach Herstellerangaben verwendet. Die RNA Konzentration wurde mittels UV Spektrometer ermittelt. Die Reinheit der Proben wurde durch Auftragen der RNA Proben auf ein 1.2% Agarosegel überprüft.

RT-PCR wurde nach Standardprotokollen durchgeführt (Ziam, 2006). Dafür wurde die Gesamt RNA durch die reverse Transkriptase (RT, Invitrogen), unter Verwendung von randomisierten Hexanukleotiden (p (dN)₆) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Die cDNA (2μg) wurde für 35 Zyklen amplifiziert. Folgende Konditionen wurden verwendet: 94°C für 30 Sekunden, 60°C für 45 Sekunden und 72°C für 1 Minute. Daraus resultierende entweder ein 1000 bp (MACF1 Iso3, siehe 1.3) oder 400 bp DNA GAPDH Fragment. Die Kontroll-spezifischen GAPDH Nukelotide hatten folgende Sequenz:

5'-GTCTACATGTTCCAGTATGACTCCACTCACGG
5'-GTTGCTGTAGCCGTATTCATTGTCATAACCAGG

1.5. Zellkultur und transiente Transfektion von Säugerzellen durch Elektroporation

Zell-Linien (Name, Organismus, Gewebe):

COS7, *Cercopithecus aethiops*, Niere

HaCaT, *Homo sapiens*, Epidermis

Glioma C6 *rattus norvegicus*, Gehirn

3T3 *mus musculus*, Dermis

MDCK *canis lupus*, Niere

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

Die Isolierung primärer Keratinozyten und Fibroblasten aus neugeborenen Mäusen und die weiterführende Kultivierung dieser Zellen, wurden wie in Kandert *et al.*, 2008 beschreiben, durchgeführt.

COS7 Zellen (5×10^6) wurden in 200 μ l Medium aufgenommen und mit 10 μ g hochreiner Plasmid DNA in eine Elektroporationsküvette gegeben. Die Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert und bei 950 μ F und 180 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 Zellkultur-schale gegeben und im Brutschrank kultiviert.

HaCaT, Glioma, und MDCK Zellen wurden mit der Amaxa Nucleofector Technologie entsprechend der Angaben des Herstellers (Amaxa Biosystems) transfiziert.

1.6. Fixieren und permeabilisieren von Säugetierzellen

Auf Deckgläschen ausgesäte Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 3 % Paraformaldehyd in BRB 80 Puffer (0.08 M Pipes, 1 mM $MgCl_2$; 1 mM EGTA in H_2O angesetzt und der pH-Wert der Lösung mit KOH auf 6.8 eingestellt) für 4 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Zellen wurden danach mit 0,5 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Eine teilweise Permeabilisierung wurde mit 1-40 μ g/ml Digitonin (Stammlsg 40mg/ml in DMSO) in PBS für 4 min auf Eis durchgeführt. Diese Behandlung macht die Plasmamembran durchlässig, lässt aber die Kernmembran intakt. Danach wurden die Deckgläschen 3 x mit PBS gewaschen und konnten für die Fluoreszenzmikroskopie verwendet werden.

1.7. Antikörper und Immunfluoreszenz Mikroskopie

Immunoblot- und Immunfluoreszenzanalysen wurden wie in Lüke *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2008 durchgeführt. Die folgenden Antikörper wurden wie folgt verwendet:

Verdünnungen der Antikörper wurden in Westernblotanalysen (WB) in 5% Milchpulver in 1x PBS oder für Immunfluoreszenzen (IF) in PBG angesetzt. (PBG: 1x PBS; 3% BSA)

Primäre Antikörper:

anti-DISC1 (IF 1:50 polyklonal aus Ziege)	Santa Cruz
anti-DISC1 (1:50; WB 1:1000 polyklonal aus Kanninchen)	(P. Shazot University of Durham, UK)
anti- aktives β -Catenin (IF 1:50 monoklonal aus Maus)	Signal Transduction
anti-E-Cadherin (IF 1:50 monoklonal aus Maus)	Zymed
anti-HA (IF 1:200 monoclonal aus Ratte)	Roche
anti-GFP (mAb K3-184-2) (monoklonal aus Maus)	Schreiner, 2000
anti-Golgi (IF 1:50 mAb GM130) (monoklonal aus Maus)	BD Transduction Laboratory
anti-Histon1 (IF 1:50 monoklonal aus Kaninchen)	Sigma
anti-Lamin A/C (IF 1:50 JOL2) (monoklonal aus Maus)	Chemicon
anti-Lamin A/C (IF 1:50 sc-20681) (polyklonal aus Kaninchen)	Cell Signaling Technology
anti-MACF1 iso-3 pAb (IF 1:300; WB 1:1000 polyklonal aus Kanninchen)	hergestellt von M.Munck
anti-MACF1 Rod pAb (IF 1:200; WB 1:1000 polyklonal aus Kanninchen)	hergestellt von M.Munck
anti-Myc (Hybridomaüberstand aus Maus)	(Ag A.A. Noegel)
anti-Nesprin-2 (mAb K20-478-4) (monoklonal aus Maus)	Zhen et al., 2002
anti-Plectin (IF 1:50; WB 1:1000 polyklonal aus Meerschweinchen)	(R. Schöder)
anti-Plectin (IF 1:50 N-20 (polyklonal aus Ziege)	Santa Cruz
anti-RhoA (IF 1:50 polyklonal aus Ziege)	Santa Cruz
anti- β -Tubulin (IF 1:50; WB 1:000 mAb WA3 monoklonal aus Maus)	Dr. Euteneuer

Sekundäre Antikörper:

Die kommerziell erhältlichen sekundären Antikörper wurden in einer 1:2000 Verdünnung in der indirekten Immunfluoreszenz verwendet.

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 488/633-Konjugat	Molecular Probes
Ziege-anti-Maus-IgG, Cy3-Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Maus-IgG, Cy5-Konjugat	Chemicon
Ziege-anti-Maus-IgG, FITC-Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Maus-IgG, Peroxidase-Konjugat	Sigma

Für das Anfärben der Mitochondrien in der indirekten Immunfluoreszenz wurden zu den Zellen für 30 min. in einer 1:8000 Verdünnungen der Mito-Tracker (Molecular Probes) konjugiert zu TRITC in das

Zelkulturmedium gegeben und anschließend mit 3x PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen fixiert.

Herstellung der MACF1 iso-3pAb und MACF1 Rod pAb polyklonaler Antikörper

MACF1 polyklonale Antikörper (iso-3 pAb) und (Rod) wurden, wie in Ziam, 2006 und Libotte *et al.*, 2005 beschrieben, hergestellt. MACF1 iso-3 pAb polyklonale Antikörper wurden gegen das murine Aminosäurepeptid (AS 1-330) und MACF1 pAb Rod (AS 1266-1817) AAF06360 gerichtet.

Für die Epifluoreszenzmikroskopie wurde das Fluoreszenzlichtmikroskop DMR der Fa. Leica benutzt. Die *live cell imaging* Aufnahmen wurden mit dem Leica Epifluoreszenzmikroskop. Leica AM TIRF MC durchgeführt und eine Schichtdicke von 65nm untersucht. Für die konfokale Lasermikroskopie wurde das von der Fa. Leica entwickelte CLSM-SP und SP5 Mikroskop oder das Zeiss LSM 510 benutzt, das optische Schnittebenen durch die Präparate erlaubt. Die Daten werden mit dem Adobe Photoshop und Coral Draw Programmen weiterverarbeitet.

1.8. Proteinlysate aus Geweben und Präparation von Gefrierschnitten

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 (siehe 1.9) 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 aufgeköcht. Die Gewebelysate wurden bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

Wildtyp (WT) Mäuse wurden durch Ethanol (im Verhältnis 70:30) betäubt und durch Entfernen des Kopfes (neugeborene Mäuse) oder durch Inkubation auf Trockeneis getötet. Anschließend wurde die Haut entnommen und für Gefrierschnitte in Tissue-Tek-Einbett-Lösung (Sakura) auf Trockeneis eingefroren. Die Blöcke wurden bei -80°C gelagert. Die Anfertigung von Gefrierschnitten erfolgte bei einer Temperatur von ca. -22°C in einem Kryostat (Leica). Dabei wurde Schnitte mit einer Dicke von 7-11 µm erstellt. Die Schnitte wurden auf Objektträger überführt und bei -20°C gelagert.

1.9. Proteinbindungsanalysen von Fusionsprotein mit COS7 Zelllysaten

Die Aufreinigung der GST Fusionsproteine und der GST-Proteinbindungsanalysen (Pull-down) wurden wie in Dreuillet *et al.*, 2002 beschrieben durchgeführt. Die Proteinbindungsanalysen wurden transfizierte COS7 Zellen von Zellkulturschalen (15cm) abgeschabt und 15 min auf Eis in Lysis-Puffer (50 mM Tris/HCL, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% TritonX-100, 1 Tablette Complete-Mini Inhibitoren Cocktail pro 10ml, 1 mM DTT, 1 mM Bezamedin, 0,5 mM PMSF in DMSO und 1 mM EGTA) inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation des Lysats bei 100.000 x g für 30 min bei 4 °C. Der Überstand mit

den cytosolischen Proteinen wurde über Nacht mit den aufgereinigten und an die Glutathion-Agarose-Matrix gebundenen Fusionsproteinen auf einem Roller bei 4 °C inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurde die Glutathion-Agarose-Matrix in 30-50 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und bei 95 °C erhitzt. Die Überstände wurden separat mit SDS-Probenpuffer behandelt. Glutathion-Agarose-Matrix und Überstände wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunmarkierung analysiert.

1.10. Immunpräzipitation

Semi-konfluent bewachsenen Glioma/COS7 Zellen mit 15 cm Kulturschalen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und das restliche PBS mit einer Pipette abgenommen. Anschließend wurde 1ml Lysispuffer (50 mM Tris/HCL pH 7.5, 150 mM NaCL, 0.5% Natriumdesoxycholat, 10% Glycerin, 1 Tablette Complete-Mini Inhibitoren Cocktail pro 10ml, 1 mM DTT, 0,5 mM Benzamedin, 1 mM PMSF in DMSO und 1 mM EGTA) auf je eine Platte gegeben und die Zellen abgeschabt und so 20min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fünfmal zur Zerstörung der Zellmembranen durch eine 0,4mm-Kanüle gezogen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach einer zehnekündigen 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. Hybridomaüberstand des Myc Antikörpers (10ml) wurden mit den Beads über Nacht inkubiert und anschließend bei 1000rpm abzentrifugiert Die Beads-Antikörper wurden 3x mit PBS gewaschen und mit den Zellysaten inkubiert. Oder: Für die Antigen-Antikörper-Bindung wurde 5 µg aufgereinigter pAb iso-3 Antikörper 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 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 aufgeköcht. Die Beads wurden zweimal mit Lysispuffer und zweimal mit je 1,5 ml PBS gewaschen und in 2x SDS-Probenpuffer aufgeköcht. Zur weiteren Analyse wurden die Lysate wie beschrieben einer Silberfärbung und einer Westernblotanalyse unterzogen.

1.11. Silberfärbung

Für eine Färbung der aufgetrennten Proteine mit einer sensitiveren Methode wurde die Silberfärbung benutzt. Dazu wurden SDS-PAGE Gele 5 min in Fixierungs-Lösung geschüttelt (50% Azeton 1,5 ml 50% Trichloressigsäure 25µl 37% Formaledehyd). 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 (0,8 ml 20% Silbernitrat, 0,6 ml 37% Formaldehyd, ad 60ml H₂O) geschüttelt. Danach wurde das Gel nochmals gewaschen (2 x 5 sek) und mit Entwickler-Lösung (1 g NaCO₃; 2µl 37 % Formaldehyd, 25µl 10% Na₂S₂O₃ x 5H₂O ad 60 ml H₂O) behandelt. Die Reaktion wurde nach 20-30 sek mit der Stopp-Lösung abgestoppt und das Gel mit Wasser abgespült.

1.12. Chromatin Immunpräzipitation (ChIP)

Für die ChIP Analyse wurden $4,5 \times 10^7$ HaCaT Zellen verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Vorschrift des Herstellerprotokolls Chip-IT express Kit und Chip-IT control Kit der Firma Active Motif. Als Kontrolle für präzipitierte DNA wurde das GAPDH DNA Fragment (400 bp) durch GAPDH-spezifische Primer nachgewiesen. Diese erkannten die GAPDH Sequenz:

5'GAPDH Exon 1, 5'-GCGCCCCCGGTTTCTATAAATTGAG
3'GAPDH Exon 1, 5'-AGAGAACAGTGAGCGCCTAGTGGCC

3 µl der eluierten DNA wurde für 34 Zyklen unter folgenden Bedingungen amplifiziert: 95°C für 30 Sekunden, 70°C für 30 Sekunden und 72°C für 40 Sekunden.

1.13. Hefe-Zwei-Hybrid System

Y190 Hefezellen wurden mit Plasmiden kotransformiert und Transformanten wurden auf SD-Trp-Leu Platten selektioniert. Die Interaktion wurde durch Wachstumstests auf Selektionsplatten (SD-Trp-Leu-His mit 60 mM 3-Amino 1,2,4,-Triazol) oder durch X-Gal Analyse, um die Interaktion zu bestätigen, durchgeführt. Die verwendeten Potokolle für die Hefe Transformation und X-Gal Test sind im Detail hier beschrieben: Yeast Potocols Handbook PT3024-1, Clontech.

1.14. Statistische Auswertung

Die gezeigten Daten wurden als Durchschnitt +/- Standardabweichung dargestellt. Statistische Vergleiche wurden unter Verwendung des Student's T-Test durchgeführt. Ein Unterschied wurde als signifikant eingestuft, wenn der P Value bei < 0.05 lag.

III ERGEBNISSE

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es die MACF1 Isoform-3 mit Hilfe von biochemischen, zellbiologischen und immunohistochemischen Methoden zu charakterisieren. Ihre Besonderheit ist der 35 kDa lange N-Terminus, der durch alternatives Spleißen mit den Sequenzen, die für die CH2 Domäne kodieren, fusioniert wird. Dadurch weist die Isoform-3 nicht die charakteristische N-terminale Aktin-bindende Domäne der anderen MACF1 Isoformen auf. Im Folgenden wurde daher der N-Terminus näher charakterisiert und nach neuen Bindungspartnern gesucht, um so Hinweise auf die zelluläre Funktion des MACF1 Isoform-3 Proteins zu erlangen.

1. *In silico* Analyse des N-Terminus von MACF1 Isoform-3.

1.1. Datenbankanalyse zur Identifizierung von putativen posttranslationalen Modifikationsstellen und funktionellen Sequenzmotiven des MACF1 Isoform-3 N-Terminus.

Für eine Aufklärung der Funktion des MACF1 Isoform-3 Proteins wurde die 330 Aminosäuren lange Sequenz des N-Terminus mehreren Datenbankanalysen (<http://www.expasy.ch/tools/Prositescan/Hits/Interpro/Motivscan/SMART>) bezüglich möglicher Sequenz- sowie posttranslationaler Modifikationsmotive unterzogen. Diese Datenbanken enthalten Aminosäuresequenzprofile und Muster, die für Proteinfamilien oder Domänen charakteristisch sind. Anhand Berechnungen mit dem HMM (*Hidden Markov Models*, Eddy *et al.*, 1995), dem Abgleich mit bekannten Domänstruktur- und Musterdatenbanken und dem Herausrechnen falsch-positiver Treffer kann eine Vorhersage der modularen Architektur von Proteinen, Informationen zur Struktur, Funktion und Lokalisation bereitgestellt werden (Schultz *et al.*, 1998; Sigrist *et al.*, 2002; Pagni *et al.*, 2007).

In der Aminosäuresequenz von MACF1 Isoform-3 (Abb. 1.1) wird eine potentielle N-terminale (N-) Myristilierung der Aminosäure Glyzin in Position 2 vorausgesagt (Abb. 1.1., rotes Oval). Bei der N-Myristilierung handelt es sich um eine posttranslationale Modifikation bei der die 14 C-Atome lange gesättigte Fettsäure Myristinsäure über eine Amidbindung an einen N-terminalen Glyzinrest kovalent an das Protein gebunden wird. Durch die Myristinsäure erfolgt eine Fixierung des Proteins an Membranen, indem sie als Verankerung innerhalb einer der beiden Phospholipid-Schichten wirkt (Wilcox *et al.*, 1987). Neben dem N-terminalen Glyzinrest werden die 10 darauffolgenden C-terminalen Aminosäuren als Erkennungssequenz für die N-Myristoyltransferase (NMT) benötigt, welche die Bindung an ihre katalytische Bindetasche bewerkstelligen (Maurer-Stroh *et al.*, 2002). Diese Erkennungssequenz kann ebenfalls im N-Terminus der Isoform-3 gefunden werden und weist damit auf eine mögliche Myristilierung des Proteins hin.

In der Aminosäureposition 26-40 wird ein NLS (*nuclear localization signal*) vorhergesagt. Dieses befand sich in der Sequenz des weiter unten besprochenen HMG Box Motivs. NLS liegen häufig in einem

DNA-bindenden Motiv eingebettet vor (Cokol *et al.*, 2000). Im Anschluss an diese posttranslationale Modifizierung wird eine Proteindomäne vorausgesagt, die als HMG17 (*High Mobility Group 17*) oder auch als HMG Box bezeichnet wird. Das HMG17 ist ein nukleäres Protein, das spezifische Interaktionen zwischen DNA und Proteinen eingehen kann und als Nicht-Histon im Chromatin-Netzwerk bezeichnet wird. Die HMG Box ist eine 70-80 Aminosäure große DNA-bindende Domäne. HMG Box enthaltende Proteine werden in zwei Subgruppen eingeteilt basierend auf ihrer Eigenschaft DNA sequenzspezifisch oder sequenzunabhängig zu erkennen. Proteine, die ein solches Motiv besitzen, können gleichzeitig an DNA und Transkriptionsfaktoren binden. Diese Interaktion findet meist in transkriptionell-aktiven Bereichen des Chromatins statt. (Read *et al.*, 1993; Bewley *et al.*, 1998). C-terminal an die HMG Box schließt sich eine putative HR1, REM Repeat oder auch als RhoA Inhibierungsdomäne bekanntes Motiv an. Diese Domäne besitzt die Eigenschaft, an die aktive (GTP-gebunden) Konformation der RhoA GTPase zu binden.

Mittels der Datenbankanalyse war eine Voraussage verschiedener posttranslatonaler Phosphorylierungsstellen (*Protein kinase C* PKC, *Casein kinase II* CK2) mit unterschiedlichen Kinasespezifitäten möglich, wobei wiederholt die Erkennungssequenzen des EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) von verschiedenen Programmen genannt wurden (Abb. 1.1). Der EGF-Rezeptor gehört zur Klasse der Tyrosinkinase Rezeptoren. Diese verfügen über eine Tyrosinkinaseaktivität in ihrem zytosolischen Anteil, die durch die extrazelluläre Bindung der EGF (*Epidermal Growth Factor*) und TGF (*Transforming Growth Factor*) Liganden aktiviert wird und zur Autophosphorylierung des Rezeptors führt. An diese Phosphotyrosinreste des Rezeptors können wiederum Proteine der Ras-Raf-MEK-Kaskade durch ihre SH2-Domänen andocken, wodurch ihre Aktivierung bewirkt wird. Dadurch wird das MAPK Protein in den Zellkern transloziert und die Aktivierung von Zielgenen, die das Zellwachstum stimulieren, induziert.

Der N-Terminus von MACF1 Isoform-3 weist einen isoelektrischen Punkt (pI) von 5,1 auf. Im Allgemeinen weisen Proteine, die mit Histonen interagieren, einen solch niedrigen pI-Wert auf. In Übereinstimmung damit liegen Daten aus unserem Labor vor (persönliche Kommunikation, Dr. I. Karakesisoglou), die Histon 1c und 1d als Bindungspartner in einer MACF1 Isoform-3 spezifischen Immunpräzipitation nachweisen. Des Weiteren wurde mittels des WoLFPSORT (<http://wolfpsort.org>) Programms die Verteilung des N-Terminus innerhalb der Zelle berechnet. Die Ergebnisse waren in einer prozentualen Wahrscheinlichkeit angegeben und sagten eine nukleäre (18.0), zytoplasmatische (9.0) und mitochondriale (2.0) Lokalisation voraus. Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass MACF1 Isoform-3 ein dynamisches Protein (Phosphorylierung; HR1 Domäne) ist. Neben seiner zytoplasmatischen Verteilung weist es möglicherweise eine nukleäre Lokalisation (PI, NLS, HMG Box) auf.

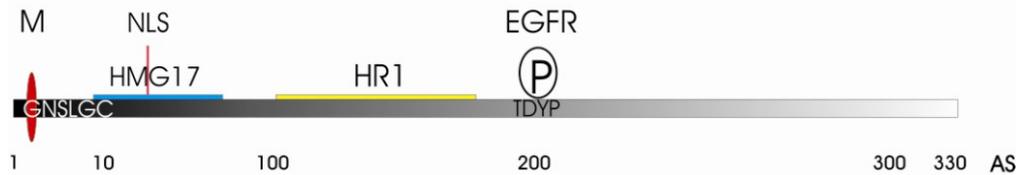


Abb. 1.1.: Schematische Darstellung des N-Terminus von MACF1 Isoform-3 mit den putativen posttranslationalen Modifikationsstellen der Computer-basierten Proteinsequenzanalyse.

Der N-Terminus des MACF1 Isoform-3 Proteins (AS 1-330) ist als grau-schattierter Balken dargestellt; die Positionen der Aminosäuren (AS) sind angezeigt. M symbolisiert die potentielle Myristylierung in Position 2 (rotes Oval). Weitere AS, die wichtig für eine erfolgreiche Myristylierung sind, sind ebenfalls angezeigt. Die Lage der HMG-Box erstreckt sich von AS 20–80 (blauer Balken:). Das NLS (*nuclear localization signal*) in Position AS 26-40 ist als roter Balken: angedeutet. Die HR1 Rho Inhibierungsdomäne erstreckt sich von Position AS 101 bis 159 (gelber Balken:). P markiert eine potentielle Phosphorylierungsstelle des EGF-Rezeptors. Die jeweilige Erkennungssequenz ist in dem grauen Balken angegeben.

1.2. Der N-Terminus von MACF1 Isoform-3 ist hochkonserviert in Säugetieren.

Die MACF1 Isoformen unterscheiden sich strukturell nur in ihrem N-Terminus. Abgesehen von der vierten Isoform, die eine zusätzliche Plakin Domäne aufweist, wird angenommen, dass die Aminosäuresequenz (AS) der Proteine identisch ist. Durch den Vergleich der Aminosäuresequenzen des murinen MACF1 Isoform-3 N-Terminus mit mehreren Orthologen der Säugetiere (*Sus scrofa* (*Sc*), *Canis lupus* (*Cf*), *Pan troglodytes* (*Pt*), *Homo sapiens* (*Hs*), *Mus musculus* (*Mm*), und *Rattus norvegicus* (*Rn*) sollte überprüft werden wie hoch der Grad der Konservierung ist. In Abbildung 1.2. wurden die Aminosäuresequenzen der orthologen N-Termini von AS 1-330 verglichen und es kann eine hohe AS Übereinstimmung der untersuchten Primärsequenzen festgestellt werden. Lediglich der Bereich von Position 190 bis 272 der Aminosäuresequenzen zeigte eine höhere Variabilität auf. Der hohe Konservierungsgrad lässt vermuten, dass diese Isoform eine wichtige Funktion in Säugetierzellen ausübt.

Sc	MGNLSLGCVKPEPKDSIAIPEKAPISPKKRVRFRKRWGKKKTPTEAPRQEPLQGTGAVEE	60
Cf	MGNLSLGCVKPEPKDSLAIPEKAPISPKKRLRFKRWGKKKTPTEVSHHEEPSEGTRVIEE	60
Pt	MGNLSLGCFKPEPKESIAIPEKAPISPKKRVRFRRWGKKIPTPEASHQEETSEGTGVIEE	60
Hs	MGNLSLGCFKPEPKESIAIPEKAPISPKKRVRFRRWGKKIPTPEASHQEETSEGTGVIEE	60
Rn	MGNLSLGCVKPEPKESIAVPEKAPISPKKRVRFRKRWGKKALTEASHRKEALEGTGVIEE	60
Mm	MGNLSLGCVKPEPKESIAVPEKAPISPKKRVRFRKRWGKKILTPEASHREEALEGTGVIEE	60
	*****.****:*:*:*****:****:***** **..:.*. :** .:**	
Sc	TEALTKLTVSLQKEEGVGGVEPAPPDILLPGDSAPNSGVGDQGMIVQVKERFQGEIQTAAH	120
Cf	TETQLKLTVSLQKEEGAGGVEHPPADVSLPRDSAPSSGVGDQGMIVQVKERFQGEIQTAAH	120
Pt	TETLTKLTESLQKEDVGGVEHTPPDILLPGDSAPNSRVVDRGMIVQVKERFQGEVQTAAH	120
Hs	TETLTKLTESLQKEDVGGVEHTPPDILLPGDSAPNSRVVDRGMIVQVKERFQGEVQTAAH	120
Rn	TEAPRKLAAASLPKEHGVGGAHPPSDILLH--LAPNSGVVDQGMIVQVKERFQAEIQTAAH	118
Mm	TETLTKLTARLPKEPGVGGAEHPPSDIFLPGDSAPNSGVGDQGMIVQVKESFQAEIQTAAH	120
	** : ** : * ** *.** : .*. : * ** . * * :***** ** . :****	
Sc	LLSENESSVTGGVWDSLGEGMTVIARLLDNPAEKNCEKSVSGLVEFPRTASCSSRAVLLP	180
Cf	LLLENESSVAGGVWDSLEEGMTVIAHLLDNPAERNCEKSVSGLVEFPRTASCSSRAVLLP	180
Pt	LLLENESSVAGGVWDSLEEGMTVIAHLLDNPAERNCEKSVSGLVEFPRTASCSSRAVLLP	180
Hs	LLLENESSVAGGVWDSLEEGMTVIAHLLDNPAERNCEKSVSGLVEFPRTASCSSRAVLLP	180

Rn	LLLENESVVGGAWDSLEEGMTVIAHLLDNLAERNCEKSVSQLVEFPRTASCSSRAVLLP	178
Mm	LLLENESVVGGAWDSLEEGMTVIAHLLDNPAERNCEKSVSQLVEFPRTASCSSRAVLLP	180
	** ***** *_*_*** ** **:*** **:******	
Sc	LQGGTAVEKGD ^Q TLGFG--SSTFHR ^T TDY-STDIGN ^Q DHLSEG ^W SVGGG ^T KSILSS ^P QSSS	237
Cf	LQGEAAV ^G KGG ^T RF ^G HR--SSTFPR ^T DHPT ^N AE ^T QNH ^H SEG ^W CRG ^A GTMA ^I CST ^P H ^T GS	238
Pt	LQGETAVEK ^G NIQR ^G F ^R --SCALP ^R TDY-PTDK ^G NQE ^Q FSK ^G WSVEE ^G TKSV ^G AP ^Q TAS	237
Hs	LQGETAVEK ^G NIQR ^G F ^R --SCALP ^R TDY-PTDK ^G NQE ^Q FSE ^G WSVEE ^G TKSV ^G AP ^Q TAS	237
Rn	LQGETAVE ^Q GG ^T LLR ^F R--SSTLP ^G TDY-PSDR ^G DQ ^D PPE ^G WTVG ^G RAK ^S IP ^S AP ^P TGS	235
Mm	LQGETAVE ^Q GG ^T LLR ^H RHS ^T LP ^R TDY-PS ^E TV ^D Q ^D PSE ^G WSVGG ^R TK ^S V ^S AP ^P TGS	239
	** * : ** : * . . * . : : ** : : : * : : . : ** : : : . : * : . *	
Sc	WIAERSVPSSLLDRSRVQSRTEPARVGVPRQLPRPPTSQSDLSISGMTVSVILPSSSGYG	297
Cf	WIAEPSVPSSLLDQSRGHRCTEPPSVGRVPPQGPRLPTSQSDLSISGRVTVSVILPSSSGYG	298
Pt	WII ^E CSVSSLLLDQ ^P GG ^Q RR ^T EP ^S HV ^G V ^Q PP ^Q DS ^R LP ^T SQSDLSISGVTVSVILPSSSGYG	297
Hs	WII ^E CSVSSLLLDQ ^P GG ^Q RR ^T EP ^S HV ^G V ^Q PP ^Q DS ^R LP ^T SQSDLSISGVTVSVILPSSSGYG	297
Rn	WIAKCSVASSIPKQSGDSIHTEPSHV ^D LV ^S CKGLIMPASQSDLSFSGITMSILPSSSGYG	295
Mm	WIAKCSVASSIPKQSGDPIHTEPTHV ^G LV ^S CKGPIMPASQSDLSVSGITVSVILPSSSGYG	299
	** : ** . * : . : . *** . * . : * : ***** . ** * : *****	
Sc	SDGLYLRGVQPKDTEPEKSS ^T SFSEEDG ^T LSLE	330
Cf	SDGPHLRGAQPRDTEPEKT ^S T ^S SFSEEDG ^T LSLE	331
Pt	SDGPHIHGIQPKDTEPEKSS ^T SFSEEDG ^T LSLE	330
Hs	SDGPHIHGIQPKDTEPEKSS ^T SFSEEDG ^T LSLE	330
Rn	SDGLRLHGVRPEYTEPEKT ^S T ^P SFSEEDG ^T LSLE	328
Mm	SDGLRLHGIRPEDTEPEKT ^S T ^P SFSEEDG ^T LSLE	332
	** * : : * : * . ***** : * . *****	

Abb. 1.2.: ClustalW Aminosäuresequenzvergleich des N-Terminus von MACF1 Isoform-3 in Säugern.

Vergleich der Aminosäuresereste 1-330 von *Sus scrofa* (Sc), *Canis lupus* (Cf), *Pan troglodytes* (Pt), *Homo sapiens* (Hs), *Mus musculus* (Mm), und *Rattus norvegicus* (Rn). Kleine Aminosäuren werden dargestellt in Rot, saure in Blau, basische in Magenta, Hydroxyl- und Aminogruppen-haltige in Grün. Identische Aminosäuren sind gekennzeichnet (*)

2. Charakterisierung polyklonaler Antiseren gegen das MACF1 Protein.

2.1. Herstellung der polyklonalen Antikörper MACF1 iso-3 pAb und MACF1 Rod pAb.

Um eine detaillierte biochemische und zellbiologische Analyse der MACF1 Proteine zu ermöglichen, wurden in unserem Labor zwei polyklonale Antikörper hergestellt. Mit Hilfe des Rod pAb sollten alle Isoformen detektiert werden können, da dieser gegen die konservierte SR Rod Domäne gerichtet ist. Iso-3 pAb ist gegen die Isoform-3 gerichtet und erkennt die N-terminale Proteinsequenz. Der pAb iso-3 Antikörper wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert.

Die Zielsetzung war es einen Antikörper zu generieren, der die Detektion der meisten MACF1 Isoformen erlauben würde. Aus diesem Grunde wurde ein zentraler Bereich in der konservierten SR Rod/Stabdomäne als Epitop für die Antikörpergenerierung ausgewählt. Für die Antikörper Herstellung wurden die Fragmente iso-3 (AS 1-330) und Rod (AS 1266-1817) des humanen MACF1 Gens mit dem Glutathion-S-Transferase (GST) Gen fusioniert. Die rekombinanten Proteine wurden in *E. coli* exprimiert und durch Kopplung an eine Glutathion-Agarose-Matrix aufgereinigt. Die Immunisierung der

Kaninchen erfolgte durch die Firma Pineda (Berlin). Seren von 60 bzw. 90 Tagen nach der Immunisierung wurden anschließend in unserem Labor über eine Cyanbromid-Sepharose Säule affinitätsgereinigt.

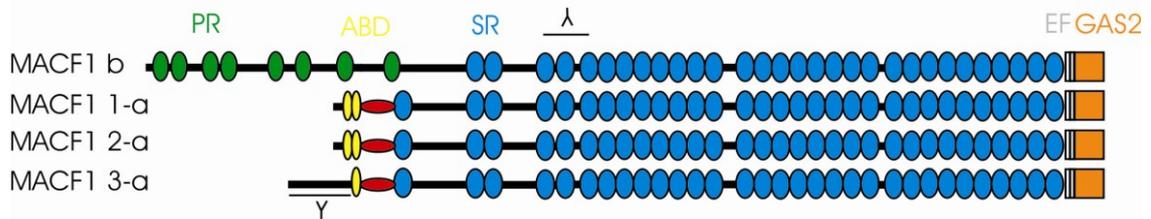


Abb. 2.1.: Schematische Skizze: Lage der Epitope der MACF1 Antikörper.

Dargestellt ist die Domänenkomposition der MACF1 Isoformen. Grüne Kreise symbolisieren die Plakin-ähnliche Wiederholungen (PR). Gelbe Kreise stellen die Aktin-bindende Domäne (ABD) dar. Diese besteht aus der CH1 und CH2 Domäne. In der Isoform-3a liegt nur die CH2 Domäne vor. Der rote Kreis symbolisiert die M1 Mikrotubuli-bindende Domäne. Blaue Kreise stellen die Spektinwiederholungen (SR) dar. Im Anschluss daran sind die beiden Ca^{2+} bindenden EF Hand Domänen in grau-unterlegten Boxen dargestellt. Das *Growth-specific Protein 2* Domäne (GAS2) ist eine Mikrotubuli-bindende Domäne und als orangefarbene Box skizziert. Die Y markieren die Lage der von den Antikörpern erkannten Epitope.

2.2. MACF1 iso-3 pAb ist ein spezifischer Antikörper.

Anschließend wurde der neu generierte Isoform-spezifische Antikörper (iso-3 pAb) auf eine mögliche Kreuzreaktion mit dem MACF1 Paralog Bpag1 in der indirekten Immunfluoreszenz- und in der Immunoblotanalyse überprüft.

2.2.1. Nachweis der Spezifität des MACF1 iso-3 pAb Antikörpers in der indirekten Immunfluoreszenz.

Um den iso-3 pAb Antikörper auf eine mögliche Kreuzreaktion hin zu testen, wurde der hoch homologe N-Terminus des Bpag1n3 (AS 1-253) als Myc-Fusionsprotein transient in COS7 Zellen exprimiert. Das Bpag1n3 Fusionsprotein lokalisiert prominent an Zell-Zell-Kontakten und an der Plasmamembran (Abb. 2.2.1. A, Pfeile). Anschließend wurde mittels des neuen Antikörpers die endogene MACF1 Isoform-3 Verteilung in transfizierten und nicht transfizierten Zellen in der indirekten Immunfluoreszenz verglichen. Nach Inkubation mit dem iso-3 pAb Antikörper kann kein Unterschied in der MACF1 Isoform-3 Lokalisation in Transgen-exprimierenden und nicht exprimierenden Zellen beobachtet werden (Abb. 2.2.1. A'). Das endogene MACF1 Isoform-3 Protein lokalisiert diffus im Zytoplasma und im Zellkern. Zusätzlich lässt sich beobachten, dass, obwohl transient exprimiertes Bpag1n3 Fusionsprotein an den Zell-Zell-Kontakten und Membranausläufern angereichert vorliegt, es nicht von den iso-3 pAb Antikörper detektiert wird (Abb. 2.2.1. A'-A'', Pfeile). Dies zeigt, dass der gegen das MACF1 Isoform-3 Protein gerichtete polyklonale Antikörper spezifisch die N-terminale MACF1 Isoform-3 Sequenz erkennt und keine Kreuzreaktivität mit dem paralogen BPAG1n3 Protein aufweist.

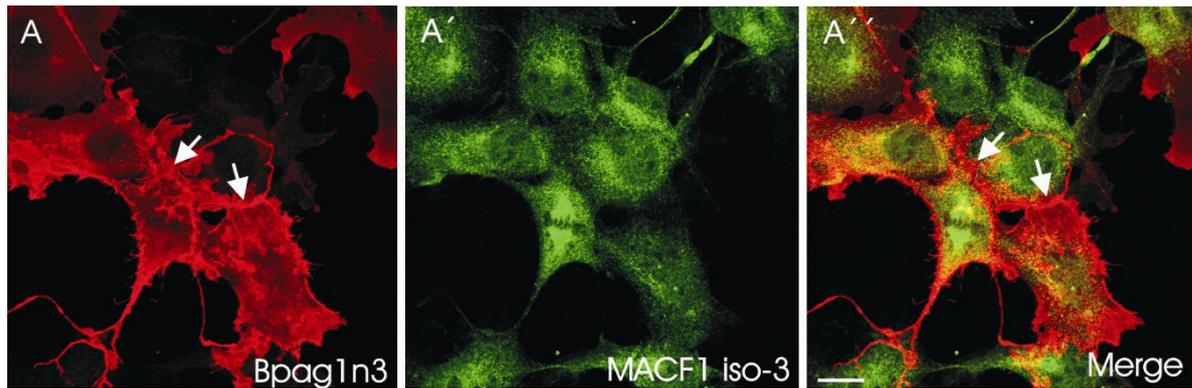


Abb. 2.2.1.: Immunfluoreszenzanalyse der MACF1 iso-3 pAb Antikörper-Spezifität in COS7 Zellen.

Das Bpag1n3 (AS 1-253) Myc Fusionsprotein lokalisiert an der Plasmamembran und an den Zell-Zell-Kontakten (A). Der MACF1 Isoform-3 (iso-3 pAb) Antikörper detektiert das endogene MACF1 Isoform-3 Protein (A'), jedoch nicht das homologe N-terminale Bpag1n3 Myc-Fusionsproteinen (A'') in COS7 Zellen.

COS7 Zellen exprimierten transient das Bpag1n3 Myc-Fusionsprotein (A). A'-A'' Die Zellen wurden in einer Doppelfärbung mit Myc- und MACF1 iso-3 pAb spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Detektion primärer Antikörper erfolgte mit einem sekundären anti (α) Maus- (AF 568) bzw. α -Kaninchen (AF 488) Alexa Fluor-gekoppelten Antikörpern. In der vorliegenden Arbeit wurden alle Aufnahmen der indirekten Immunfluoreszenz mit Hilfe eines konfokalen Laserscan Mikroskops (Leica oder Zeiss) aufgenommen. Balken: 10 μ m.

2.2.2. Nachweis der Spezifität des MACF1 iso-3 pAb Antikörpers in der Immunoblotanalyse.

Um eine mögliche Kreuzreaktion mit Bpag1 auszuschließen, wurde als nächstes der MACF1 iso-3 pAb mittels einer Immunoblotanalyse überprüft. Hierfür wurden Zelllysate von COS7 Zellen, die transient Bpag1n3 Myc-Fusionsproteine exprimierten, analysiert. Als Positivkontrolle dienen N-terminale GFP Fusionsmutanten des MACF1 Isoform-3 Proteins. Diese enthalten die Sequenz des N-Terminus, der entweder C- oder N-terminal an das GFP Gen fusioniert ist (Abb. 4.1.). Die Expression der Fusionsproteine wird durch die Detektion von GFP- und Myc-spezifischen Antikörper validiert (Abb. 2.2.2.). Iso-3 pAb detektierte die MACF1 Isoform-3 spezifischen Fusionsproteine, jedoch nicht das homologe Bpag1n3 Fusionsprotein (Abb. 2.2.2.).

Wie auch in der Immunfluoreszenzanalyse zeigt auch die Immunoblotanalyse, dass der gegen das MACF1 Isoform-3 Protein gerichtete polyklonale Antikörper spezifisch die N-terminale MACF1 Isoform-3 Sequenz erkennt und keine Kreuzreaktivität mit dem paralogen BPAG1n3 Protein aufweist.

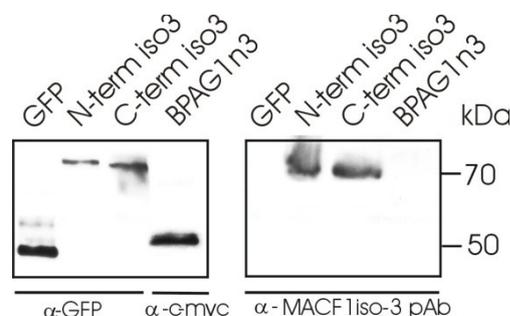


Abb. 2.2.2.: Immunoblotanalyse der MACF1 iso-3 pAb Antikörper-Spezifität in COS7 Zellen.

Der GFP- und Myc Immunoblot (links) zeigt die GFP, N- oder C-terminalen GFP MACF1 Isoform-3 und Bpag1n3 Myc Fusionsproteine. Auf dem MACF1 Isoform-3 (iso-3 pAb) spezifischen Immunoblot werden nur die MACF1 Isoform-3 spezifischen Fusionsproteine, nicht aber das homologe Bpag1n3 oder die GFP Kontrolle erkannt.

COS7 Zellen exprimierten transient N-, oder C-terminal fusionierte MACF1 Isoform-3 GFP Proteine oder N-terminal Myc Bpag1n3

Fusionsproteine. Die daraus generierten Zelllysate wurden über eine 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF Membran gebロットet. GFP- und Myc-spezifische Antikörper oder iso-3 pAb Antikörper wurden mit der Membran inkubiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit einem sekundären α -Maus- bzw. α -Kaninchen Peroxidase-gekoppelten Antikörper und anschließender Chemilumineszenz.

3. Verteilung des MACF1 Isoform-3 Proteins in Geweben und Zelllinien.

Die Spektraplakine MACF1, Bpag1 und Shot werden in mehreren Isoformen mit unterschiedlichen N-Termini exprimiert. Für die Proteine Bpag1 und Shot wurde gezeigt, dass der isoformspezifische N-Terminus die subzelluläre und die Lokalisation in Geweben determiniert (Yang *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000). Im Folgenden wurde evaluiert, ob das MACF1 Isoform-3 Protein ebenfalls gewebespezifisch exprimiert wird und eine definierte isoformspezifische Verteilung innerhalb der Zelle aufweist. Dafür wurde zunächst das Expressionsprofil der MACF1 Isoform-3 Transkripte in verschiedenen Mausgeweben mittels semi-quantitativer PCR analysiert. Daran anknüpfend wurde die Proteinexpression in einer Immunoblotanalyse an Mausgeweben evaluiert. Abschließend wurde die subzelluläre Verteilung des Proteins in verschiedenen Gewebeschnitten und Zelllinien in der indirekten Immunfluoreszenz untersucht.

3.1.1. RT-PCR Analyse der MACF1 Isoform-3 Expression in diversen Geweben.

Eine semi-quantitative PCR Analyse wurde an RNA aus verschiedenen Mausgeweben mit Hilfe von Isoform-3 spezifischen Primern durchgeführt. Wie in Abb. 3.1.1. zu sehen ist, wird das MACF1 Isoform-3 Transkript in allen untersuchten Geweben exprimiert. Die stärkste Expression ist jedoch im Gehirn, der Lunge und in Niere zu erkennen.

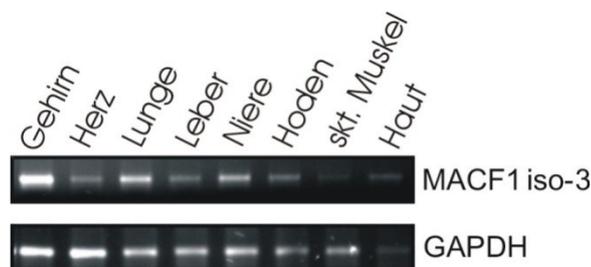


Abb. 3.1.1: RT-PCR Analyse der Expression von MACF1 Isoform-3 in verschiedenen Mausgeweben.

Die murine MACF1 Isoform-3 mRNA wird ubiquitär in verschiedenen Geweben exprimiert. Mit Hilfe MACF1 Isoform-3 spezifischer Primer können MACF1 Transkripte in verschiedenen Mausgeweben nachgewiesen werden. Als Ladekontrolle wurden spezifische Primer in der RT-PCR eingesetzt, die das ubiquitär exprimierte GAPDH Transkript nachweisen. Die amplifizierte DNA wurde elektrophoretisch auf einem 1%igem Agarosegel aufgetrennt und durch Zugabe von Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

3.1.2. Das MACF1 Isoform-3 Protein wird ubiquitär in Geweben exprimiert.

Zusätzlich zur RT-PCR Analyse wurden Proteinlysate verschiedener Mausgewebe hergestellt und in einem Immunoblot analysiert. Da die in unserem Labor hergestellten Gewebelysate der Haut nicht genügend Material für die Westernblotanalyse lieferten (Abb. 3.1.2. rechter Immunoblot), wurden Gewebelysate der Haut separat analysiert, wobei Zelllysate von humanen Keratinozytenzellen (HaCaT) als Kontrolle dienen. Die Immunoblotanalyse mit den iso-3 pAb Antikörpern ergibt in allen Geweben Sig-

nale für die MACF1 Isoform-3, wobei die stärkste Expression im Gehirn gefunden wird. In dem Gewe-beimmunoblot wird ein komplexes Bandenmuster mit iso-3 pAb detektiert. So befindet sich in den meisten Geweben eine 75 kDa, 100 kDa und 250 kDa große Bande. In Gehirn und Haut kann zusätzlich noch eine Bande im hochmolekularen Bereich detektiert werden (Abb. 3.1.2., Sterne). Während in der Literatur nur die 620 kDa große Isoform des MACF1 Isoform-3 Proteins beschrieben ist (siehe Abb. 3.1.2), wurden in der vorliegenden Arbeit weitere kleine Isoformen detektiert. Das Vorliegen diverser Isoformen ist auch für andere Proteine (z.B. Nesprine) mit derart hohem Molekulargewicht bekannt (Ziam, 2006; Kandert *et al.*, 2007). Als Ladekontrolle wurde am Immunoblot das Protein Tubulin nach-gewiesen, das in den Geweben unterschiedlich stark exprimiert wird, weshalb eine größere Variation der Tubulinproteinmenge sichtbar ist.

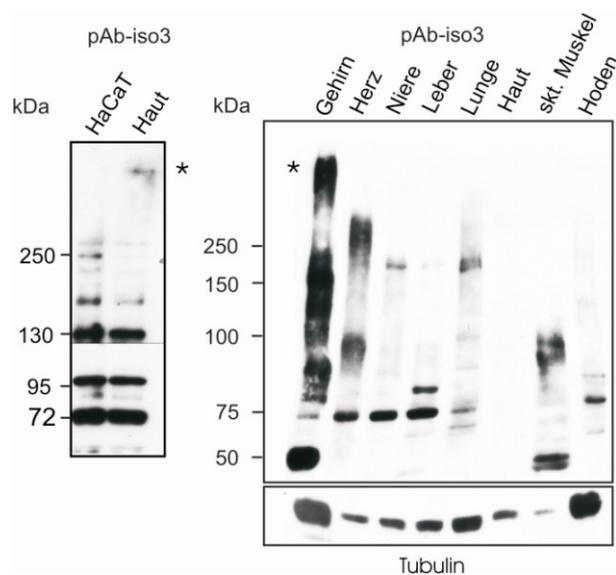


Abb. 3.1.2.: Immunoblotanalyse der MACF1 Isoform-3 Expression in verschiedenen murinen Geweben.

Das endogene MACF1 Isoform-3 Protein wird ubiquitär in verschiedenen murinen Geweben (linker Immunoblot) und in humanen Keratinozyten (HaCaT) Zellen (rechter Immunoblot) exprimiert. Verschiedene mit dem iso-3 pAb Antikörper reaktive Banden sind in den Geweben nachweisbar. Weiterhin wird in der Haut und im Gehirn im hochmolekularen Bereich eine Bande detektiert (Stern). Gleiche Mengen der homogenisierten Mausgewebe wurden auf einem 3-15% Gradientengel elektrophoretisch aufgetrennt, auf PVDF Membran geblotet und mit dem iso-3 pAb Antikörper inkubiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit einem sekundären α -Kaninchen Peroxidase-gekoppelten Antikörper und anschließender Chemilumineszenz. Linker Immunoblot: der obere Teil weist eine kurze Expositionszeit, der untere Teil eine höhere Expositionszeit auf.

3.2. Die MACF1 Isoform-3 Lokalisation in Mausgeweben und Zelllinien.

Für die Aufklärung der zellulären Funktionen des MACF1 Isoform-3 Proteins wurden Kryoschnitte von Mausgeweben und verschiedene Zelllinien analysiert. Neben der subzellulären Verteilung des MACF1 Isoform-3 Proteins sollte erörtert werden, inwieweit die Lokalisation des Proteins Unterschiede in Geweben und Zelllinien aufweist. Da in den Gewebelysaten der Haut und im Gehirn die große Isoform (~620 kDa) detektiert wird, wurden diese beiden Gewebetypen ausgewählt, um mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz die subzelluläre Lokalisation von MACF1 Isoform-3 näher zu examinieren. Des Weiteren sollten hierdurch eine geeignete Zelllinie für weiterführende Experimente ermittelt werden, so dass die Funktion und neue Bindungspartner des MACF1 Isoform-3 Proteins ermittelt werden können.

3.2.1. MACF1 Isoform-3 Lokalisation in der Haut, primären Keratinozyten und Fibroblasten.

Im Folgenden wurde die Verteilung des MACF1 Isoform-3 Proteins in der murinen Haut immunohistochemisch untersucht. Hier wurde β -Catenin als Marker für Zell-Zell-Kontakte verwendet. β -Catenin ist ein Protein das verschiedene, möglicherweise voneinander unabhängige, Funktionen innerhalb der Zelle besitzt (Übersicht in Clevers *et al.*, 2006; Nelson *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2008).

Die durchgeführte indirekte Immunfluoreszenzanalyse zeigt Unterschiede in der Lokalisation des MACF1 Isoform-3 Proteins in der Dermis und der Epidermis auf. Während in der Epidermis das Protein um den Zellkern lokalisiert und an Zell-Zell-Kontakten zu finden ist (Abb. 3.2.1. A-A' Pfeile), kann das Protein in der Dermis im Zytoplasma und in den Zellkernen detektiert werden (Abb. 3.2.1. A-A'', Ausschnitt Vergrößerung). Um die subzelluläre Verteilung der MACF1 Isoform-3 näher zu betrachten, wurden aus der Haut von neugeborenen Mäusen primäre Keratinozyten und Fibroblasten isoliert und in der indirekten Immunfluoreszenz untersucht. Für die Kultivierung der primären Keratinozyten wurden dem Nährmedium die Calcium-Ionen entzogen, um so ihre Differenzierung zu unterbinden (siehe Material und Methoden). Wie in Abbildung 3.2.1. B zu beobachten ist, lokalisiert das MACF1 Isoform-3 Protein in einer netzartigen, filamentösen Struktur im Zytoplasma. Zusätzlich wird das Protein innerhalb des Zellkerns und entlang der Kernmembran verstärkt nachweisbar, wobei es an der Kernmembran mit β -Catenin kolokalisiert. In der Epidermis der Haut differenzieren die Keratinozyten und bilden dadurch ihre Zell-Zell-Kontakte aus. Für die Analyse der Isoform-3 Verteilung in differenzierten Zellen wurden die primären Keratinozyten durch Zugabe von 2 mM Calcium-Ionen über Nacht differenziert. Dadurch verändert sich die Lokalisation des MACF1 Isoform-3 Proteins. Dies lokalisiert nun diffus im Zytoplasma und akkumuliert an den Zell-Zell-Kontakten (Abb. 3.2.1. C, Pfeile) wie es auch in der Epidermis der Hautschnitte zu beobachten ist (Abb. 3.2.1. A-A'').

Isolierte primäre Fibroblasten weisen eine auffällige nukleäre Lokalisation des MACF1 Isoform-3 Proteins auf. Des Weiteren kann die Präsenz der MACF1 Isoform-3 entlang der Kernmembran beobachtet werden (Abb. 3.2.1. D-D', Pfeile). Im Zytoplasma lokalisiert das Protein in filamentösen Strukturen (Abb. 3.2.1. D-D'). In mitotischen Zellen konnte zudem beobachtet werden, dass MACF1 Isoform-3 an den Spindelpolen und entlang kondensierter Chromosomen lokalisiert. Diese wurden durch das Anfärben des Histon 1 Proteins visualisiert (Abb. 3.2.1. E). Diese ersten Studien zeigen, dass das MACF1 Isoform-3 Protein eine ungewöhnliche nukleäre Lokalisation aufweist, die bisher noch nicht für die MACF1 Spektrallakine beschrieben wurde.

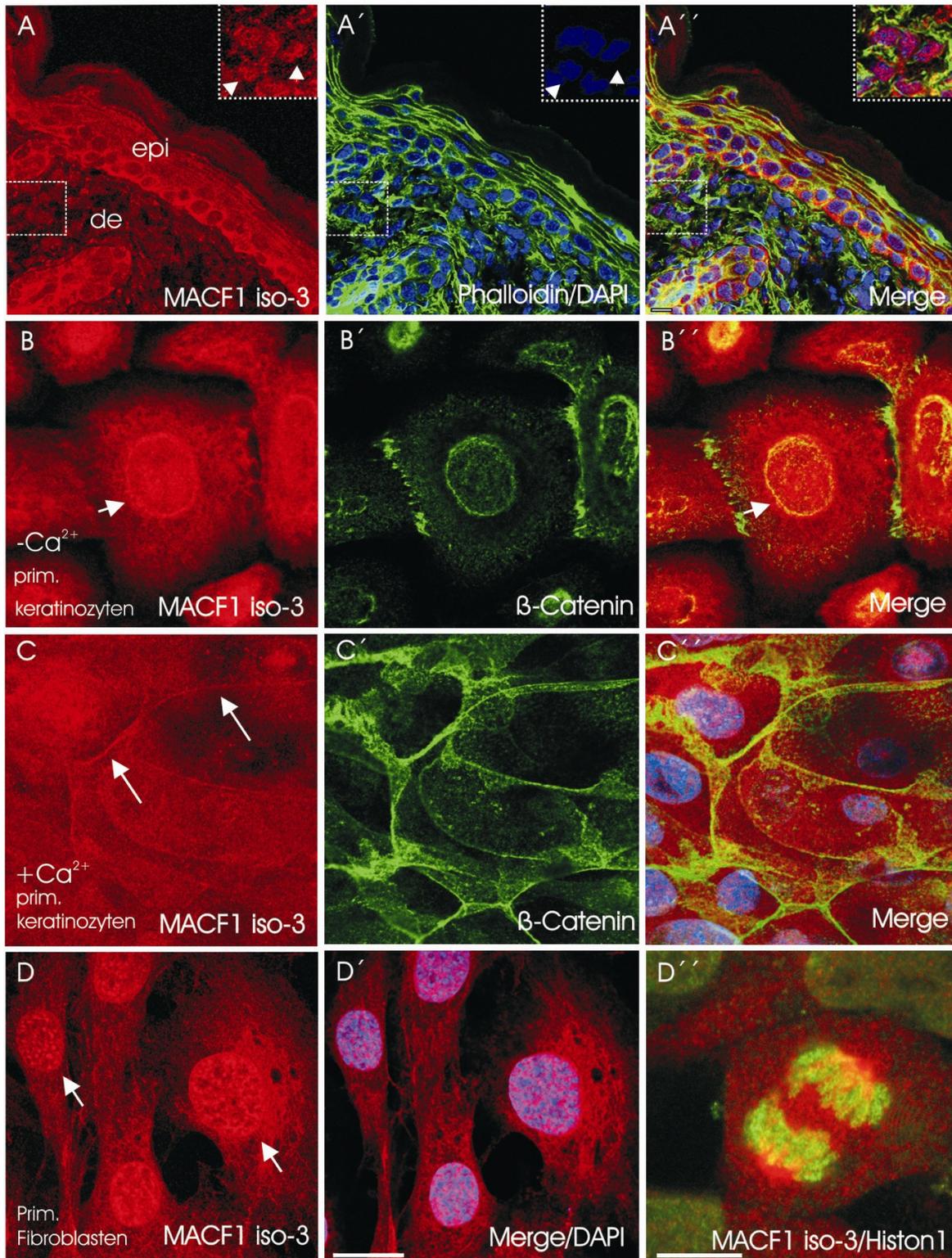


Abb. 3.2.1.: Immunfluoreszenzanalyse der MACF1 Isoform-3 Verteilung in der Haut und primären Zellkulturen.

MACF1 Isoform-3 wird in der Dermis und Epidermis der murinen Haut exprimiert (A-A''). Primäre murine Keratinozyten wurden mit 0.15mM (B-B'') oder in 2mM (C-C'') Ca^{2+} -haltigem Medium kultiviert. Durch die Zugabe der Ca^{2+} -Ionen lokalisiert MACF1 Isoform-3 an den Zell-Zell-Kontakten (C). In primären murinen Fibroblasten (D-E) lokalisiert MACF1 Isoform-3 prominent im Zellkern (D-D''), an den Spindelpolen sowie entlang kondensierter Chromosomen (E). Kryoschnitte der Haut (A-A'') wurden mit 3%igem PFA fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde durch FITC-gekoppeltes Phalloidin visualisiert. MACF1 Isoform-3 wurde durch den iso-3 pAb detektiert und, wie auch in den anderen Färbungen in dieser Abbildung, durch den α -Kaninchen (AF 568) Alexa Fluor-gekoppelten Antikörpern visualisiert. Primäre Keratinozyten (B-B'' und C-C'') und Fibroblasten (D-D'', E) wurden mit MeOH fixiert und in einer Doppelfärbung mit β -Catenin (B, C), Histon 1 (E)-spezifischen und MACF1 iso-3 pAb Antikörpern inkubiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit einem sekundären α -Maus- (AF 488) bzw. α -Kaninchen (AF 568) Alexa Fluor-gekoppelten Antikörpern. Die Zellkerne wurden durch den DAPI Farbstoff visualisiert. Balken: 10 μm .

3.2.2. Die subzelluläre Lokalisierung von MACF1 Isoform-3 in HaCaT Zellen.

Aufgrund der MACF1 Isoform-3 Expression in Epithelzellen wurde hier die subzelluläre Verteilung des Proteins in Methanol-fixierten humanen Keratinozyten Zelllinie (HaCaT) examiniert (Abb. 3.2.2. A-A''). Durch diese Fixierungsmethode wird ein intaktes Mikrotubuli-Zytoskelett gewährleistet. Dabei ist eine Lokalisation von filamentösen MACF1 Isoform-3 positiven Strukturen entlang der Mikrotubuli erkennbar (Abb. 3.2.2. A-A'' Vergrößerung). Des Weiteren kolokalisieren MACF1 Isoform-3 mit dem Zell-Zell-Kontakt Protein E-Cadherin (Abb. 3.2.2. B-B''). Darüberhinaus lokalisiert MACF1 Isoform-3 im Zellkern und mit dem Kernmembran-assoziierten Nesprin-2 Protein (Abb. 3.2.2. C-C'') in HaCaT Zellen.

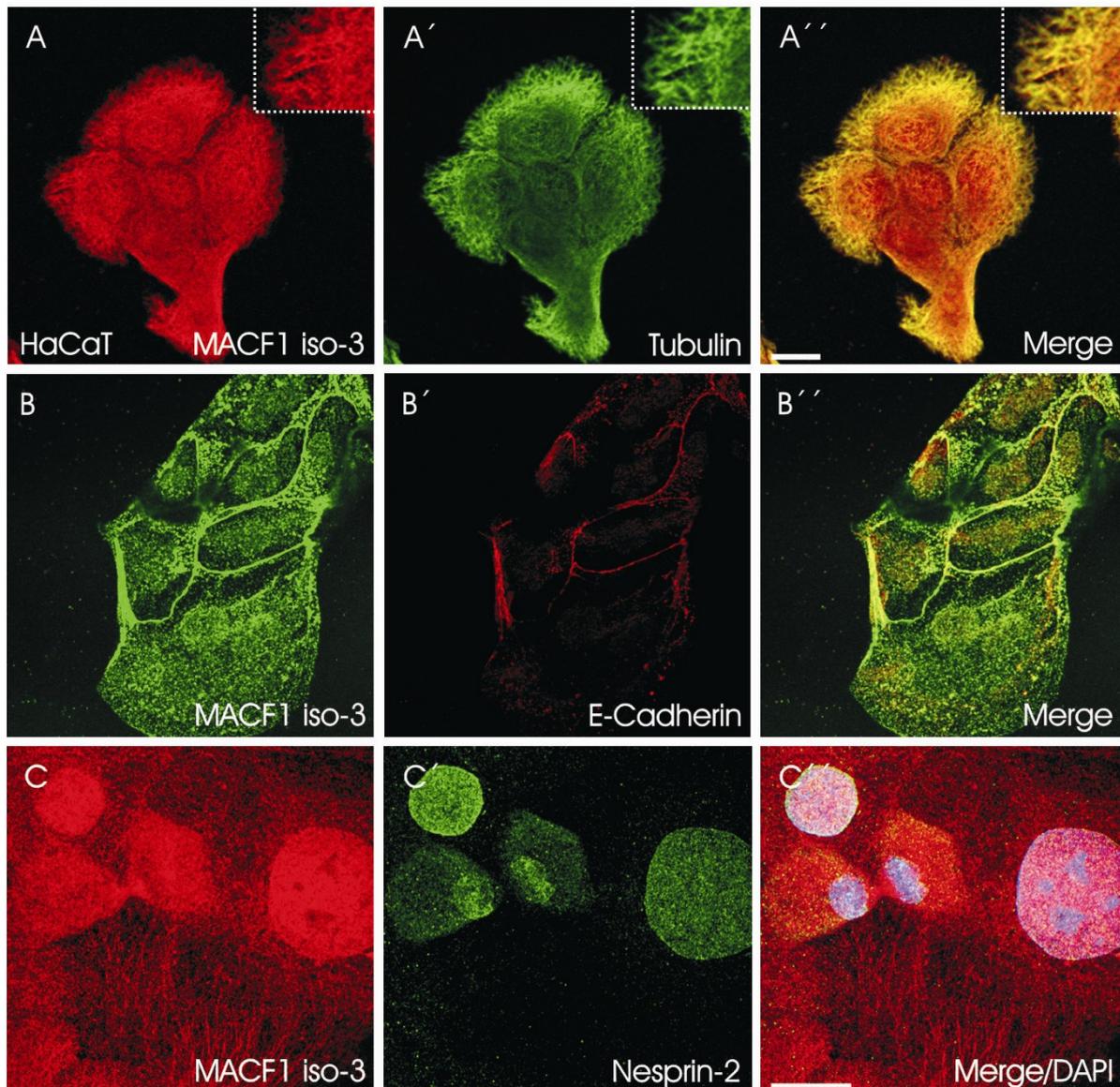


Abb. 3.2.2.: Immunfluoreszenzanalyse der MACF1 Isoform-3 Verteilung in HaCaT Zellen.

In HaCaT Zellen dekoriert MACF1 Isoform-3 Mikrotubulifilamente (A-A''). Weiterhin lokalisiert das Protein an Zell-Zell-Kontakten (B-B'') sowie entlang des Zellkerns und im Zytoplasma (C-C''). HaCaT Zellen wurden mit MeOH fixiert und in einer Doppelfärbung mit β -Tubulin (WA3) (A), E-Cadherin (B) oder Nesprin-2 (mAk K20-478-4) (C) und MACF1 iso-3 pAb-spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit einem sekundären α -Maus- (AF 488) bzw. α -Kaninchen (AF 568) Alexa Fluor-gekoppelten Antikörpern. Balken: 10 μ m.

3.2.3. Immunohistochemische Analyse der MACF1 Isoform-3 im Cerebellum.

In der durchgeführten Immunoblotanalyse (Abb. 3.1.2.) sowie der RT-PCR Analyse (Abb. 3.1.1.) konnte eine starke Expression des MACF1 Isoform-3 Proteins im Gehirn nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde die Verteilung des Proteins in murinen Kleinhirn Kryoschnitten untersucht. MACF1 Isoform-3 wird deutlich im Stratum granulosum und Stratum moleculare exprimiert (Abb. 3.2.3. A-A'). Im Stratum moleculare lokalisiert MACF1 Isoform-3 an der Kernmembran der Zellen (Abb. 2.2.3. A'-A'', Pfeile Vergrößerung,) und in Filament-artigen Strukturen (Abb. 2.2.3. A'-A'', Pfeilspitzen).

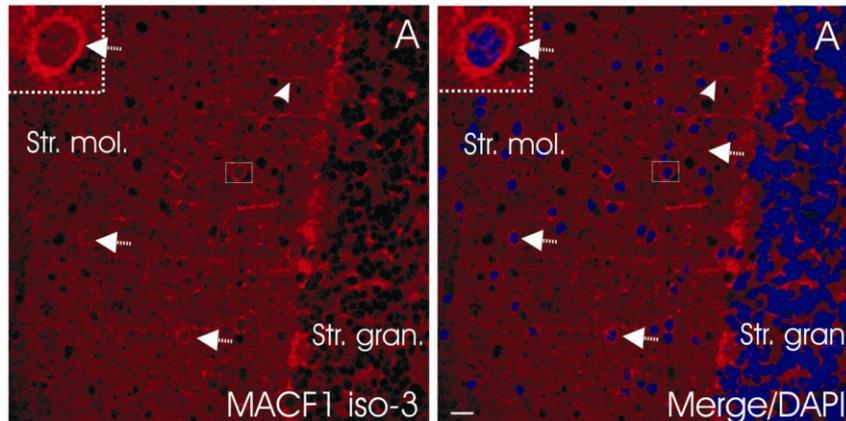


Abb. 3.2.3.: Immunfluoreszenzanalyse des MACF1 Isoform-3 Proteins im Cerebellum.

MACF1 Isoform-3 wird im murinen Cerebellum im Stratum granulosum (Str. gran.) und Stratum moleculare (Str. mol.) exprimiert (A-A'). Im Stratum moleculare lokalisiert MACF1 Isoform-3 entlang der Zellkerne (A-A'). Die Pfeile deuten auf die MACF1 Isoform-3 Lokalisation entlang der Zellkerne hin. Durch die Pfeilspitzen werden die Filament-artigen Strukturen von MACF1 Isoform-3 im Stratum moleculare gekennzeichnet.

Kleinhirngewebeschnitte wurden mit MeOH fixiert und mit den MACF1 iso-3pAb Antikörpern inkubiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit einem sekundären α -Kaninchen (AF 568) Alexa Fluor-gekoppelten Antikörpern. Die Zellkerne wurden mit DAPI visualisiert. Balken: 10 μ m. Die Gewebeschnitte wurden von Paul Shazot, *University of Durham*, U.K. zur Verfügung gestellt.

3.2.4. Immunohistochemische Analyse der MACF1 Isoform-3 an der neuromuskulären Endplatte in Muskelgewebe.

Das MACF1 Ortholog in *Drosophila* Shot lokalisiert an der neuromuskulären/motorischen Endplatte. Es wurde gezeigt, dass durch Mutationen im Shot Gen sensorische- und motorische Neuronen nicht mehr in der Lage sind gerichtet auszuwachsen, wodurch kleinere motorische Endplatten entstehen (Prokop *et al.*, 1998, Lee *et al.*, 2000). Die neuromuskuläre Endplatte (myoneurale Synapse) stellt die Endigung einer somatomotorischen Nervenfasern zur Skelettmuskulatur dar und dient der Innervation der Muskulatur. Es handelt sich um eine spezialisierte chemische Synapse, über die Neuronen mit Muskelzellen verschaltet werden. Als Marker für die motorischen Endplatten wurde das Protein Synaptophysin angefärbt. Dieses ist ein integrales Vesikelmembranprotein in adulten Neuronen und korreliert mit der neuronalen Reifung. In der folgenden immunohistochemischen Analyse wurde geprüft, ob die MACF1 Isoform-3 wie das homologe Shot Protein an den motorischen Endplatten im Muskelgewebe vorhanden ist. In der Abbildung 3.2.5. ist die endogene Verteilung MACF1 Isoform-3 in der Skelettmuskulatur dargestellt. MACF1 Isoform-3 zeigt in diesem Gewebe eine diffuse Verteilung und akkumuliert an der neuro-

muskulären Endplatte, wo es mit Synaptophysin kolokalisiert (Abb. 3.2.5. A-A', Pfeile). Unterhalb der motorischen Endplatte liegen drei eng benachbarte Zellkerne, an denen eine MACF1 Isoform-3 Lokalisation entlang der Zellkerne zu erkennen ist (Abb. 3.2.5. A-A'' Vergrößerung und Pfeilspitzen). Diese Ergebnisse zeigen, dass die MACF1 Isoform-3 Lokalisation an der Kernmembran nicht gewebespezifisch ist.

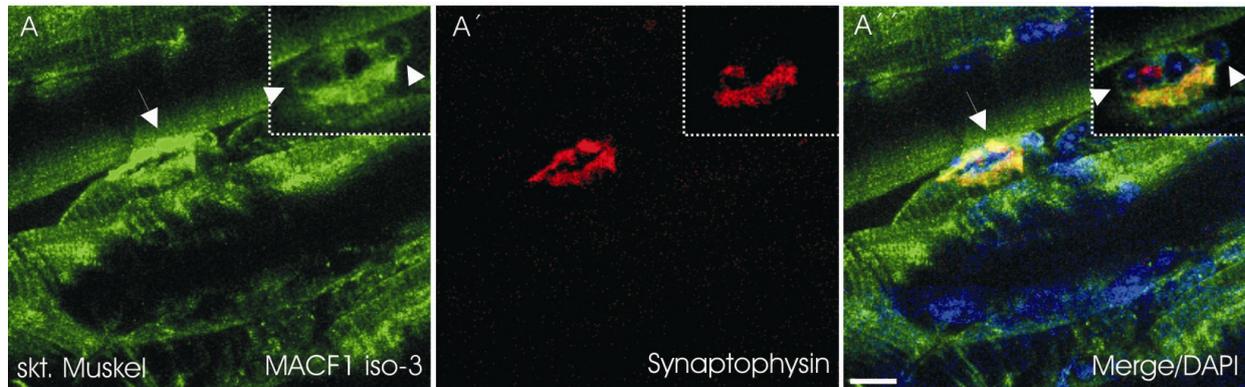


Abb. 3.2.4.: Immunfluoreszenzanalyse der endogenen MACF1 Isoform-3 Verteilung an der motorischen Endplatte.

In der myoneurale Synapse der Skelettmuskulatur kolokalisiert MACF1 Isoform-3 mit Synaptophysin und wird des Weiteren entlang der darunterliegenden Zellkerne detektiert. Pfeile deuten auf die MACF1 Isoform-3 Verteilung an der motorischen Endplatte. Die Pfeilspitzen in der Vergrößerung verweisen auf die MACF1 Isoform-3 Lokalisation entlang der Zellkerne.

Das Gewebepräparat wurde mit 3%igem PFA fixiert und in einer Doppelfärbung mit Synaptophysin-spezifischen und MACF1 iso-3 pAb Antikörpern inkubiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit einem sekundären α -Maus- (AF 568) bzw. α -Kaninchen (AF 488) Alexa Fluor-gekoppelten Antikörpern. Die Zellkerne wurden durch DAPI-Farbstoffe visualisiert. Das Gewebepräparat und die anschließende Immunfärbung wurde von Fiona Shenton hergestellt. Balken: 10 μ m.

3.2.5. Lokalisation des endogenen MACF1 Isoform-3 Proteins in Glioma C6 Zellen.

In den Kleinhirngewebeschnitten (Abb. 3.2.3. B-B') sowie in anderen Bereichen des Gehirns (nicht gezeigt) wies das MACF1 Isoform-3 Protein eine ungewöhnlich deutliche ringförmige Lokalisation entlang der Zellkerne auf. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde auf zellbiologischer Ebene die Lokalisation des MACF1 Isoform-3 Proteins in einer Zelllinie neuronalen Ursprungs (Ratten Glioblastoma Zelllinie Glioma C6) in der indirekten Immunfluoreszenz untersucht. In diesen Zellen kann die Präsenz der MACF1 Isoform-3 entlang der Kernmembran ebenfalls beobachtet werden (Abb. 3.2.4. A, B und C). Zusätzlich wird MACF1 Isoform-3 im Zellkern detektiert (Abb. 3.2.4. A-A'). Des Weiteren wurden MACF1-positive zytoplasmatische Strukturen ersichtlich, die mit dem Golgimarkerprotein GM130 kolokalisieren (Abb. 3.2.4. A-A'', Pfeile). Die Präsenz des MACF1 Isoform-3 am Golgi ist ein weiteres Indiz für die Antikörperspezifität. Es ist bereits bekannt, dass MACF1 indirekt über das Protein Golgin-245 (Kakinuma *et al.*, 2004) oder direkt über die Plakindomäne (Lin *et al.*, 2005) mit dem Golgi Apparat interagieren kann.

MACF1 Isoform-3 dekoriert die Mikrotubulifilamente im Zytoplasma (Abb. 3.2.4. B-B'' Pfeil) und überlagert prominent mit diesen entlang der äußeren Kernhülle (Abb. 3.2.4. B''). Weiterhin lokalisiert MACF1 Isoform-3 am Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (MTOC) (Abb. 3.2.4. B-B'', Pfeilspitze). Um die beobachtete MACF1 Isoform-3 Verteilung an der Kernmembran eingehender zu examinieren,

wurde in Abbildung 3.2.4. C-C'' ein Glioma C6 Zellkern vergrößert dargestellt. Hier lokalisiert MACF1 Isoform-3 mit dem Kernmembran-assoziierten Nesprin-2 Protein (Abb. 3.2.4. C''). Auf der Zellkernoberfläche überlagern die Färbungen partiell und zusätzlich lokalisiert MACF1 Isoform-3 an einer Stelle an der Kernhülle (Abb. 3.2.4. C-C'', Pfeil). Da das MACF1 Isoform-3 Protein eine prominente Verteilung entlang der Kernhülle und im Zellkern in der Glioma C6 Zelllinie aufweist, wurde diese Zelllinie für weitere biochemische und zellbiologische Analysen verwendet.

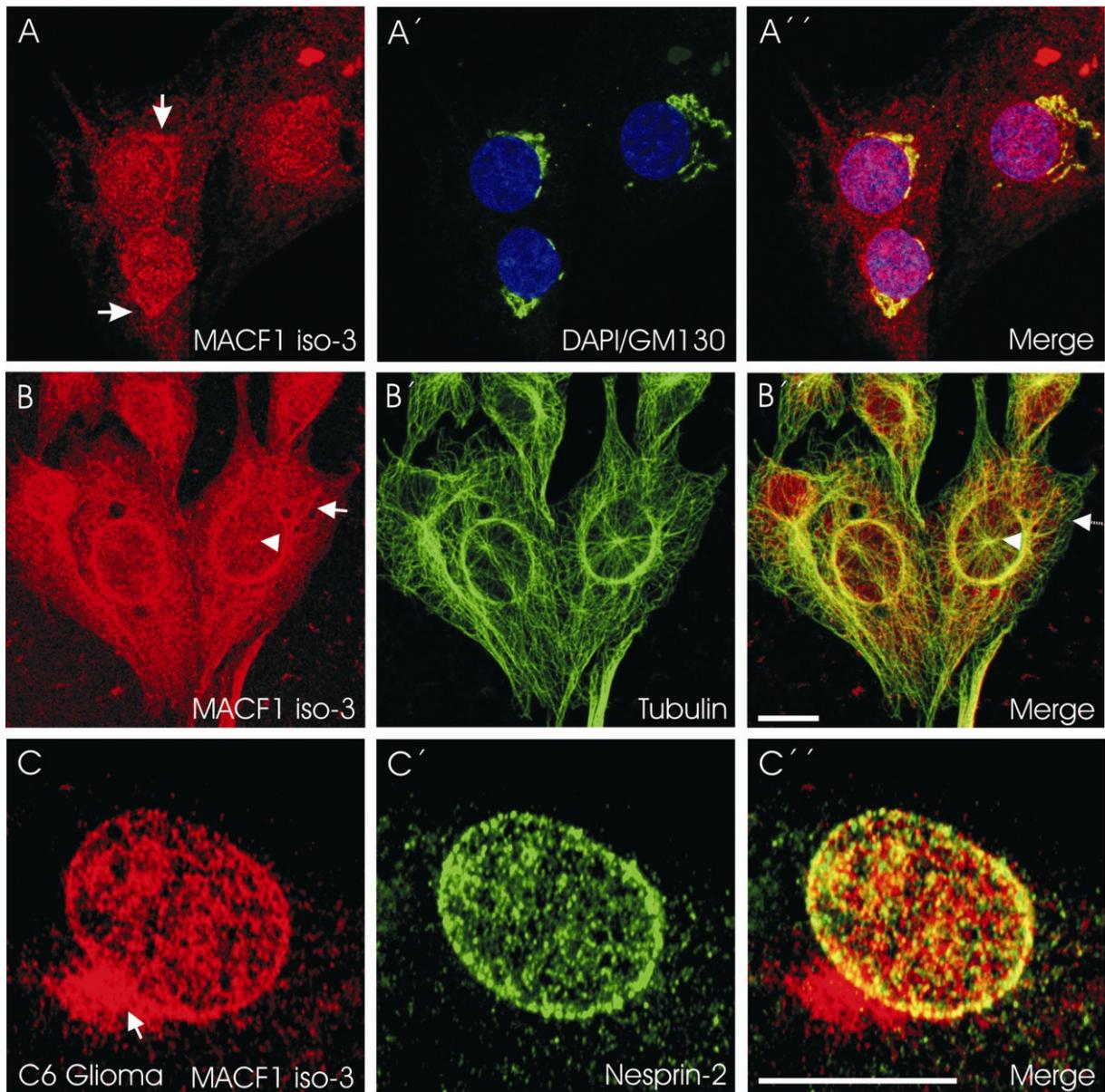


Abb. 3.2.5.: Immunfluoreszenzanalyse der endogenen MACF1 Isoform-3 Lokalisation in Glioma C6 Zellen.

In Glioma C6 Zellen lokalisiert MACF1 Isoform-3 an dem Golgi-Apparat (A-A''), dekoriert MT-Filamente entlang des Zellkerns, im Zytoplasma (B-B'') und kolokalisiert mit Nesprin-2 an der äußeren Kernhülle (C-C''). Glioma C6 Zellen wurden mit MeOH fixiert und in einer Doppelfärbung mit dem Golgiprotein GM130 (A), β -Tubulin (WA3) (B), Nesprin-2 (mAk K20-478-4) (C) und MACF1 iso-3 pAb spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit einem sekundären α -Maus- (AF 488) bzw. α -Kaninchen (AF 568) Alexa Fluor-gekoppelten Antikörpern. Balken: 10 μ m.

3.3. Das MACF1 Isoform-3 Protein kolokalisiert mit Mikrotubuli- und nicht mit Aktinfilamenten in Glioma C6 und COS7 Zellen.

In den folgenden Experimenten wurde die Funktionalität der unvollständigen Aktin-bindenden Domäne (ABD) und die Mikrotubuli-bindende Domäne (MTBD) des MACF1 Isoform-3 Proteins validiert, da bisher keine Daten diesbezüglich für die MACF1 Isoform-3 vorliegen. Zum Einen wurde überprüft, ob die MACF1 Isoform-3 an filamentöses Aktin (F-Aktin) binden kann, denn die vorhandene CH2 weist eine signifikant geringere Affinität zu F-Aktin als die fehlende CH1 Domäne auf (Winder *et al.*, 1995). Des Weiteren wird für eine effektive F-Aktin Assoziation das Zusammenspiel beider Domänen benötigt (Winder *et al.*, 1995).

Zum Anderen wurde das Vorhandensein der MTBD überprüft. Dies ist essentiell, da bisher die MACF1 Isoform-3 noch nicht vollständig sequenziert wurde. Es wird vermutet, dass alle MACF1 Isoformen den gleichen C-Terminus aufweisen, da keine alternativen Spleißstellen in der genomischen Sequenz der verschiedenen Isoformen gefunden wurden. Durch den Nachweis einer funktionierenden MTBD würde ein konkreter Hinweis für diese Annahme erbracht werden. Aus diesen Gründen wurden Glioma C6 Zellen mit Mikrotubuli-destabilisierenden oder Aktin-destabilisierenden Drogen inkubiert und die subzelluläre Verteilung des MACF1 Isoform-3 Proteins in der indirekten Immunfluoreszenz untersucht.

3.3.1. MACF1 Isoform-3 lokalisiert nicht mit Aktinfilamenten in Glioma C6 Zellen.

Im folgenden Experiment wurde unter Verwendung von Latrunkulin B überprüft, ob die CH2 Domäne der MACF1 Isoform-3 für eine Assoziation mit Aktinfilamenten hinreichend ist. Latrunkulin B, wirkt inhibierend auf die Aktin-Polymerisation und zerstört bestehende Aktinfilamente. Dadurch werden Mikrofilament-abhängige Zellprozesse gehemmt (Spector *et al.*, 1989). Glioma C6 Zellen wurden für eine Stunde mit 12 μ M Latrunkulin B inkubiert. Die Abbildung 3.3.1. A-A'' zeigt die subzelluläre Verteilung von MACF1 Isoform-3 in dem intakten Aktin-Zytoskelett. Eine Überlagerung der beiden Proteine kann nicht beobachtet werden. Durch die Einwirkung von Latrunkulin B wird bis auf wenige Filamente (Abb. 3.3.1. B') das Aktin-Netzwerk zerstört. Die filamentöse Verteilung der MACF1 Isoform-3 im Zytoplasma wird durch die Wirkung von Latrunkulin B jedoch nicht beeinflusst. (Abb. 3.3.1. B'', Pfeile). Darüberhinaus wird keine Überlagerung mit den verbleibenden Aktinfilamenten beobachtet (Abb. 3.3.1. B'', Pfeilspitzen). Die subzelluläre Verteilung von MACF1 Isoform-3 in Latrunkulin B-behandelten Zellen lässt die Schlussfolgerung zu, dass MACF1 Isoform-3 nicht mit Aktinfilamenten assoziieren kann und deutet auf eine funktionsunfähige ABD hin.

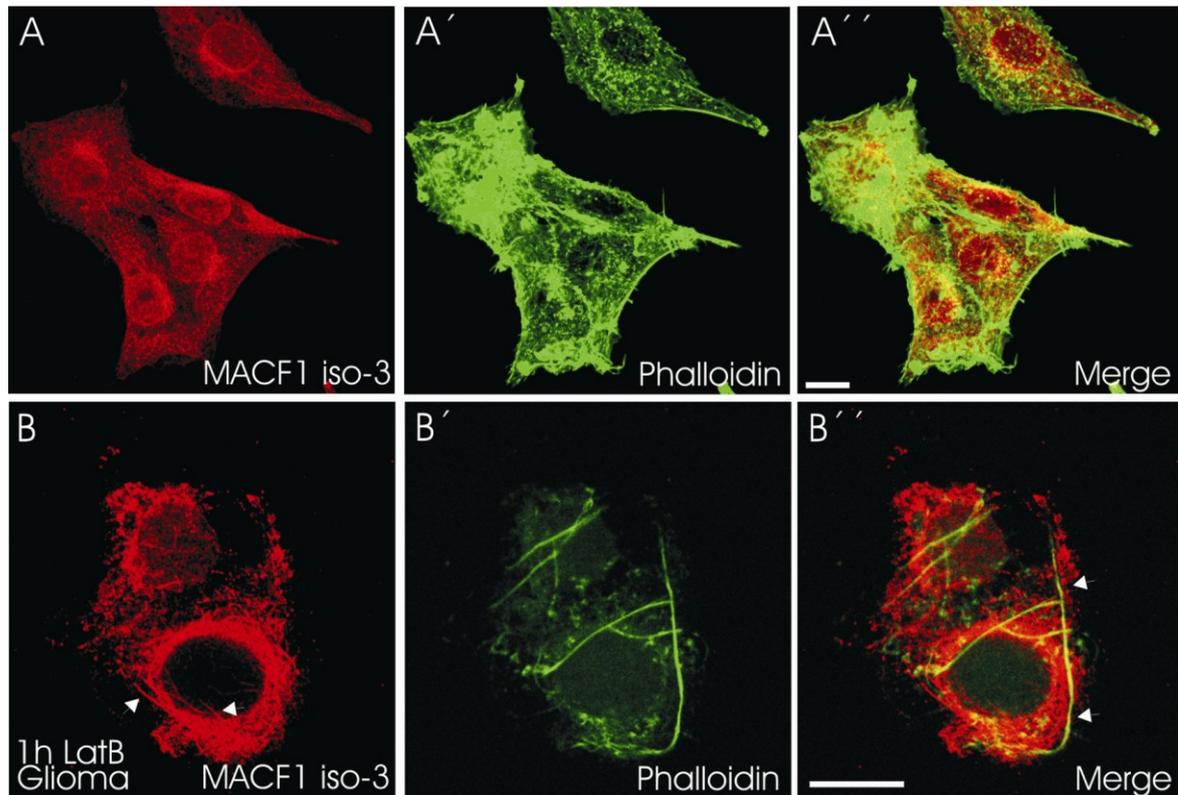


Abb. 3.3.1.: Immunfluoreszenzanalyse der MACF1 Isoform-3 Lokalisation in Latrunkulin B-behandelten Glioma C6 Zellen. In Glioma C6 Zellen lokalisiert MACF1 Isoform-3 entlang des Zellkerns und in filamentösen Strukturen im Zytoplasma und weist keine Überlagerung mit dem Aktin-Zytoskelett auf (A-A''). Durch die Einwirkung der Aktin-depolymerisierenden Substanz (Latrunkulin B) wird MACF1 Isoform-3 nicht in seiner subzellulären Lokalisation beeinträchtigt (B-B''). Pfeilspitzen deuten auf die filamentöse Verteilung von MACF1 Isoform-3 in Latrunkulin B-behandelten Zellen hin. Die Pfeile zeigen auf die verbleibenden Aktinfilamente in Latrunkulin B-behandelten Zellen. Glioma C6 Zellen wurden für eine Stunde mit 12µM Latrunkulin B inkubiert und anschließend für 10 Sekunden mit Triton X-100 (0.1%) behandelt und dreimal mit PBS gewaschen um ungebundene Proteine auszuwaschen. Anschließend wurden die Latrunkulin B-behandelten und unbehandelten Zellen mit 3%igem PFA fixiert und mit dem iso-3 pAb Antikörper inkubiert. Dieser wurde durch die sekundären α -Kaninchen Antikörper Alexa Fluor 568 visualisiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde durch FITC-gekoppeltes Phalloidin angefärbt. Balken: 10 µm.

3.3.2. MACF1 Isoform-3 lokalisiert mit Mikrotubulifilamenten in Glioma C6 Zellen.

Um zu prüfen, ob MACF1 Isoform-3 die Fähigkeit besitzt mit Mikrotubulifilamenten (MT) zu assoziieren, wurden Glioma C6 Zellen mit dem Mikrotubuli-destabilisierenden Reagenz Colchizin inkubiert. Seine Wirkung beruht auf der Bindung an die Mikrotubuli-Untereinheiten, wodurch diese nicht mehr für den Aufbau der Mikrotubulifilamente zur Verfügung stehen. Die Glioma C6 Zellen wurden mit 12.5µM Colchizin für 30 Minuten behandelt. In Kontrollzellen lokalisiert MACF1 Isoform-3 im Zytoplasma entlang von Mikrotubulifilamenten (Abb. 3.3.2. A-A'', Pfeilspitzen). In Colchizin-behandelten Zellen wird MACF1 Isoform-3 jedoch diffus im Zytoplasma detektiert (Abb. 3.3.2. B, Pfeil). An den MT-Filamenten, die von der Colchizinbehandlung unbeeinträchtigt blieben, weist MACF1 Isoform-3 eine definierte filamentöse Lokalisation auf und kolokalisiert mit den MT-Filamenten entlang des Zellkerns (Abb. 3.3.2. B-B'', Pfeilspitzen).

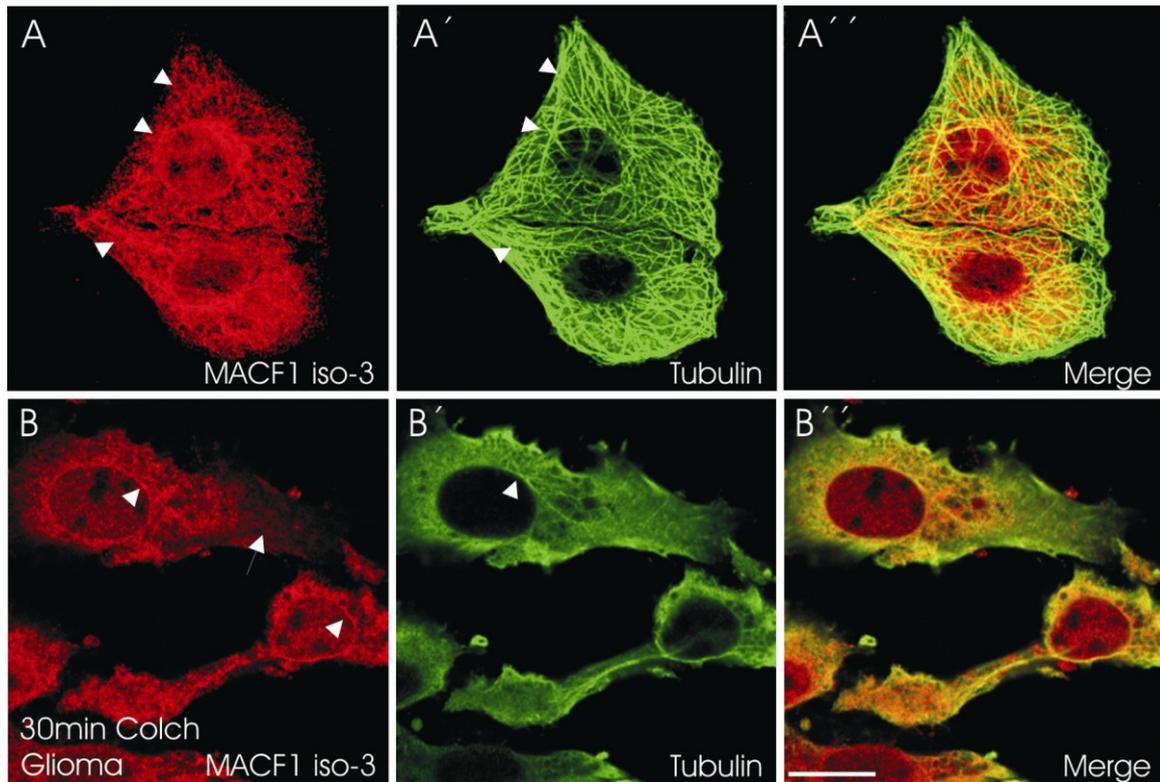


Abb. 3.3.2.: Immunfluoreszenzanalyse der MACF1 Isoform-3 Lokalisierung in Colchizin-behandelten Glioma C6 Zellen. MACF1 Isoform-3 dekoriert in Glioma C6 MT-Filamente (A-A'', Pfeilspitzen). Durch Zugabe von Colchizin wird die subzelluläre Verteilung von MACF1 Isoform-3 gestört; es lokalisiert diffus im Zytoplasma (Pfeil) und überlagert mit den noch vorhandenen MT-Filamenten (B-B'', Pfeilspitzen). Glioma C6 Zellen wurden für 30 Minuten mit 12.5µM Colchizin inkubiert und anschließend mit MeOH fixiert. In einer Doppelfärbung wurden die Zellen mit β -Tubulin (WA3) und MACF1 iso-3 pAb spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit sekundären α -Maus (AF 488) bzw. α -Kaninchen (AF 568) Alexa Fluor-gekoppelten Antikörpern. Balken: 10 µm.

3.3.3. MACF1 Isoform-3 lokalisiert mit Mikrotubulifilamenten in GFP C-Term-exprimierenden COS7 Zellen.

Da in einigen Zellen die Assoziation mit MT-Filamenten nicht eindeutig war, wurde weiterführend die Fähigkeit von MACF1 Isoform-3 an Mikrotubuli zu binden, validiert. Die für die Filamentenassoziation verantwortliche Domäne (MTBD) ist am C-Terminus der MACF1 Isoformen lokalisiert (Abb. 2.1.). Aus diesem Grunde wurde das GFP C-Term MACF1 Fusionsprotein (AS 4805-5129) (Abb. 4.1.) transient in COS7 Zellen überexprimiert. Diese Mutante kodiert für die beiden EF-Hand Domänen und die C-terminale Mikrotubuli-bindende Domäne des MACF1 Proteins (Abb. 4.1.). Durch die transiente Expression der MTBD wird das endogene Mikrotubuli-Netzwerk stabilisiert und zum Teil gebündelt (Leung, *et al.*, 1999) (Abb. 3.3.3. B-B'', Pfeile). Wenn die Isoform-3 einen C-Terminus mit dieser Domäne besitzt, sollte das endogene MACF1 Isoform-3 Protein an die stabilisierten und verstärkten Mikrotubuli binden und mit dem Fusionsprotein überlagern. Wie in Abb. 3.3.3. A-A'' zu sehen ist, lokalisiert MACF1 Isoform-3 mit dem C-Term GFP Fusionsprotein (Abb. 3.3.3. A', A'', Pfeile, Vergrößerung).

Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass die C-Term GFP Fusionsproteine die endogenen MACF1 Isoform-3 Proteine rekrutieren können. Dies impliziert, dass MACF1 Isoform-3 mit MT-Filamenten assoziieren kann.

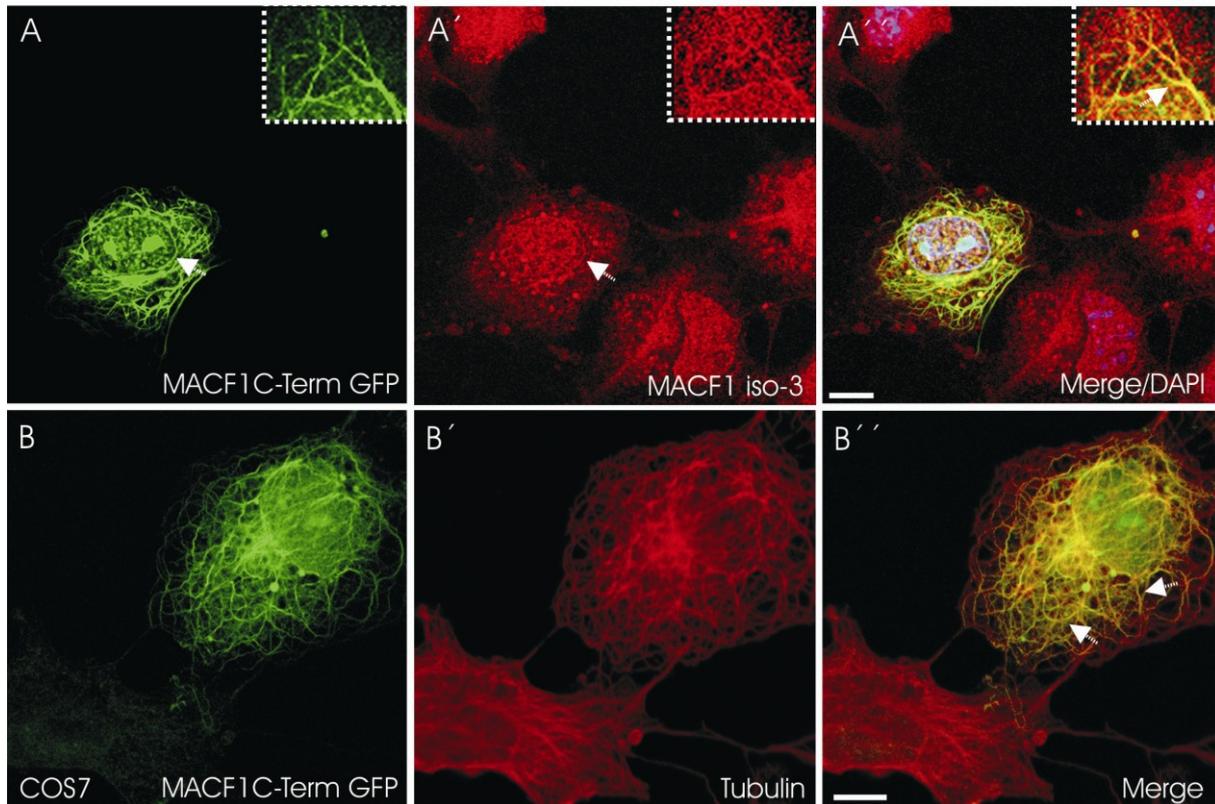


Abb. 3.3.3.: Immunfluoreszenzanalyse der endogenen MACF1 Isoform-3 Verteilung in MACF1 C-Term GFP exprimierenden COS7 Zellen.

Durch die transiente Expression von C-Term GFP MACF1 (AS 4805-5129) werden die endogenen MACF1 Isoform-3 Proteine an die GFP Fusionsproteine rekrutiert (A-A'', Pfeile). Die C-Term GFP Fusionsproteine überlagern MT-Filamente und bündeln diese (B-B''). Die C-Term GFP Fusionsproteine wurden in COS7 Zellen transient exprimiert und die Zellen mit MeOH fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit β -Tubulin (WA3) oder MACF1 Isoform-3 (iso-3 pAb) spezifischen Antikörpern angefärbt. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit sekundären α -Maus (AF 568) bzw. α -Kaninchen (AF 568) Alexa Fluor-gekoppelten Antikörpern. Balken: 10 μ m.

4. Domänenanalyse und Charakterisierung der MACF-1 Isoform-3 spezifischen Sequenzen.

Durch die transiente Expression einzelner Domänen von Proteinen können ihre Eigenschaften und Funktionen detaillierter analysiert werden. Aus diesem Grund wurden MACF1 Isoform-3-spezifische GFP-Fusionsproteine generiert (Abb. 4.1.) und analysiert.

4.1. Generierung von MACF1 Isoform-3 N-terminalen Fusionsmutanten.

In der Abbildung 4.1. sind die verwendeten MACF1 GFP-Fusionsmutanten dargestellt. GFP MACF1 iso3 kodiert für das N-terminale Segment (AS 1-330) der murinen MACF1 Isoform-3 und ist N-terminal mit dem eGFP Gen fusioniert. Die gleiche cDNA Sequenz wurde C-terminal mit dem eGFP Gen fusioniert und wird hier als MACF1 iso3 GFP bezeichnet. Für die Generierung der MACF1 Isoform-3 spezifischen Myristylierungsmutante, G2A MACF1 iso3 GFP (AS 1-330) wurde die Aminosäure Glyzin (AS

2) durch ein Alanin substituiert. Das N-terminale Glyzin ist essentiell für eine erfolgreiche Myristylierung von Proteinen, da die NMT-Transferase die Verknüpfung der Membran-ständigen Myristinsäure mit diesem N-terminalen Glyzinrest katalysiert (vgl. 1.1.).

Das MACF1 iso3-CH2 GFP Fusionsprotein (AS 1-449) kodiert für den N-Terminus und die CH2 Domäne von MACF1 Isoform-3 und wurde C-terminal mit dem eGFP Gen fusioniert. Ein weiteres Konstrukt, welches im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, ist GFP C-Term MACF1 (3.3.3.).

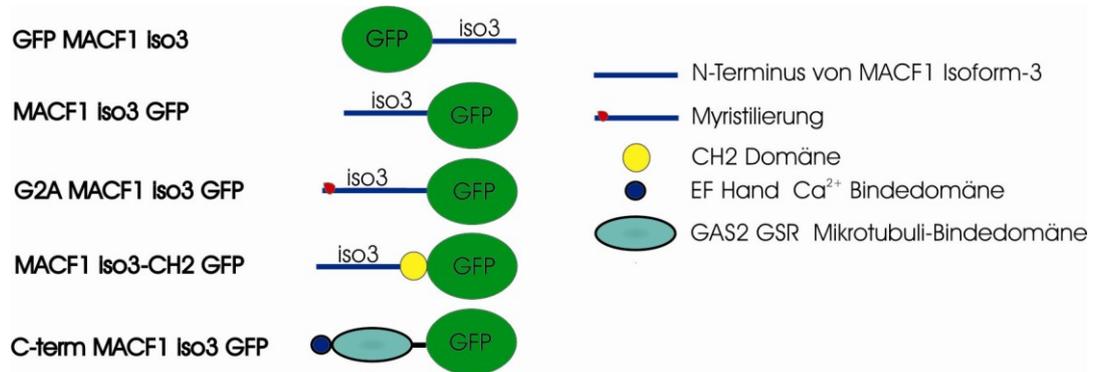


Abb. 4.1.: Schematische Darstellung der MACF1 Isoform-3 generierten GFP Fusionsmutanten.

Der murine N-Terminus von MACF1 Isoform-3 (blauer Balken:) wurde N- oder C-terminal mit dem eGFP Gen fusioniert. Der kleine rote Kreis symbolisiert die mutierte Myristylierungsstelle (Glyzin zu Alanin Punktmutation) in der Position 2 der Aminosäuresequenz. Der gelbe Kreis symbolisiert die CH2 Domäne der ABD. Der C-Terminus der MACF1 Isoform-1 wurde C-terminal mit dem GFP Gen fusioniert. Dieses kodiert für die GAS2 Domäne sowie die zwei EF Hand Domänen.

4.2. Charakterisierung der MACF1 Isoform-3 Fusionsproteine in Transfektionstudien.

Die verschiedenen MACF1 Isoform-3 GFP Fusionsmutanten wurden in COS7 Zellen exprimiert. Anschließend wurden diese Zellen fixiert und in der indirekten Immunfluoreszenz oder unter Verwendung des *life cell imaging* TIRF (*Total Internal Reflection Fluorescence*) Mikroskopsystems direkt analysiert. Das TIRF System zeichnet sich durch die Darstellung hoher Signalkontraste innerhalb einer Schicht von 100 nm oberhalb des Deckglases aus, wodurch nur eine limitierte Anzahl an Fluoreszenzsignalen erfasst wird. Dadurch kann eine detaillierte Analyse der zu untersuchenden Proteine gewährleistet werden. Im Gegensatz dazu können in der indirekten Immunfluoreszenz die einzelnen Fluoreszenzsignale von GFP Fluoreszenzproteinen nicht voneinander getrennt examiniert werden, wodurch Detailinformationen verloren gehen. Aus diesem Grunde wurden die beiden MACF1 iso3- und MACF1 iso3-CH2 GFP Fusionsproteine mittels der TIRF Mikroskopie analysiert. Wie in der Abbildung 4.2. A und A' zu sehen, lokalisieren die MACF1 iso3- und MACF1 iso3-CH2 GFP Fusionsproteine prominent an der Zellperipherie und induzieren eine beachtliche Anzahl an Filopodien (Abb. 4.2. A-A', Pfeile) und Membranausstülpungen (Abb. 4.2. A-A', Pfeilspitzen). Die Hinzufügung der CH2 Domäne im MACF1 iso3-CH2 GFP Fusionsprotein zeigt im Vergleich zu dem MACF1 iso3 GFP Fusionsprotein keine veränderte subzelluläre Verteilung. Des Weiteren weisen die transfizierten (MACF1 iso3- und MACF1 iso3-CH2 GFP) Zellen eine vergrößerte Zelloberfläche auf (vgl. Abb. 4.2. A-A' mit A''). Eine gänzlich andere Lokalisation weist das GFP MACF1 iso3 Fusionsprotein auf. Dieses ist exklusiv im Zellkern vorhanden

(Abb. 4.2. A'', Pfeile). Durch das interkalierende TRITC-gekoppelte Phalloidin wurde das Aktin-Zytoskelett angefärbt, um die Zellmorphologie der Transgen-exprimierenden Zellen zu examinieren. Im Gegensatz zu den anderen beiden Fusionsproteinen (Abb. 4.2. A, A') kann keine Veränderungen der Morphologie beobachtet werden.

Diese unterschiedlichen subzellulären Verteilungen der GFP MACF1 iso3 und MACF1 iso3 GFP Fusionsproteine implizieren, dass durch die N-terminale Fusion des GFP Proteins die Assoziation mit der Plasmamembran beeinträchtigt wird.

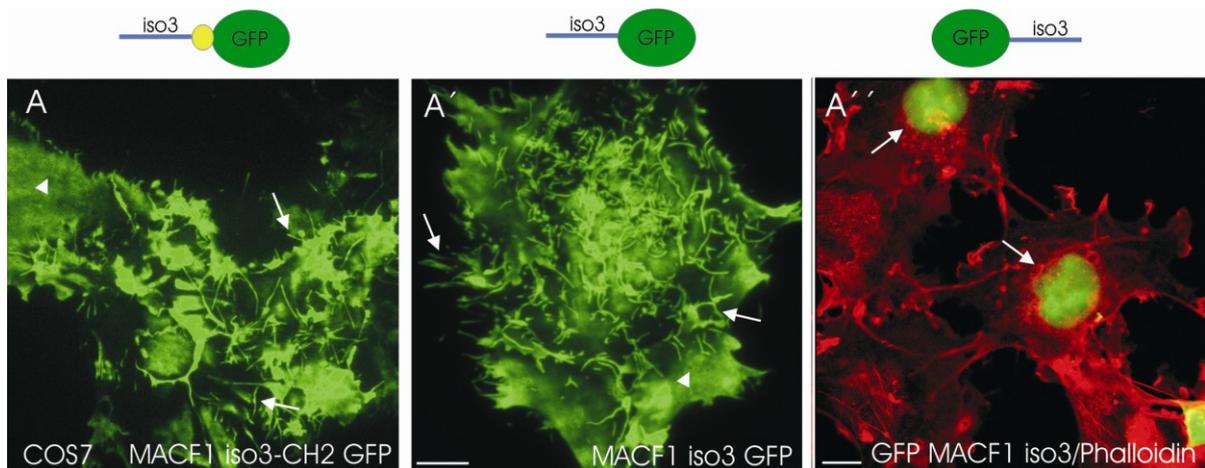


Abb. 4.2.: TIRF Life cell imaging- und Immunfluoreszenzanalyse der transienten Expression der MACF1 Isoform-3 GFP Fusionsproteine in COS7 Zellen.

Die transiente Expression von MACF1 iso3-CH2 GFP (A) und MACF1 iso3 GFP (B) induzieren die Ausbildung von Filopodien und Membranausläufern (Pfeile). Des Weiteren wird eine vergrößerte Zelloberfläche, im Gegensatz zu Zellen die transient GFP MACF1 iso3 (A'') exprimieren, beobachtet. N-terminal GFP-fusionierte MACF1 iso3 Fusionsproteine (GFP MACF1 iso3) lokalisieren exklusiv im Zellkern der transfizierten COS7 Zellen. Pfeile deuten auf die Fusionsproteine im Zellkern (A-A'').

Transgen-exprimierende COS7 Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und mittels des TIRF-Epifluoreszenzmikroskops wurde die GFP Expression der Fusionsproteine (A, MACF1 iso3-CH2 GFP) oder (A', MACF1 iso3 GFP) aufgenommen (65nm Schichtdicke). A'' Das GFP iso3 MACF1 Fusionsprotein wurde in COS7 Zellen transient exprimiert und mit 3% PFA fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde durch TRITC-gekoppeltes Phalloidin visualisiert. Balken: 10 µm.

4.3. Punktmutationsstudien deuten eine Myristylierung des MACF1 Isoform-3 Proteins an.

Wie in Abbildung 4.2. zu beobachten ist, wurde die Lokalisation des MACF1 iso3 GFP Fusionsproteins durch das N-terminale GFP Markierungsprotein gestört. Möglicherweise wird durch die Größe des N-terminalen GFP Proteins (27 kDa) eine Myristylierung der GFP MACF1 iso3 Fusionsproteine sterisch gehindert. Ein solches subzelluläres Lokalisierungssignal wird für das MACF1 Isoform-3 Protein in der Aminosäuresequenz (AS 2) prognostiziert (Abb. 1.1.). Um diese Annahme zu überprüfen wurde eine Myristylierungsmutante G2A MACF1 iso3 GFP generiert (Abb. 4.1.). Die G2A MACF1 iso3 GFP Fusion und als Kontrolle das MACF1 iso3 GFP Fusionsprotein wurden transient in COS7 Zellen exprimiert und analysiert. Wie in Abbildung 4.3. A. zu beobachten, lokalisiert das MACF1 iso3 GFP Fusionsprotein an der Plasmamembran (Abb. 4.3. A). Die G2A MACF1 iso3 GFP Fusion lokalisiert jedoch exklusiv im Zellkern und weist dort spezifische Akkumulationen auf (Abb. 4.3. B). Das Zytoskelett der verwendeten COS7 Zellen wird durch Anfärben der Mikrotubuli (Abb. 4.3. B'-B'') oder durch das Plectin

Protein (Abb. 4.3. A'-A'') visualisiert. Diese Expressionsstudien implizieren, dass eine Myristilierung die Lokalisation des MACF1 Isoform-3 Proteins an der Plasmamembran bestimmt.

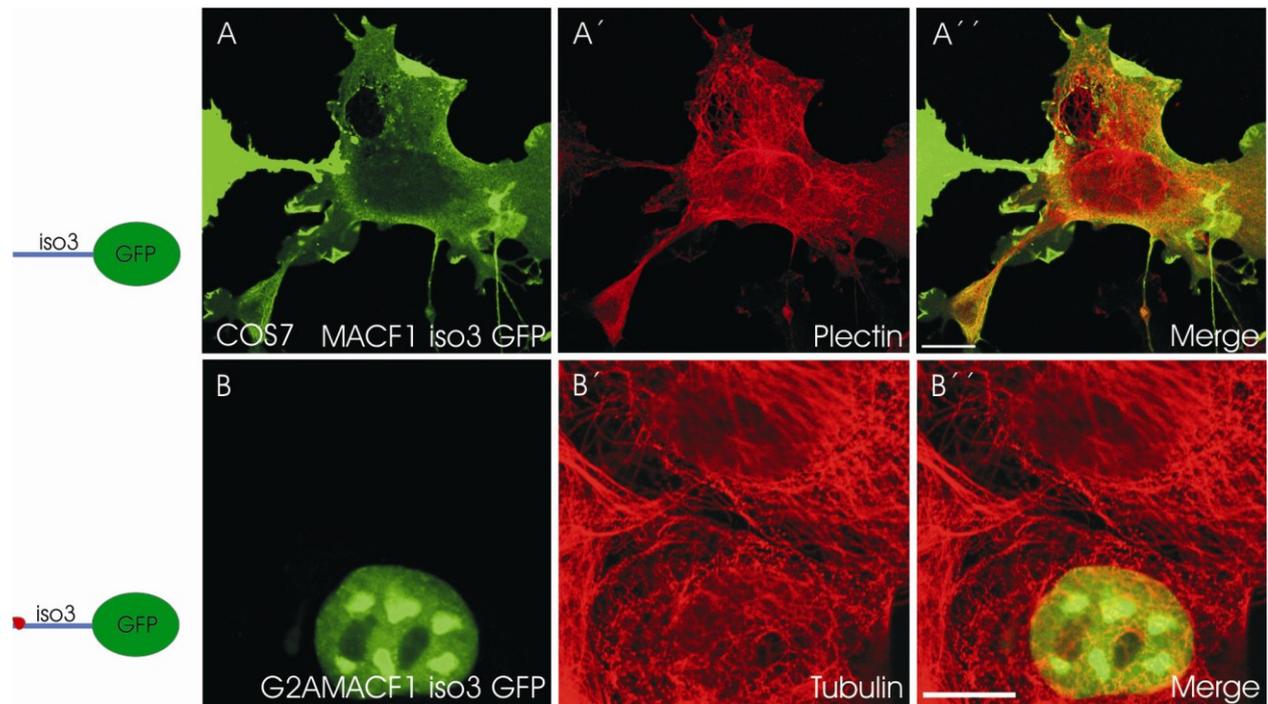


Abb. 4.3.: Immunfluoreszenzanalyse der G2A- und MACF1 iso3 GFP Konstrukte in COS7 Zellen.

MACF1 iso3 GFP Fusionsproteinen lokalisieren an der Plasmamembran (A) in COS7 Zellen. Im Gegensatz dazu lokalisiert die Myristilierungsvariante G2A MACF1 iso3 GFP exklusiv, mit Akkumulationen, im Zellkern (B-B').

COS7 Zellen wurden mit den G2A- und MACF1 iso3 GFP Fusionsproteinen transfiziert und mit MeOH fixiert. β -Tubulin (WA3) (B') und Plectin (A') spezifische Antikörper wurden in der indirekten Immunfluoreszenz eingesetzt. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit sekundären α -Maus (AF 568), bzw. α -Meerschweinchen (AF 568) Alexa Fluor-gekoppelten Antikörpern. Balken: 10 μ m.

4.4. COS7 Zellen, die transient die MACF1 Isoform-3 GFP Fusionsproteine exprimieren, weisen keine Kontaktinhibition auf.

In Abbildung 4.2. wurden die zellmorphologischen Veränderungen einzelner MACF1 Isoform-3 GFP-exprimierenden Zellen (Abb. 4.2.) untersucht. Weiterführend wurde die Auswirkung der transienten Expression auf den Zellverband evaluiert. Wie in Abbildung 4.4. zu sehen ist, wachsen die MACF1 iso3-CH2 GFP-exprimierenden Zellen übereinander hinweg (Abb. 4.4. A, Pfeilspitzen). Dadurch erscheint das Mikrotubuli-Netzwerk sehr kompakt (Abb. 4.4. A') und die Zellkerne weisen eine engere räumliche Anordnung auf (Abb. 4.4. A'', Pfeilspitze). Dies impliziert, dass durch die transiente Expression der Fusionsmutanten ein Verlust der Kontaktinhibition induziert wird. MACF1 iso3-CH2 GFP-exprimierende Zellen weisen zudem nukleäre Deformationen auf (Abb. 4.4. A'', Pfeil).

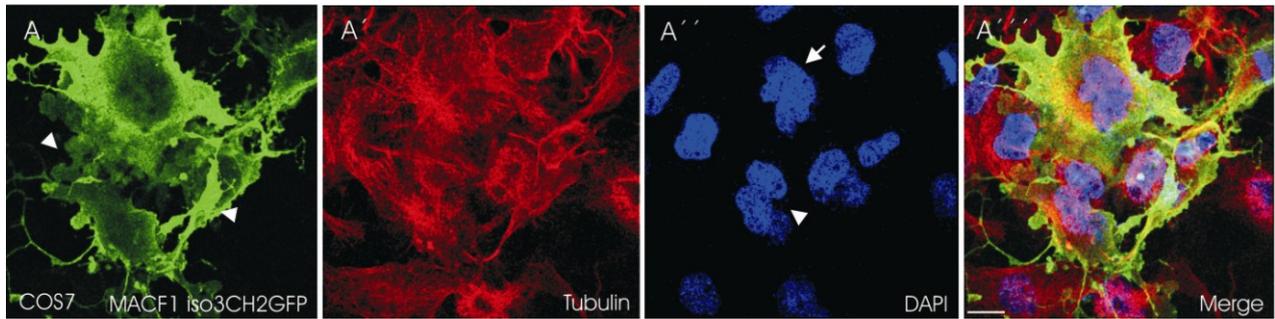


Abb. 4.4.: Immunfluoreszenzanalyse der Lokalisation der MACF1 iso3-CH2 GFP Fusionsproteine in COS7 Zellen.

In MACF1 iso3-CH2 GFP-transfizierten Zellen (A) liegt das MT-Zytoskelt dicht gepackt (A') und die Zellkerne liegen eng benachbart (Pfeilspitze A'') vor. Zum Teil sind sie vergrößert und weisen Deformationen auf (Pfeil, A''). Pfeilspitzen in A deuten auf überwachsene Zellareale hin.

Die MACF1 iso3-CH2 GFP Fusionsmutanten wurde in COS7 Zellen transient exprimiert und die Zellen mit MeOH fixiert. β -Tubulin (WA3) spezifische Antikörper wurden in der indirekten Immunfluoreszenz eingesetzt. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit sekundären α -Maus (AF 568) Alexa Fluor-gekoppelten Antikörpern. Die Zellkerne wurden durch den DAPI Farbstoff visualisiert. Balken: 10 μ m.

4.5. Die G2A MACF1 iso3 GFP Fusionsmutante induziert das Auftreten von vielkernigen Zellen.

4.5.1. Die G2A MACF1 iso3 GFP Fusionsmutante induziert das Auftreten von vielkernigen Zellen

Eine weitere Auswirkung der transienten Expression aller MACF1 Isoform-3 spezifischen Fusionsproteine wurde bezüglich der Zellkernmorphologie beobachtet. So wiesen sie eine erhöhte Anzahl an Zellkernen pro Zelle auf. Weiterhin wurden nukleäre Deformationen oder vergrößerte Zellkerne beobachtet (Abb. 4.4. A''; Abb.4.5.1 und nicht gezeigte Daten). In Abbildung 4.5.1. sind MDCK Zellen, die zwei Tage lang transient G2A MACF1 iso3 GFP Fusionsproteine exprimierten, dargestellt. Durch die Transgenexpression werden mehrere Nuklei in einer Zelle beobachtet (Abb. 4.5.1. A, Pfeile), die in einer geraden Anzahl vorliegen. Dieser Effekt intensiviert sich mit der transienten Expressionsdauer und nach drei bis vier Tagen sterben die transfizierten Zellen ab (eigene Beobachtung, keine Abbildung vorhanden).

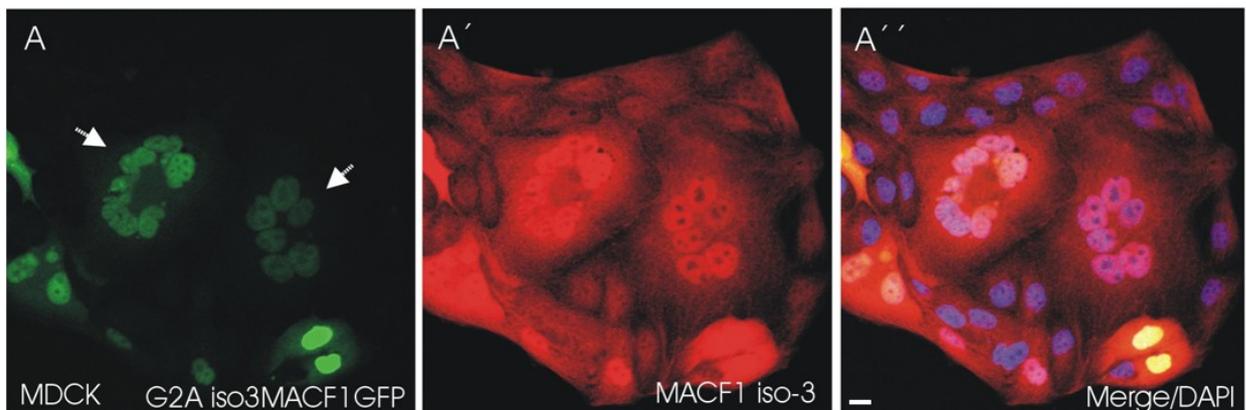


Abb. 4.5.1.: Immunfluoreszenzanalyse der zellulären Effekte der G2A MACF1 iso3 GFP Fusionsmutante in MDCK Zellen.

G2A MACF1 Isoform-3-exprimierende Zellen weisen mehrere Nuklei in einer Zelle auf und sind zudem vergrößert (A). Durch das Anfärben des MACF1 Isoform-3 Proteins wurden die Zellbegrenzungen visualisiert (B).

MDCK Zellen wurden mit MeOH fixiert. Diese Zellen wurden mit MACF1 Isoform-3 (Iso-3 pAb) spezifischen Antikörper inkubiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit sekundären α -Kaninchen (AF 568) Alexa Fluor-gekoppelten Antikörpern. Die Zellkerne wurden durch den DAPI Farbstoff visualisiert. Balken: 10 μ m.

4.5.2. Die MACF1 Isoform-3 GFP exprimierende Zellen weisen mehrere Zellkerne auf.

In einer statistischen Analyse wurde die veränderte Zellkernanzahl von MACF1 Isoform-3 GFP-exprimierenden Zellen evaluiert. COS7 Zellen wurden mit den MACF1 Isoform-3 GFP Konstrukten transfiziert und nach 24h transients Expression analysiert. Anschließend wurde in der indirekten Immunfluoreszenz die Anzahl der Zellkerne pro transfizierter Zelle quantitativ ausgewertet. Im Vergleich mit den eGFP-exprimierenden Kontrollzellen weisen 50% der G2A MACF1 iso3 GFP-exprimierenden Zellen mehrere Kerne auf (zwei bis sechs Zellkerne). Sowohl die MACF1 iso3- (35%) als auch die MACF1 iso3-CH2 GFP Fusionsproteine (41%) weisen mehrere Zellkerne pro Zelle auf. Diese Ergebnisse deuten auf eine Funktion des MACF1 Isoform-3 Proteins in der Zytokinese oder Zellteilung hin.

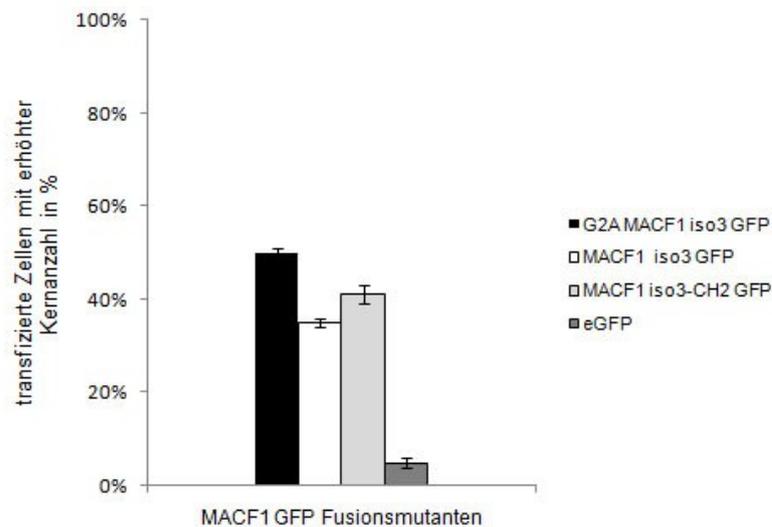


Abb. 4.5.2.: Die graphische Darstellung zeigt die quantitative Analyse der Zellkernanzahl der MACF1 Isoform-3 GFP-positiven Zellen.

MACF1 Isoform-3 GFP-exprimierende Zellen weisen mehrere Zellkerne (>2) pro Zelle auf. Die dargestellten MACF1 Isoform-3 GFP Fusionsproteine wurden transient für 24 Stunden in COS7 Zellen exprimiert. Die mit MeOH fixierten Zellen wurden mit DAPI gefärbt und mittels der direkten Immunfluoreszenz analysiert. In drei unabhängigen Experimenten wurden in je 200 Transgen-exprimierenden Zellen die Anzahl der Zellkerne ausgezählt und bestimmt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert der Auszählung wieder.

4.6. Das MACF1 Isoform-3 Protein und die Rho-GTPase RhoA interagieren *in vitro* und *in vivo*.

Die Ausbildung von Filopodien und Membranausläufern (Abb. 4.2. A-A') in Zellen, die C-terminal mit GFP fusionierte MACF1 Isoform-3 Proteine exprimieren, ähnelt dem Phänotyp von Rho-GTPase Mutanten (Ridley *et al.*, 1992; zur Übersicht Nobes und Hall, 1995). Die Rho-GTPasen sind 20-25 kDa kleine G-Proteine, die zytosolisch oder verankert in die Plasmamembran, in der Zelle vorkommen. Ihre Wirkung als molekulare Schalter beruht darauf, dass sie zwischen einem aktiven (GTP-gebundenen) und einem inaktiven (GDP-gebundenen) Zustand wechseln können (zur Übersicht Hall *et al.*, 2000). Die Hauptvertreter der Rho-GTPasen, Rac1, Cdc42 und RhoA übernehmen vielfältige Aufgaben. Unter anderem können sie in einer Kaskaden-artigen Aktivierung die Entstehung von Lamellopodien, Filopodien und die Ausbildung von Fokalkontakten induzieren (zur Übersicht Bourne *et al.*, 1990). In dem N-Terminus des MACF1 Isoform-3 wurde bereits eine putative RhoA Inhibierungsdomäne (HR1) postu-

liert (Abb. 1.1.). Basierend auf der Phänotypanalyse und den *in silico* Daten wurde die Hypothese aufgestellt, dass MACF1 Isoform-3 eine inhibitorische Interaktion mit RhoA eingehen kann.

4.6.1. Die transiente Expression der konstitutiv aktiven RhoA (V14) Mutante beeinflusst den Phänotyp der MACF1 Isoform-3 GFP Fusionsproteine.

Um die in 4.6. aufgestellte Hypothese zu überprüfen wurde zunächst evaluiert, ob das RhoA Protein die molekulare Ursache des beobachteten Phänotyps der transienten Expression der MACF1 iso3 GFP Mutanten ist. Hierfür wurde konstitutiv aktives RhoA (V14) zusammen mit MACF1 iso3 GFP Fusionsproteinen in COS7 Zellen transient exprimiert und in der indirekten Immunfluoreszenz analysiert. Das RhoA V14 Myc-Fusionsprotein kodiert für die GTPase, in dem die Aminosäure (AS 14) Serin durch ein Valin substituiert wird. Dies resultiert in einer Konformation, die der GTP-gebundenen (aktiven) Konformation entspricht. Durch die gemeinsame Expression von V14 RhoA und MACF1 iso3 GFP wird der zuvor beobachtete Phänotyp (Abb. 4.2. A-A') neutralisiert (Abb. 4.6.1. A'-A''). Die kotransfizierten Zellen erscheinen deutlich kleiner als die MACF1 iso3 GFP-exprimierenden Zellen (Abb. 4.6.1. A', Pfeile). Des Weiteren bilden sie keine Lamellipodien und Filopodien (Abb. 4.6.1. A-A'', Pfeil) aus. In einigen kotransfizierten Zellen wird eine Überlagerung der Fusionsproteine im Zytoplasma beobachtet (Abb. 4.6.1. B-B'', Vergrößerung). Zusammenfassend deuten diese Expressionsstudien eine Beziehung der RhoA und MACF1 Isoform-3 Proteine an.

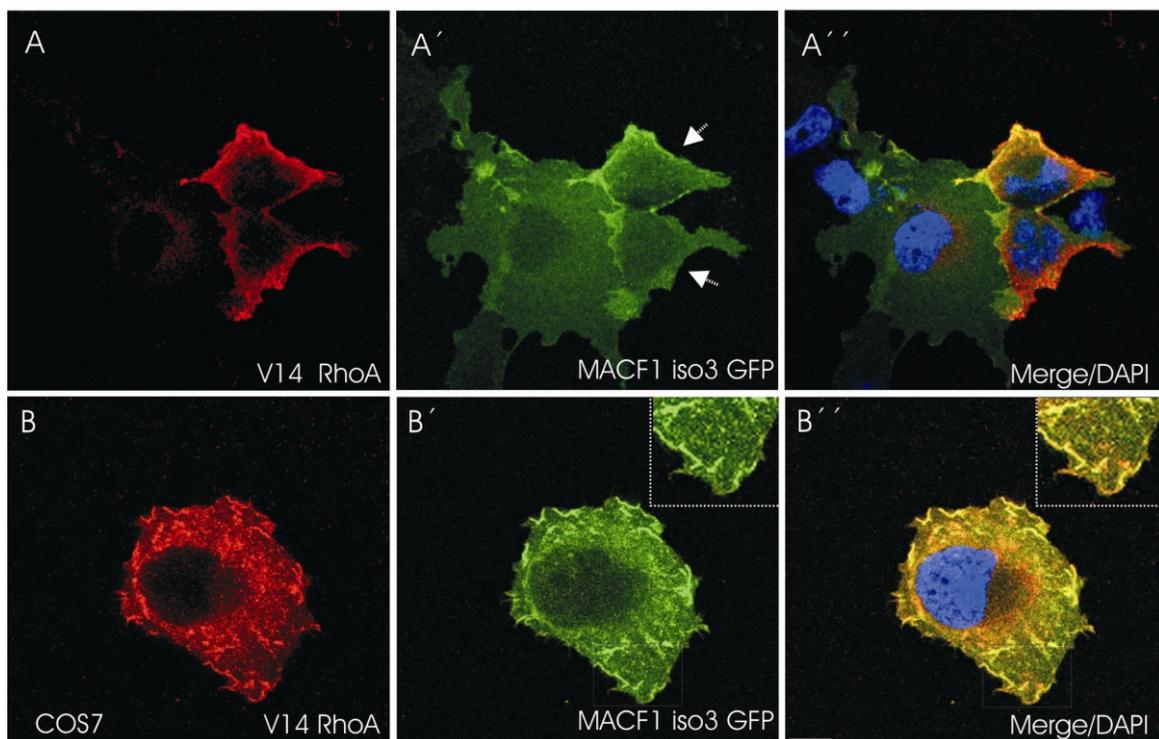


Abb. 4.6.1.: Immunfluoreszenzanalyse an COS7 Zellen, die konstitutiv aktives RhoA (V14) und MACF1 iso3 GFP Proteine simultan exprimieren.

Die kollektive Expression von konstitutiv aktivem (V14) RhoA (A) mit MACF1 iso3 GFP (A') resultiert in einer Neutralisierung des MACF1 iso3 GFP Phänotyps. Pfeile deuten auf kotransfizierte Zellen hin. Diese sind deutlich kleiner als die MACF1 iso3 GFP-exprimierende Zelle daneben. Die transient exprimierten Fusionsproteine V14 RhoA (B) und MACF1 iso3 GFP (B') überlagern im

Zytoplasma (B''). Nach der Fixierung der Zellen mit MeOH wurden sie mit Myc-spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit sekundären α -Maus (AF 568) Alexa Fluor-gekoppelten Antikörpern. Die Zellkerne wurden durch den DAPI Farbstoff visualisiert. Balken: 10 μ m.

4.6.2. Endogenes MACF1 Isoform-3 und RhoA überlagern partiell in COS7 Zellen.

Die Fusionsproteine in Abb. 4.6.1. B-B'' wiesen eine Überlagerung in der Zellperipherie auf. Im Folgenden wurde überprüft, ob die endogenen RhoA und MACF1 Isoform-3 Proteine ebenfalls eine ähnliche Verteilung aufweisen. Wie in der Abbildung 4.6.2. A zu sehen, lokalisiert RhoA diffus im Zytoplasma, akkumuliert in Lamellopodien und in der Peripherie der Zellen (Abb. 4.6.2. A, Pfeile) Das endogene MACF1 Isoform-3 Protein zeigt eine analoge endogene Verteilung (Abb. 4.6.2.A'). Dabei überlagern RhoA und MACF1 Isoform-3 in den Membranausläufern (Abb. 4.6.2., A'', Pfeile).

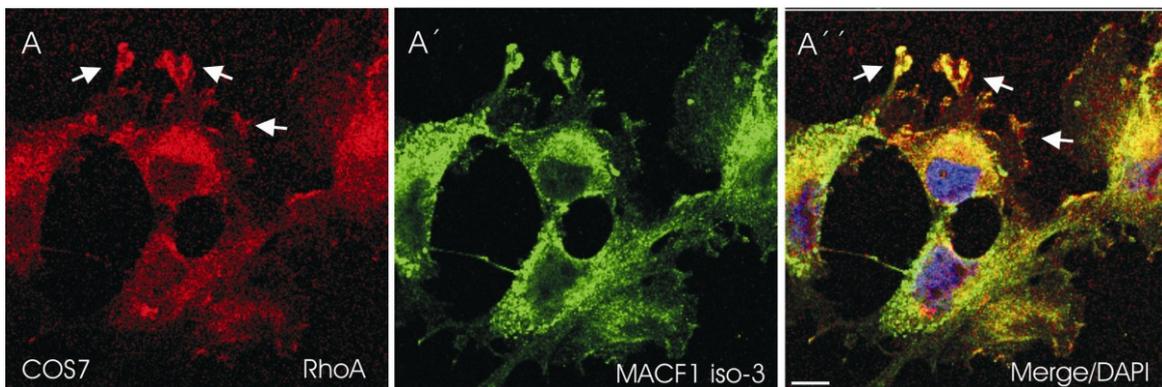


Abb. 4.6.2.: Immunfluoreszenzanalyse der endogenen Verteilung von MACF1 Isoform-3 und RhoA.

Die endogenen RhoA (A) und MACF1 Isoform-3 (A') Proteine zeigen eine partielle Kolokalisation in der Peripherie auf. Pfeile deuten auf die Überlagerung der beiden Proteine in den Membranausstülpungen der Zelle hin.

COS7 Zellen wurden mit 3%igem PFA fixiert und in einer Doppelfärbung wurden sie mit RhoA und MACF1 Isoform-3 (iso-3 pAb)-spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit sekundären α -Maus (AF 568), bzw. α -Kaninchen (AF 488) Alexa Fluor-gekoppelten Antikörpern. Die Zellkerne wurden durch den DAPI Farbstoff visualisiert. Balken: 10 μ m.

4.6.3. MACF1 Isoform-3 und RhoA interagieren im Hefe-Zwei-Hybrid-System.

Als nächstes wurde mittels einer Hefe-Zwei-Hybrid Analyse eine direkte *in vivo* Interaktion der Proteine untersucht. Aufgrund der postulierten RhoA Inhibierungsdomäne (AS 101-159) wurde das N-terminale Segment (AS 1-330) des MACF1 Isoform-3 Proteins für die Interaktionsstudien ausgewählt und mit der GAL4 DNA-bindenden Domäne des pGBKT7 Vektors fusioniert. Analog wurde ein Hefe-spezifisches Konstrukt generiert, das das komplette RhoA Protein mit der GAL4 Transkriptionsdomäne des pGADT7 Expressionsvektor exprimiert. Abbildung 4.6.3. zeigt in einer Tabelle die verwendeten Fusionskonstrukte. Daneben sind die entsprechend kotransformierten, auf Selektionsmedien ausgestrichenen, Y190 Hefezellen gezeigt. Die pGADT7-RhoA und pGBKT7-MACF1 iso3 kotransformierte Zellen wachsen auf den Selektionsplatten und waren zusätzlich positiv für den β -Galactosidasetest (blau-angefärbte Kolonien in der rechten Abbildung). Y190 Hefezellen, die den Leervektor pGADT7 und pGBKT7-MACF1 iso3 exprimieren, können nicht auf den Selektionsplatten wachsen und weisen keine

Blaufärbung auf. (Abb. 4.6.3.). Dies zeigt, dass RhoA und der N-Terminus von MACF1 Isoform-3 *in vivo* miteinander interagieren können.

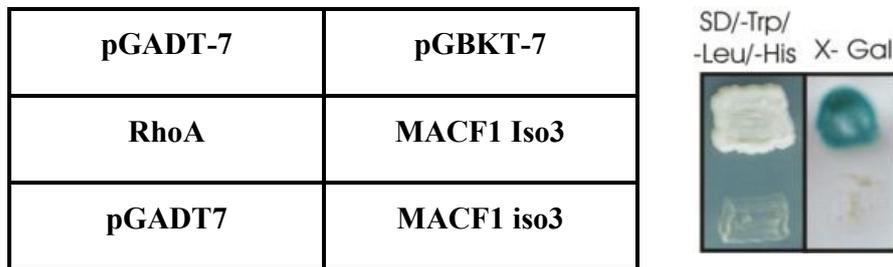


Abb. 4.6.3.: Hefe-Zwei-Hybrid Analyse der *in vivo* Interaktion zwischen RhoA und MACF1 Isoform-3.

Y190 Hefe koexprimierten pGADT7-RhoA (AS 1-194) und pGBKT7-MACF1iso3 (AS 1-330) oder den Leervektor pGADT7 und pGBKT7-MACF1 iso3. Diese Hefen wurden für einen Wachstumstest auf SD Selektionsplatten (-Trp/-Leu/-His) ausgestrichen und das Wachstum wurde nach 3 Tagen analysiert. Entsprechend wurden die kotransformierten Y190 Hefezellen für den β -Galaktosidase Test auf den Selektionsplatten ausgestrichen und für drei Tage wachsen gelassen. Anschließend wurden die Hefen durch flüssigen Stickstoff aufgebrochen und durch Zugabe von X-Gal wurde das β -Galactosidase Markerprotein angefärbt.

5. Die MACF1 Isoform-3 Lokalisation an der äußeren Kernhülle wird durch Nesprin-3 vermittelt.

Die prominente MACF1 Isoform-3 Lokalisation an der äußeren Kernhülle und im Zellkern von Glioma C6 Zellen (Abb. 3.2.5.) und im Kleinhirn (Abb. 3.2.3.) veranlasste uns, diese neue Topologie näher zu charakterisieren. In den folgenden Experimenten wurde die besondere MACF1 Isoform-3 Topologie an der Kernmembran examiniert. Weiterhin wurde nach Interaktionspartnern gesucht, die MACF1 Isoform-3 mit der äußeren Kernhülle verknüpfen können. Bislang sind nur Vertreter der KASH (*Klarsicht/Anc-1/Syne-1 Homology domain*) Proteine als exklusive Proteine der äußeren Kernhüllen beschrieben worden (siehe Einleitung). Aufbauend darauf wurde im Folgenden untersucht, ob orthologe Proteine der KASH Familie in Vertebraten (die Nesprine) Interaktionen mit MACF1 Isoform-3 eingehen und dessen Verankerung an der äußeren Kernhülle vermitteln.

5.1. Lokalisationsstudien des MACF1 Isoform-3 Proteins an der äußeren Kernmembran.

In diesem Experiment wurde die Ring-ähnlichen Lokalisation von MACF1 Isoform-3 entlang der äußeren Kernhülle in Glioma C6 Zellen analysiert. Dafür wurden Glioma C6 Zellen mit 10 μ g/ml Digitonin permeabilisiert. Digitonin ist ein Detergenz, welches das Cholesterin aus der Zellmembran herauslöst. Da die Cholesterinkonzentration in der Plasmamembran am höchsten ist und Cholesterin nur in sehr geringen Mengen in der Kernhülle vorkommt, wird so selektiv die Plasmamembran permeabilisiert (Dunn *et al.*, 1983). Als Kontrolle wurden Zellen mit Triton X-100 behandelt, das gleichmäßig die Plasmamembran als auch die Kernhülle permeabilisiert. In mit Triton X-100 behandelten Glioma C6 Zellen lokalisiert MACF1 Isoform-3 entlang der Kernhülle (Abb. 5.1. A, Pfeil), innerhalb des Zellkerns sowie im Zytoplasma (Abb. 5.1. A). Als Marker für eine erfolgreiche Permeabilisation der Kernhülle, konnte das innere Kernmembranprotein Lamin A erfolgreich visualisiert werden (Abb. 5.1. A'). In Digi-

tonin permeabilisierten Zellen konnte Lamin A jedoch nicht angefärbt werden (Abb. 5.1. B'). Ebenfalls konnte MACF1 Isoform-3 nicht im Zellkern detektiert werden (Abb. 5.1 B). Dies impliziert, dass die Kernhülle nicht durchlässig für die verwendeten Antikörper ist. Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen waren jedoch intensive MACF1 Isoform-3 Ringstrukturen entlang der Zellkerne (Abb. 5.1. B, Pfeile) sichtbar.

Diese Daten unterstreichen die äußere Kernmembran Lokalisation von MACF1 Isoform-3.

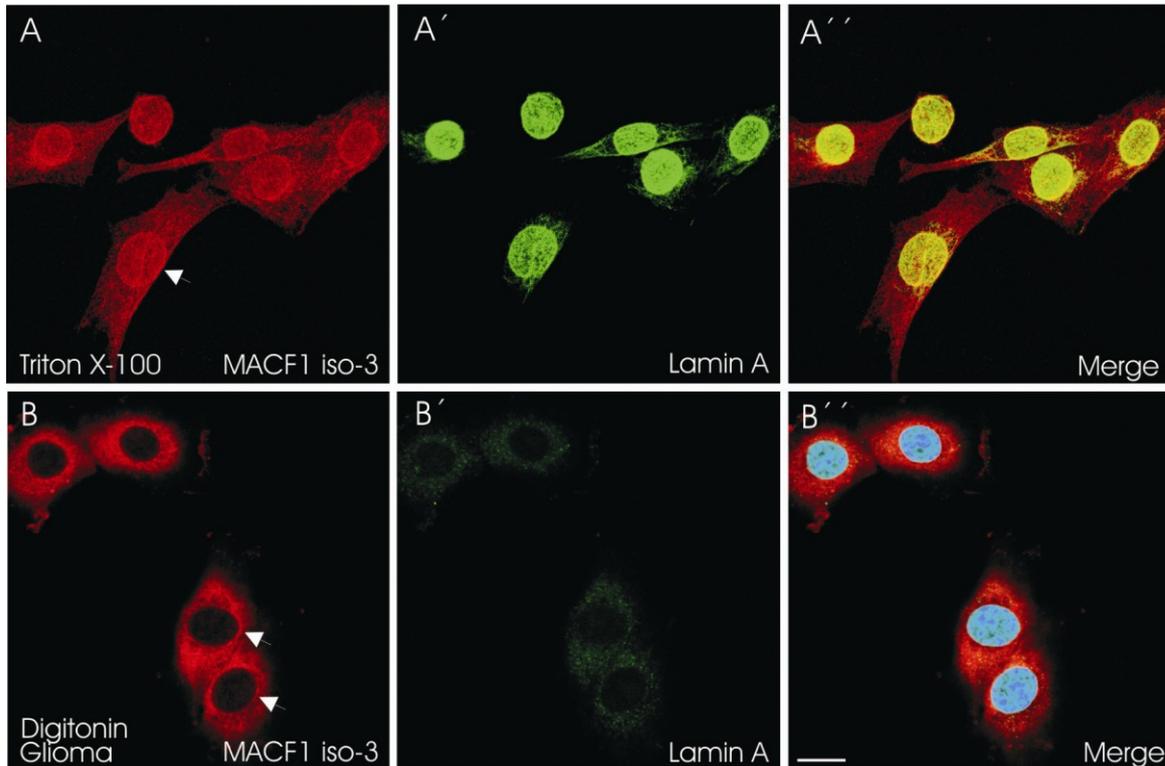


Abb. 5.1.: Immunfluoreszenzanalyse von Digitonin und Triton X-100 permeabilisierten Glioma C6 Zellen.

MACF1 Isoform-3 lokalisiert an der äußeren Kernhülle. Triton X-100 permeabilisierte Glioma C6 Zellen weisen eine MACF1 Isoform-3 Lokalisation im Zytoplasma, entlang und innerhalb des Zellkerns auf (A). Ebenfalls wird das Lamin A Protein detektiert (A'). In Digitonin-permeabilisierten Zellen lokalisiert MACF1 Isoform-3 an der äußeren Kernhülle und im Zytoplasma (B). Das Lamin A Protein kann nicht detektiert werden (B'). Pfeile deuten auf die MACF1 Isoform-3 Lokalisation an der äußeren Kernhülle hin.

Glioma C6 Zellen wurden mit 3%igem PFA fixiert und bei Raumtemperatur (RT) für 5 Minuten mit 0.5 % Triton X-100 (A-A'') oder auf Eis für 4 Minuten mit 10µg/ml Digitonin permeabilisiert (B-B'). Anschließend wurden die Zellen in einer Doppelfärbung mit Lamin A und MACF1 Isoform-3 spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit sekundären α -Maus (AF 488), bzw. α -Kaninchen (AF 568) Alexa Fluor-gekoppelten Antikörpern. Die Zellkerne wurden durch den DAPI Farbstoff visualisiert. Balken: 10 µm.

5.2. Die Lamin B Δ^{2+} Mutante beeinflusst die Lokalisation von MACF1 Isoform-3 in Glioma C6 Zellen.

Die Lokalisation von äußeren Kernmembranproteinen wie z.B. den Nesprinen ist von einer intakten Lamina abhängig. Sowohl die Abwesenheit als auch die Umlagerung von Lamin A/C Protein beeinflussen die Nesprin-1/2 Lokalisation an der Kernhülle (Libotte *et al.*, 2005). Ob Lamine ebenfalls die MACF1 Isoform-3 Verankerung an der Kernmembran stabilisieren können, wurde mit Hilfe des Lamin B Δ^{2+} GFP Fusionsproteins untersucht (Ellis *et al.*, 1997; Vaughan *et al.*, 2001). Dies ist ein GFP-Fusionsprotein einer dominant-negativen Lamin B-Form, welche die Aminosäuren 34-420 enthält und

in der Lage ist, endogenes Lamin B sowie endogenes Lamin A/C umzuverteilen. Des Weiteren wird die Lokalisation der Nesprine durch die Expression dieser Fusionsmutante beeinflusst, wodurch die Ringstruktur der Nesprine an der Kernhülle nicht länger zu beobachten ist (Libotte *et al.*, 2005).

Wie in Abb. 5.2. A-A'' zu sehen ist, lokalisieren Lamin $\text{B}\Delta^{2+}$ GFP-Fusionsproteine in Aggregat-ähnlichen Strukturen entlang der Kernhülle und innerhalb des Kernes mit Lamin A/C. Ebenfalls ist die Lokalisation des endogenen MACF1 Isoform-3 Proteins in den Transgen-exprimierenden Zellen verändert. Im Gegensatz zu untransfizierten Zellen bildet MACF1 Isoform-3 anormale Akkumulationen, die mit den Lamin $\text{B}\Delta^{2+}$ GFP Aggregaten überlagern (Abb. 5.2. B-B'', Pfeile und Vergrößerung). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass MACF1 Isoform-3 ähnlich wie die Nesprine über Lamin A/C gekoppelte Komplexe an der Kernmembran verankert ist. Zusätzlich implizieren diese Resultate, dass die Kernmembran-assoziierten MACF1 Proteine eventuell Interaktionen mit den Nesprinen eingehen können. Diese Hypothese wurde zusätzlich durch die bereits bekannte Interaktion vom Plectin mit Nesprin-3 unterstützt. (Wilhelmsen *et al.*, 2005).

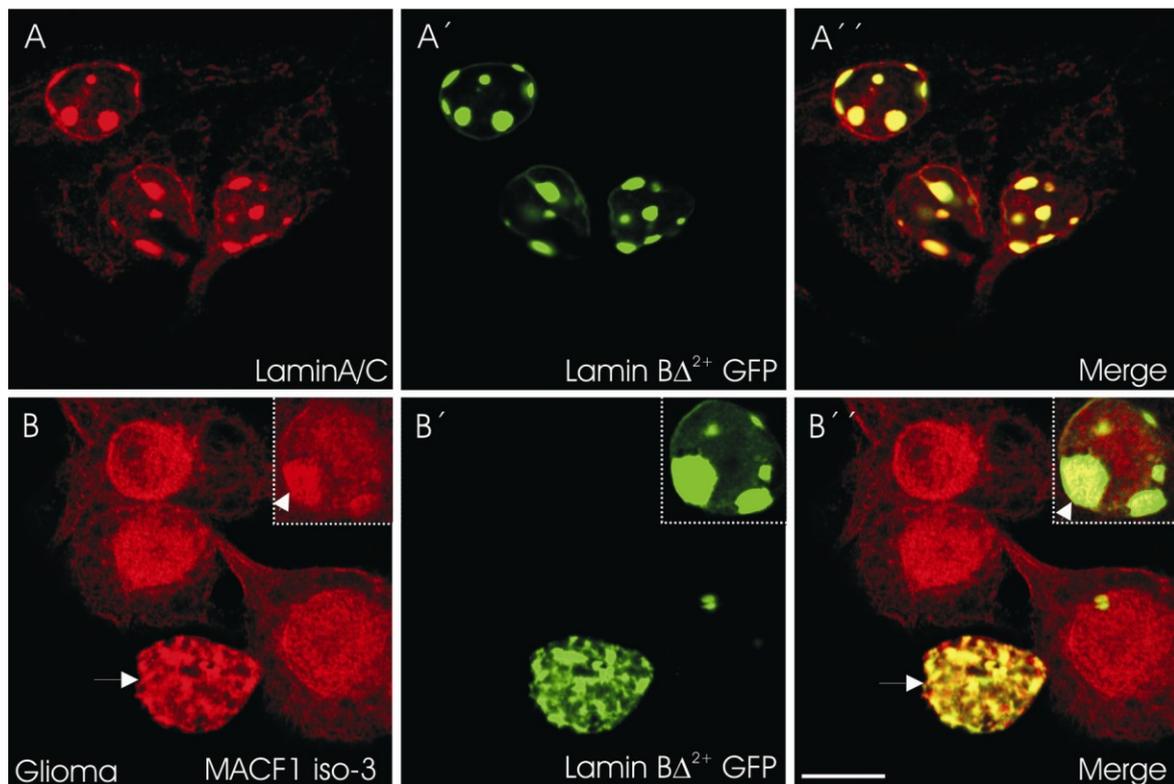


Abb. 5.2.: Immunfluoreszenzanalyse der Lamin $\text{B}\Delta^{2+}$ GFP Fusionsmutante in Glioma C6 Zellen.

Die nukleäre MACF1 Isoform-3 Lokalisation wird durch die transiente Expression von Lamin $\text{B}\Delta^{2+}$ GFP Fusionsmutanten beeinflusst. In Glioma C6 Zellen lokalisieren Lamin $\text{B}\Delta^{2+}$ GFP-Fusionsproteine in Aggregat-ähnlichen Strukturen entlang der Kernhülle und innerhalb des Kernes (A', B') mit Lamin A/C (A). Ebenfalls überlagert MACF1 Isoform-3 in Lamin $\text{B}\Delta^{2+}$ GFP Aggregaten (B, B'').

Nach der MeOH Fixierung wurden die Glioma C6 Zellen mit Lamin A/C (A), bzw. iso-3 pAb (B) spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit sekundären α -Maus (AF 568), bzw. α -Kaninchen (AF 568) Alexa Fluor - gekoppelten Antikörpern. Balken: 10 μm .

5.3. KASH Proteine beeinflussen die Lokalisation von MACF1 Isoform-3 an der Kernhülle.

Basierend auf dem Ergebnis der Expressionstudien in 5.2. wurde in den folgenden Experimenten evaluiert, ob Nesprine selbst für die Lokalisation von MACF1 Isoform-3 an der äußeren Kernhülle verantwortlich sind.

5.3.1. Wirkungsweise des SP SUN1 Konstrukts.

Um zu überprüfen, ob Nesprine die Verankerung von MACF1 Isoform-3 Protein an der Kernmembran vermitteln, wurde ein dominant negativer Nesprin Ansatz in Glioma C6 Zellen angewandt.

Eine wirkungsvolle Methode, alle KASH Proteine von der äußeren Kernhülle zu verdrängen, ist die transiente Expression des GFP Fusionsprotein SP SUN1 (AS 432-931) (Lu, 2007). Dieses kodiert für den gesamten luminalen C-Terminus des Sun1 Proteins und enthält die SD1 und SD2 sowie die SUN Domäne. N-terminal ist dieses Sun1 Fragment mit dem GFP Protein fusioniert. Vor dem GFP Gen liegt eine Sequenz, die für das Signalpeptid des Torsin A Proteins kodiert. Durch dieses Signalpeptid wird das Fusionsprotein innerhalb der Zelle in das Endoplasmatische Retikulum (ER) gebracht. Da das ER in die äußere Kernmembran übergeht, lokalisiert das Fusionsprotein ebenfalls im perinukleären Spalt des Zellkerns. Hier kann die SUN Domäne an seinen bevorzugten Interaktionspartner, die KASH Domäne, binden. Weil die frei diffundierenden SP SUN1 GFP Fusionsproteine die Nesprine nicht an der inneren Kernmembran verankern können, diffundieren sie gemeinsam aus dem perinukleären Spalt in das ER (Abb. 5.3.1. schematische Darstellung). Nesprine werden durch diesen Mechanismus von der Kernmembran in das ER transloziert.

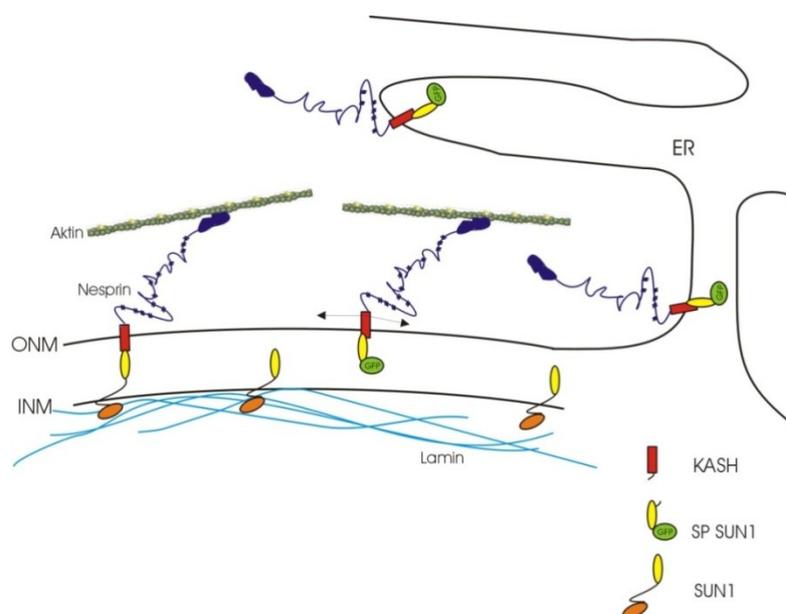


Abb. 5.3.1.: Schematische Darstellung der Wirkungsweise des SP SUN1 Proteins an der Kernmembran.

Das Sun1 Protein besteht aus einer N-terminalen Domäne (oranges Oval), die im Zellkern mit der Lamina (blaue Linien) interagiert (Lu, 2007). Mit seinen drei TM Domänen (nicht dargestellt) wird es in der inneren Kernmembran verankert. Das gelbe Oval symbolisiert die komplette luminal Domäne von Sun1. Diese lokalisiert im perinukleären Spalt zwischen der inneren (INM) und äußeren (ONM) Kernmembran. Dort interagiert es mit der KASH Domäne (roter Zylinder) der Nesprine und verankert sie. Das SP SUN1 Fusionsprotein weist an seinem N-Terminus das GFP (grüner Kreis) Protein auf. Damit das exprimierte Fusionsprotein in das ER

und den perinukleären Spalt sezerniert wird, wurde das GFP Markierungsprotein N-terminal mit dem Signalpeptid von Torsin A fusioniert. Das SP SUN1 GFP Fusionsprotein interagiert mit der KASH Domäne der Nesprine und transloziert diese entlang der äußeren Kernmembran in das ER.

5.3.2. SP SUN1 verdrängt Nesprine von der äußeren Kernmembran.

Bisher ist das oben beschriebene Fusionsprotein noch nicht in Glioma C6 Zellen verwendet worden. Daher wurde zunächst evaluiert, ob das SP SUN1 GFP Proteins in Glioma C6 Zellen Nesprine von der äußeren Kernhülle verdrängt kann. Hierfür wurde es in Glioma C6 Zellen transient exprimiert und anschließend die Verteilung von Nesprin-2 und einem Bindungspartner von Nesprin-3, Plectin, in der indirekten Immunfluoreszenz examiniert. Wie in 5.3.2. A zu sehen ist, lokalisiert das SP SUN1 GFP Fusionsprotein entlang der Kernmembran und in einer netzartigen Struktur im Zytoplasma. In diesen Transgen-exprimierenden Zellen kann kein Nesprin-2 an der Kernmembran detektiert werden (Abb. 5.3.2. A', Pfeile). (Abb. 5.3.2. B', Pfeilspitze). Plectin wird in Glioma C6 Zellen exprimiert und ähnlich wie in Epithelzellen (Lu, 2007) lokalisiert es sehr prominent an der Kernmembran (Abb. 5.3.2. B', Pfeilspitzen). Durch die transiente Expression des SP SUN1 GFP Proteins wird Plectin ebenfalls von der Kernhülle verdrängt (Abb. 5.3.2. B-B''). Diese Daten verdeutlichen, dass die Expression von SP SUN1 GFP Fusionsproteinen die Lokalisation von Nesprin als auch von Nesprin-assoziierten Proteinen an der Kernmembran in Glioma C6 Zellen unterbinden kann.

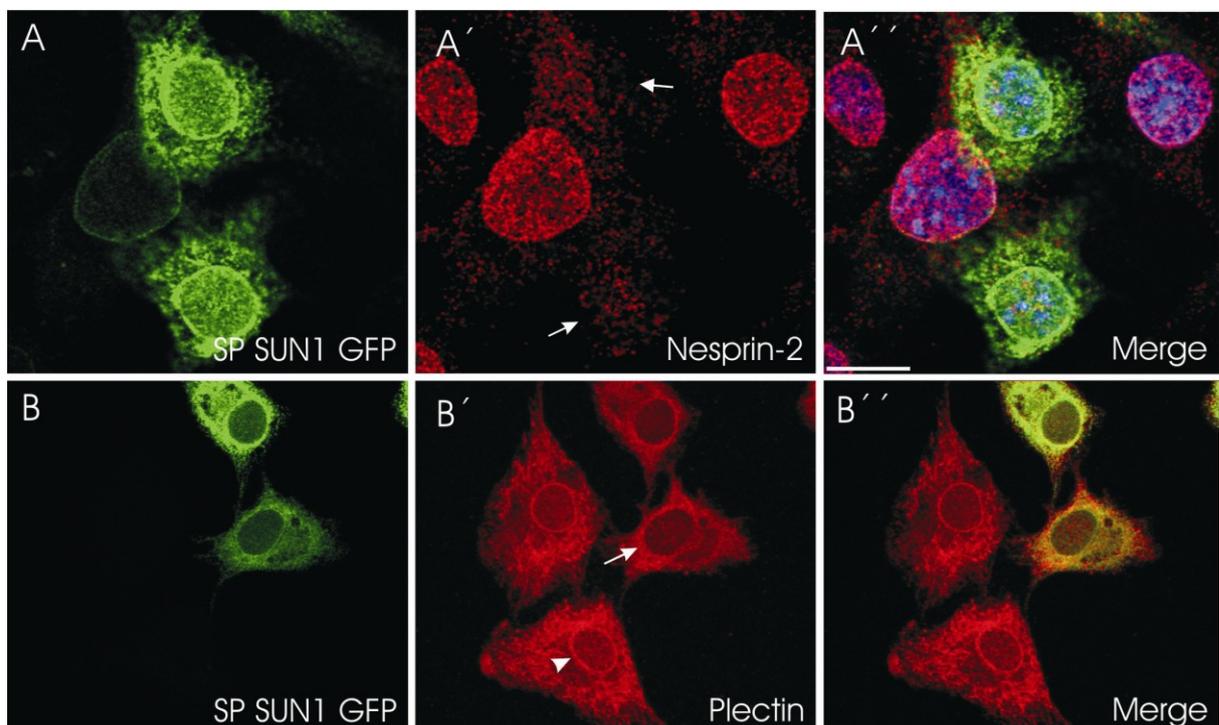


Abb. 5.3.2.: Immunfluoreszenzanalyse der Auswirkung der transienten Expression des SP SUN1 GFP Fusionsproteins auf die endogene Nesprin-2 Lokalisierung in Glioma C6 Zellen.

Die transiente Expression von SP SUN1 GFP Fusionsproteinen verdrängen Nesprin-2 und Plectin von der äußeren Kernhülle. Das SP SUN1 GFP Fusionsprotein lokalisiert entlang des Zellkerns und im Zytoplasma (A, B). In diesen transfizierten Zellen kann Nesprin-2 (A') und Plectin (B') nicht an der äußeren Kernhülle detektiert werden. Pfeile deuten auf die Kernhülle der SP SUN1 GFP-exprimierenden Zellen hin. Pfeilspitzen zeigen auf die Plectin Lokalisierung entlang der äußeren Kernhülle in untransfizierten Zellen. Nach der Fixierung mit MeOH wurden die Glioma C6 Zellen mit pAb Nesprin-2 (mAk K20-478-4) (A') und Plectin (B') spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit sekundären α -Maus (AF 568), bzw. α -

Meerschweinchen (AF 568) Alexa Fluor-gekoppelten Antikörper. Balken: 10 μm .

5.3.3. Das SP SUN1 Protein verdrängt Nesprin-2 und Plectin von der äußeren Kernmembran.

In drei unabhängigen Experimenten wurde die Verteilung der Nesprin-2 und Plectin Proteine an der äußeren Kernhülle in SP SUN1 GFP und SP GFP-exprimierenden Zellen statistisch ausgewertet. Das SP GFP Protein wird hier als Kontrolle verwendet. Es kodiert für das Signalpeptid von Torsin A und ist N-Terminal mit dem GFP Gen fusioniert (Lu, 2007). Die Experimente wurden wie in 5.3.2. beschrieben durchgeführt. Die statistische Auswertung ist in Abb. 5.3.3. graphisch dargestellt. Die transiente Expression des SP GFP Fusionsproteins beeinflusst nicht die Lokalisation der Nesprin-2 Proteine an der äußeren Kernmembran. In 96% aller transfizierten Zellen lokalisiert Nesprin-2 an der äußeren Kernhülle (Abb. 5.3.3., schwarzer Balken, 96%). Im Gegensatz dazu, wird in SP SUN1 GFP-exprimierenden Zellen Nesprin-2 fast nicht mehr (3%) an der Kernmembran detektiert. Einen vergleichbaren Effekt hat die transiente SP SUN1 GFP Expression auf die Plectin Lokalisation an der Kernhülle (Abb. 5.3.3., grauer Balken, 5%). Diese Daten zeigen, dass das SP SUN1 GFP Fusionsprotein in Glioma C6 Zellen effizient Nesprine und ihre Bindungspartner (Plectin) von der Kernhülle verdrängen kann.

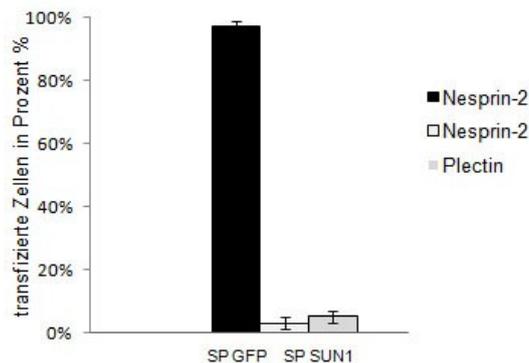


Abb. 5.3.3.: Graphische Darstellung der Auswirkung des SP Sun1 GFP Fusionsproteins auf die endogene Nesprin-2 und Plectin Lokalisation in Glioma C6 Zellen.

Die SP SUN1, jedoch nicht die SP GFP Fusionsproteine verdrängen Plectin und Nesprin-2 von der äußeren Kernhülle in Glioma C6 Zellen. Glioma C6 Zellen exprimierten transient SP SUN1 GFP- oder als Kontrolle SP GFP Fusionsproteine. MeOH-fixierte Zellen wurden mit Nesprin-2 (mAk K20-478-4) und Plectin-spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit sekundären α -Maus (AF 568), bzw. α -Meerschweinchen (AF 568) Alexa Fluor-gekoppelten Antikörpern. Die Zellkerne wurden durch den DAPI Farbstoff visualisiert. In drei unabhängigen Experimenten wurden in je 300 Transgen-exprimierenden Zellen die Anwesenheit der Nesprin-2, bzw. der Plectin Proteine an der Kernmembran ausgezählt und mit Hilfe des Excel Programms graphisch dargestellt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert der Auszählung wieder.

5.3.4. Die transiente Expression von SP SUN1 GFP Fusionsproteinen reduziert die MACF1 Isoform-3 Lokalisation an der Kernmembran.

Als nächstes wurde überprüft, ob die transiente Expression des SP SUN1 Fusionsproteins die Lokalisation von MACF1 Isoform-3 an der Kernhülle in Glioma C6 Zellen tangiert. Glioma C6 Zellen, die SP GFP Fusionsproteine exprimieren, weisen keine Veränderung der MACF1 Isoform-3 Lokalisation an der Kernmembran auf (Abb. 5.3.4. A', Pfeile). In Zellen, die das SP SUN1 GFP Fusionsprotein transient exprimieren, liegt eine Veränderung der MACF1 Isoform-3 Verteilung an der Kernmembran vor (Abb.

5.3.4. B-B'', Pfeile). Eine vollständige Translokation wie für Nesprin-2 und Plectin (Abb. 5.3.2.) gezeigt, kann jedoch hier nicht beobachtet werden. Dennoch weisen SP SUN1 GFP-exprimierende Zellen eine zum Teil deutliche Reduktion der MACF1 Isoform-3 Proteine an der Kernmembran auf (Abb. 5.3.4. B-B'') auf. Glioma C6 Zellen, die eine geringere Proteinmenge des SP SUN1 GFP Fusionsprotein exprimierten (Abb. 5.3.4. B, Stern) haben keinen Einfluss auf die MACF1 Isoform-3 Lokalisation (Abb. 5.3.4. B'). Dies weist darauf hin, dass MACF1 Isoform-3 durch KASH Proteine an der Kernmembran stabilisiert wird. Da jedoch keine vollständige Translokation von MACF1 Isoform-3 zu beobachten ist, scheinen die Nesprine nicht die einzigen Bindungspartner an der Kernhülle für MACF1 Isoform-3 zu sein.

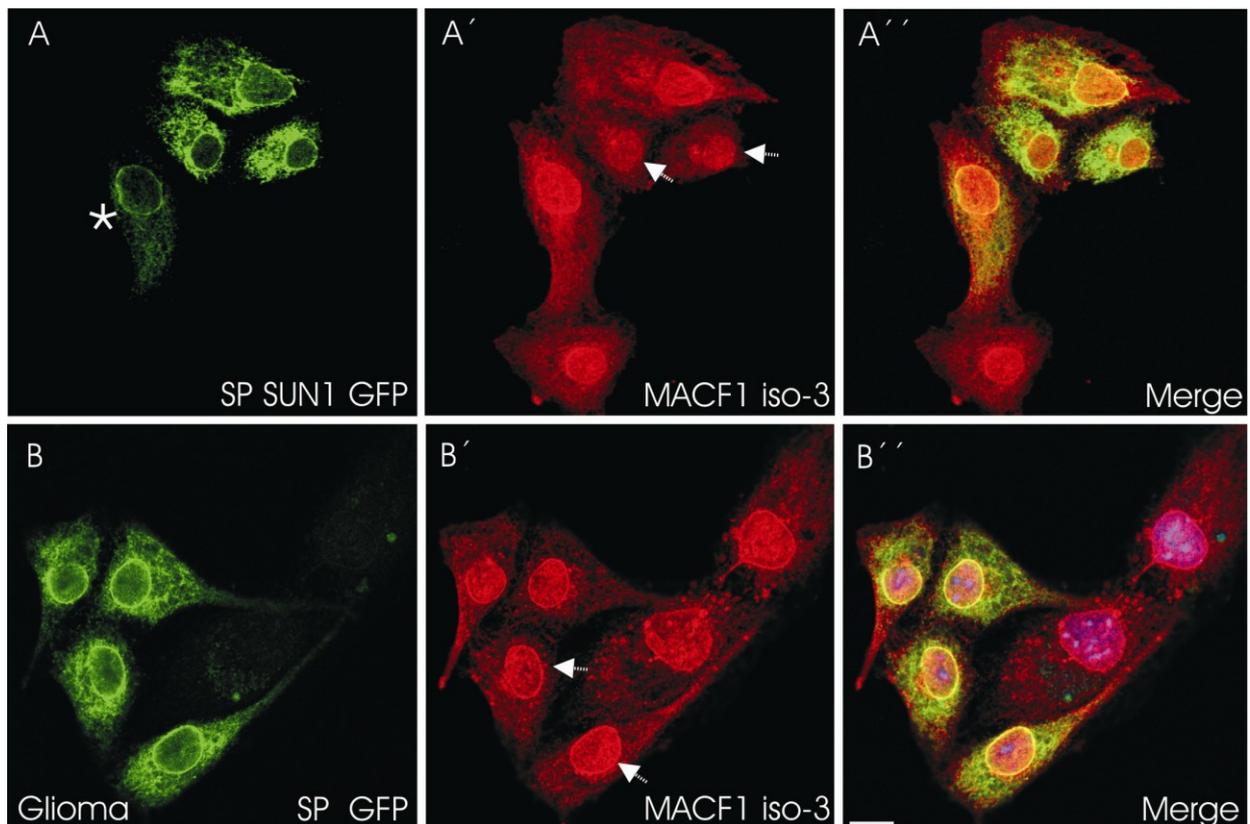


Abb. 5.3.4.: Immunfluoreszenzanalyse der Auswirkung des SP GFP und SUN1 GFP Fusionsproteins auf die endogene MACF1 Isoform-3 Lokalisation in Glioma C6 Zellen.

Durch die Expression von SP SUN1, jedoch nicht durch die SP GFP Fusionsproteine, wird die Lokalisation von MACF1 Isoform-3 an der äußeren Kernhülle in Glioma C6 Zellen reduziert. SP SUN1 GFP oder SP GFP (B) Fusionsproteine lokalisieren entlang des Zellkerns und im Zytoplasma. In SP SUN1 GFP-exprimierenden Zellen (A) wird eine verminderte Lokalisation der endogenen MACF1 Isoform-3 Proteine an der äußeren Kernhülle detektiert. (A'). Die transiente Expression von SP GFP Fusionsproteinen beeinflusst die MACF1 Isoform-3 Lokalisation nicht (B).

Nach der Fixierung der Glioma C6 Zellen mit MeOH wurden diese mit MACF1 Isoform-3 (iso-3 pAb) spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit α -Kaninchen (AF 568) Alexa Fluor-gekoppelten Antikörpern. Balken: 10 μ m.

5.3.5. Das SP SUN1 GFP Fusionsprotein und Mikrotubuli beeinflussen die Lokalisation von MACF1 Isoform-3 an der Kernhülle.

Nesprine genügen für eine effiziente Verankerung der MACF1 Isoform-3 Proteine an der äußeren Kernhülle nicht (Abb. 5.3.4.). Möglicherweise werden additional Mikrotubuli für die Lokalisation von

MACF1 Isoform-3 an der Kernmembran benötigt. Wie in Abb. 3.2.4. B-B'' zu sehen ist, lokalisieren Mikrotubuli sehr prominent an der äußeren Kernmembran in Glioma C6 Zellen und überlagern dort mit MACF1 Isoform-3. Um die Hypothese zu überprüfen wurden Glioma C6 Zellen, die transient SP SUN1 GFP oder SP GFP Fusionsproteine exprimierten, mit 12.5µM Colchizin für 4.5. Stunden inkubiert und in der indirekten Immunfluoreszenz analysiert. Durch diese nachhaltige Behandlung mit Colchizin soll gewährleistet werden, dass alle Mikrotubulifilamente in den Glioma C6 Zellen depolymerisiert sind. Durch das Zusammenspiel der transienten Expression der SP SUN1 GFP Fusionsproteine und der Abwesenheit filamentöser Mikrotubuli ist eine signifikante Reduktion der MACF1 Isoform-3 Verteilung an der äußeren Kernhülle zu beobachten (Abb. 5.3.5. A', Pfeile). In Gegensatz dazu konnten keine nennenswerten Effekte in SP GFP-exprimierenden (Pfeil) oder untransfizierten (Pfeilspitze) Zellen auf die MACF1 Isoform-3 Verteilung an der Kernhülle ermittelt werden (Abb. 5.3.5. B-B'').

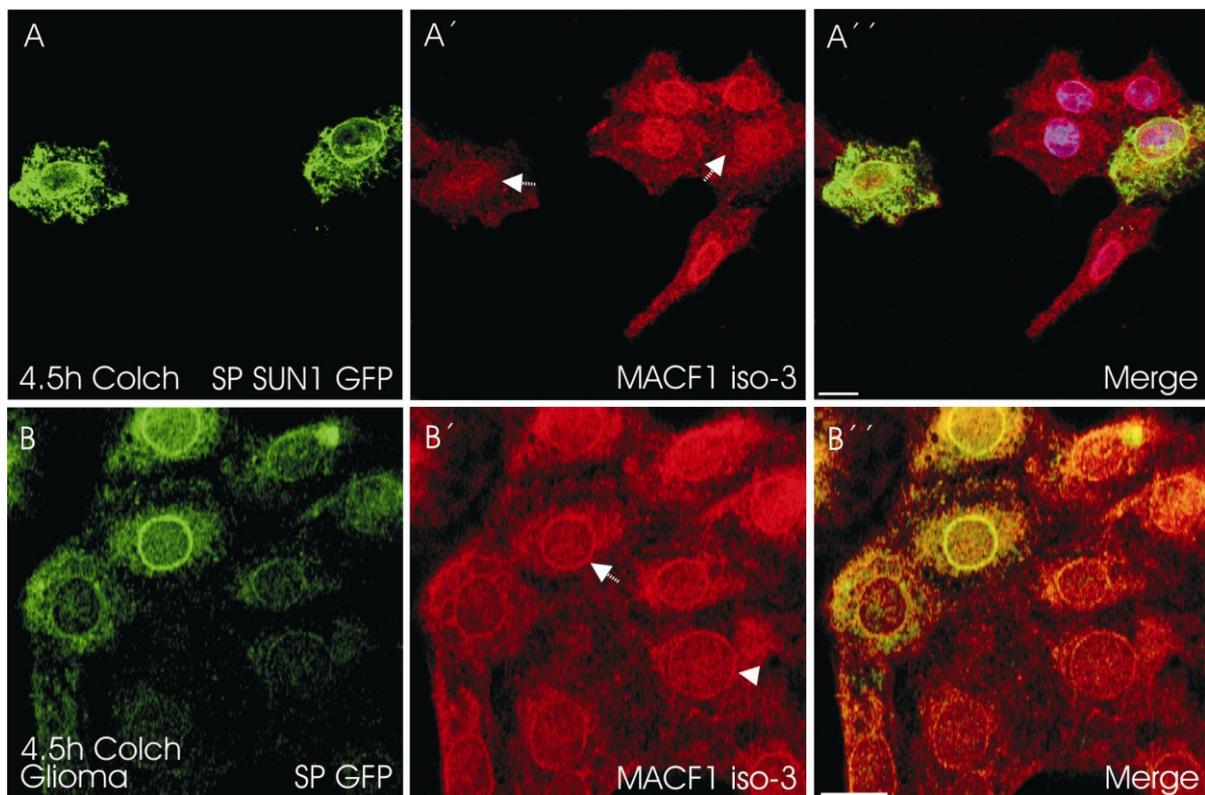


Abb. 5.3.5.: Immunfluoreszenzanalyse der Auswirkung der transienten Expression der SP SUN1 oder SP GFP Fusionsproteine auf die endogene MACF1 Isoform-3 Lokalisation in Glioma C6 Zellen nach einer Colchizin Behandlung.

Die transiente Expression von SP SUN1 GFP und die Abwesenheit von MT-Filamenten reduzieren und verdrängen endogenes MACF1 Isoform-3 von der äußeren Kernhülle (A-A''). SP GFP-exprimierende (Pfeil) und untransfizierte (Pfeilspitze) Zellen weisen keine Veränderung der MACF1 Isoform-3 Lokalisation durch die Colchizinbehandlung auf (B-B''). Pfeile in A' deuten auf das Abhanden sein von MACF1 Isoform-3 an der äußeren Kernhülle in SP SUN1 GFP-exprimierenden Glioma C6 Zellen hin.

Glioma C6 Zellen wurden für 4.5. Stunden mit Colchizin inkubiert. Nach der Fixierung mit MeOH wurden die Zellen mit MACF1 Isoform-3 (iso-3 pAb) spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit α -Kaninchen (AF 568) Alexa Fluor-gekoppelten Antikörper. Balken: 10 µm.

5.3.6. Die transiente Expression der SP SUN1 GFP Fusionsproteine und endogene Mikrotubulifilamente beeinflussen die Lokalisation von MACF1 Isoform-3 an der Kernhülle.

In einer statistischen Analyse wurde die Lokalisation von MACF1 Isoform-3 an der Kernhülle in SP SUN1 oder SP GFP-exprimierenden Zellen unter unterschiedlichen Konditionen evaluiert (Abb. 5.3.6.). Hierbei wurden Zellen, die das SP SUN1 GFP Fusionsprotein exprimierten, mit und ohne Colchizin behandelt. Anschließend wurde die endogene MACF1 Isoform-3 Verteilung an der Kernhülle analysiert. Eine Colchizin-Behandlung an nicht-transfizierten und SP GFP-exprimierenden Glioma C6 Zellen hatte keine Auswirkung auf die endogene MACF1 Isoform-3 Lokalisation an der äußeren Kernhülle (vgl. nicht transfizierte Zellen in Abb.5.3.6.). Daher wurden diese nicht in die statistische Analyse mit einbezogen. Während die Expression des SP GFP Fusionsproteins auf die Lokalisation des MACF1 Isoform-3 Proteins an der Kernhülle keinen Effekt hat, wird dagegen eine Reduktion der MACF1 Isoform-3 Lokalisation an der Kernhülle in etwa 30% der SP SUN1 GFP-exprimierenden Zellen beobachtet. Eine deutliche Reduktion (78%) und Translokation von MACF1 Isoform-3 an der Kernhülle wird erst induziert, wenn Mikrotubulifilamente und die KASH Proteine nicht mehr an der Kernhülle vorhanden sind.

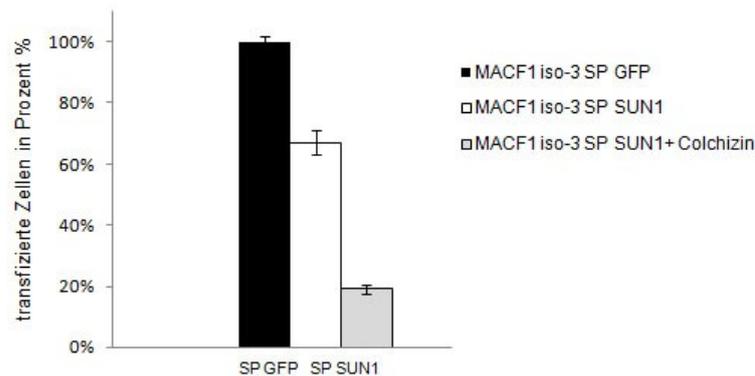


Abb. 5.3.6.: Colchizin-behandelte SP SUN1 positive Glioma C6 Zellen weisen eine deutliche Reduktion der endogenen MACF1 Isoform-3 Lokalisation an der äußeren Kernhülle auf.

Die transiente Expression von SP SUN1 und die Abwesenheit von MT-Filamenten reduzieren und translozieren die endogenen MACF1 Isoform-3 Proteine von der äußeren Kernhülle. Glioma C6 Zellen exprimierten transient SP SUN1 GFP oder als Kontrolle das SP GFP Fusionsprotein. SP SUN1 GFP exprimierende Zellen wurden in einem weiteren Experiment mit 12.5µM Colchizin für 4.5 Stunden inkubiert. Die mit MeOH fixierten Zellen wurden mit MACF1 Isoform-3 (iso-3 pAb) spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit einem sekundären α -Kaninchen (AF 568) Alexa Fluor-gekoppelten Antikörper. Die Zellkerne wurden mittels DAPI Farbstoffen angefärbt. In drei unabhängigen Experimenten wurden in je 300 Transgenexpimierenden Zellen die Anwesenheit des MACF1 Isoform-3 Proteins an der Kernmembran ausgezählt und mit Hilfe des Excel Programms graphisch dargestellt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Auszählung wieder.

5.4. MACF1 Isoform-3 interagiert mit Nesprin-3.

5.4.1. Die N-Termini von MACF1 Isoform-3 und Plectin 1C weisen eine Homologie auf.

In den bisherigen Experimenten wurde gezeigt, dass Nesprine einen Einfluss auf die MACF1 Isoform-3 Lokalisation an der Kernhülle in Glioma C6 Zellen aufweisen. Im Folgenden soll untersucht werden, welches Mitglied der Nesprinfamilie für diese Interaktion verantwortlich ist. Für Nesprin-3 wurde kürzlich gezeigt, dass es die Fähigkeit besitzt, an Plectin 1C zu binden (Wilhemsen *et al.*, 2005). In dieser Studie wurde ebenfalls die ABD Domäne der MACF1 Isoform-2 näher untersucht und gezeigt, dass diese die Möglichkeit aufweist mit Nesprin-3 *in vitro* zu interagieren. In der in Abb. 5.4.1. dargestellten Homologieanalyse wurden die *Homo sapiens* Aminosäurereste von MACF1 Isoform-3 (AS 1-455) und Plectin 1C (AS 1-287) miteinander verglichen. Plectin 1C weist anders als MACF1 Isoform-3 eine CH1 (AS 71-170) Domäne auf. Wie in der Abbildung ersichtlich weisen die N-Termini von Plectin 1C und MACF1 Isoform-3 eine Homologie zueinander und besonders innerhalb der CH2 Domänen auf (Abb. 5.4.1., unterstrichene Aminosäuresequenz). Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde eine mögliche Interaktion von Nesprin-3 überprüft.

```

hPlectin1C      -----MSGEDAEVRAVSEDVSNGSSGSPSP 25
hMACF1iso-3    MGNSLGCFKEPKESIAIPEKAPISPKKRVRFKRRWRGKKIPTPEASHQEETSEGTGVIEE 60
                . : . . * : : . . : * .

hPlectin1C      GDTLPWNLGKTQSRRRSGGGAGSNGSVLDPAERAVIRIADER---DRVQKKTFTKWVNKH 82
hMACF1iso-3    TETLTKLTESLQKEDGVGGVEHTPPDILLPGDSAPNSRVVDRGMIVQKERFQGEVQTAH 120
                : ** . . * : . ** : . : * * : * . . : * : * : : : : . *

hPlectin1C      LIKAQR--HISDLYEDLRDGHNLISLLEVLSGDS-----LPR----- 117
hMACF1iso-3    LLENESSVAGGVWDSLEEGMTVIAHLLDNPAERNCEKSVSQLVEFPRTASCSSRAVLLP 180
                * : . . . : : . * : * : * . . : : * *

hPlectin1C      -----EKGRMRFHKLQNVQIALDYLRHR----- 140
hMACF1iso-3    LQGETAVEKGNIQRGFRSCALPRTDYPTDKGNQEQFSEGWSVEEGTKSVSGAPQTASWII 240
                *** . : : . . ** . :

hPlectin1C      -----QVKLVNIRDDDIADGNPKLTLGLIWTIILH----- 170
hMACF1iso-3    ECSVSSLLLDQPGGQRTEPSHVGVQPPQDSRLPTSQSDLSISGVTVSILPSSSSGYGSDG 300
                : * * : * . . . . * : : . . **

hPlectin1C      -----FQISDIQVSGQSEDMTAKEKL 191
hMACF1iso-3    PHIHG IQPKDTEPEKSSSTSFSEEDGTLSLEASHTPSWGLEEISDIYISGESGDMSAKEKL 360
                : **** : ** : * ** : ****

hPlectin1C      LLWSQRMVEGYQGLRCDNFTSSWRDGRLFNAIIHRHKPLLIDMNKVYRQTNLENLDQAFS 251
hMACF1iso-3    LLWTQKVTAGYTGIKCTNFSSCWSDGKMFNALIHRYPDLVDMERVQIQSNRENLEQAFE 420
                *** : * : . . * * : * * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * *

hPlectin1C      VAERDLGVTRLLDPEVDVDPQPDEKSIITYVSSLYD 287
hMACF1iso-3    VAER-LGVTRLLDAEDVDVPSPDEKSVITYVSSIYD 455
                **** ***** . ***** . ***** : ***** : **

```

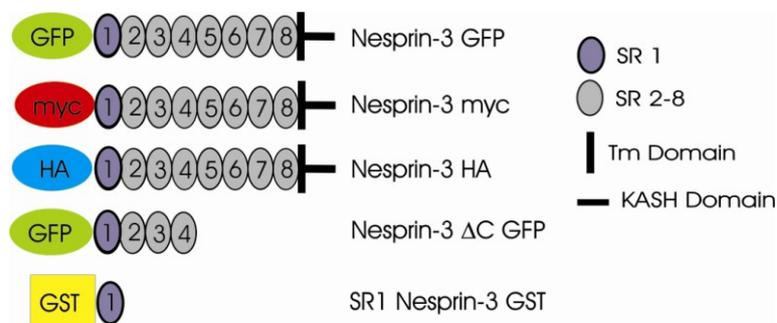
Abb. 5.4.1.: ClustalW Aminosäuresequenzvergleich der N-Termini von MACF1 Isoform-3 und Plectin 1C.

Vergleich der *Homo sapiens* Aminosäurereste von Plectin 1C (AS 1-287) und MACF1 Isoform-3 (AS 1-455). Kleine Aminosäuren sind dargestellt in Rot, saure in Blau, basische in Magenta, Hydroxyl- und Aminogruppen-haltige in Grün. Identische Aminosäuren werden angezeigt (*). Die CH1 Domäne von Plectin 1C befindet sich in der AS 71-170 Position. Die beiden CH2 Domänen von Plectin 1C (AS 179-287) und von MACF1 Isoform-3 (AS 356-455) wurden unterstrichen.

5.4.2. Generierung von Nesprin-3 Fusionsproteinen.

Nesprin-3 (120 kDa) ist der kleinste Vertreter der Nesprinfamilie. Wie alle Proteine dieser Familie weist Nesprin-3 an seinem C-Terminus eine KASH Domäne mit einer Transmembrandomäne auf. Acht Spektrinwiederholungen bilden die im Vergleich zu Nesprin-1 und -2 kurze Stabdomäne (Abb. 5.4.2.). Eine Aktin-bindende Domäne am N-Terminus weist Nesprin-3 nicht auf (Wilhemsen *et al.*, 2005).

Für die Generierung der Fusionsproteine wurde die cDNA des humanen Nesprin-3 Proteins in verschiedene Expressionsvektoren kloniert. Dafür wurden zwei Image Klone der Firma NITE-DOB (Tokyo, Japan) verwendet und die komplette cDNA des humanen Nesprin-3 (AS 1-975) in GFP-, Myc- und HA Expressionsvektoren kloniert (Abb. 5.4.2.). Zusätzlich wurden partielle Fusionsproteine hergestellt. Das SR1 Nesprin-3 GST Fusionsprotein kodiert für die erste Spektrinwiederholung (AS 1-105) und wurde in einen GST Expressionsvektor kloniert, der für Proteininteraktionsanalysen verwendet wurde. Das Nesprin-3 Δ C GFP Fusionsprotein kodiert für die ersten fünf Spektrinwiederholungen (AS 1-429). Dieselbe Sequenz wurde in die Hefe-Zwei-Hybrid Expressionsvektoren pGADT7 und pBKT7 kloniert.

**Abb. 5.4.2.: Schematische Darstellung der Nesprin-3 generierten Fusionsproteine.**

Die Spektrinwiederholungen (SR) von dem humanen Nesprin-3 (AS 1- 975) sind in grau-unterlegten Kreisen dargestellt und durchnummeriert. Das erste SR (AS 1-105) ist in lilafarben Ovalen unterlegt. Die Nesprin-3 Sequenz wurde mit unterschiedlichen Tags (Myc, Rot), (HA, Blau), (GFP, Grün) fusioniert. Die erste SR Domäne wurde mit GST (gelbes Quadrat) fusioniert.

5.5. Die N-Termini von Nesprin-3 und MACF1 Isoform-3 interagieren *in vitro*.

Aufgrund der Ergebnisse des Aminosäuresequenzvergleichs (Abb. 5.4.1.) wurde eine Proteinbindungsanalyse zwischen Nesprin-3 und MACF1 Isoform-3 durchgeführt. Damit sollte überprüft werden ob MACF1 Isoform-3, ähnlich wie Plectin 1C, mit der ersten Spektrinwiederholung (SR1) von Nesprin-3 interagieren kann. Hierfür wurden COS7 Zellen mit eGFP, MACF1 iso3 GFP, MACF1 iso3-CH2 GFP, Nesprin-1 ABD GFP und Nesprin-3 Δ C GFP Plasmide transfiziert und Zelllysate präpariert. Diese Ly-

sate wurden anschließend mit dem SR1 Nesprin-3 GST Fusionsprotein inkubiert und mittels einer Glutathion-Agarose-Matrix Affinitätsaufreinigung präzipitiert. Die an das SR1 Nesprin-3 GST gebundenen Proteinkomplexe wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert. In Abbildung 5.5. (linken Spalte) ist die erfolgreiche Expression der verwendeten GFP Fusionsproteine durch einen GFP Immunoblot validiert. Durch die Immunoblotanalyse des Aktin Proteins wird gezeigt das gleiche Proteinmengen für das Experiment eingesetzt wurden (Abb. 5.5. linker Immunoblot). In der rechten Immunoblotanalyse wurden die mittels der rekombinanten SR1 Nesprin-3 präzipitierten GFP-Fusionsproteine dargestellt. Die eingesetzten Mengen an rekombinanten SR1 Nesprin-3 wurden durch einen GST Immunoblot dargestellt. Wie in der Abbildung 5.5. (linker Immunoblot) zu beobachten ist, interagiert das rekombinante SR1 Nesprin-3 GST Protein nicht mit dem GFP Protein, das hier als Kontrolle verwendet wurde. Des Weiteren kann eine Interaktion des MACF1 Isoform-3 Fusionsproteins mit SR1 Nesprin-3 beobachtet werden. Dabei wird das MACF1 iso3-CH2 GFP Fusionsprotein prägnanter durch das SR1 Nesprin-3 GST Fusionsprotein präzipitiert, als die MACF1 iso3 GFP Fusionsproteine. Die ABD Domäne von Nesprin-1 interagiert ebenfalls mit Nesprin-3. Dieses Ergebnis wurde in unserem Labor in einer ähnlichen Proteininteraktionsstudie verifiziert (persönliche Kommunikation, Dr. I. Karakesisoglou). Weiterhin interagiert das Nesprin-3 ΔC GFP Fusionsprotein mit dem SR1 Nesprin-3 GST Fusionsprotein. Dieses Resultat impliziert die Existenz von Interaktionen zwischen den Nesprin-3 Spektrinsequenzen. Tatsächlich wurde in der kürzlich erschienen Studie von Ketema *et al.*, 2007 konstatiert, dass Nesprin-3 die Möglichkeit aufweist mit sich selbst zu interagieren und Dimere auszubilden.

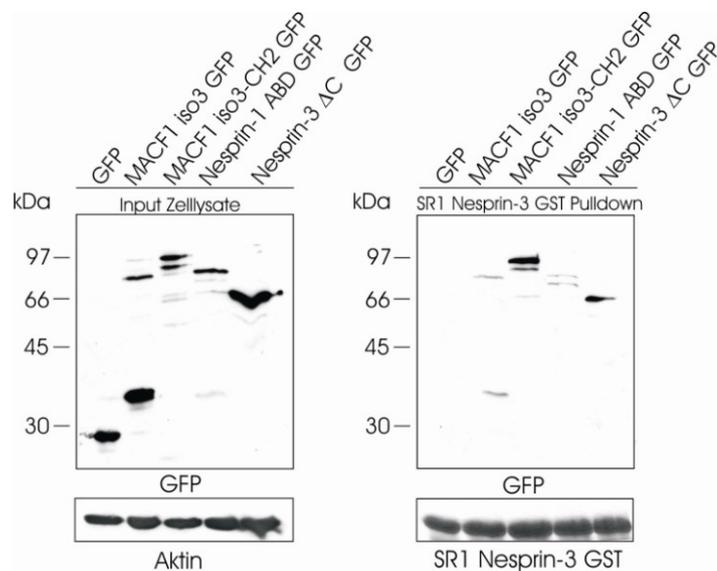


Abb. 5.5.: GST-SR1 Nesprin-3 Bindungsanalysen mit verschiedenen Nesprin-1, MACF1, Nesprin-3 GFP Fusionsproteinen. MACF1 Isoform-3 Fusionsproteine interagieren in einer Proteinbindungsanalyse mit dem ersten Spektrinwiederholung des rekombinanten SR1 Nesprin-3 Protein. COS7 Zellen exprimierten transient eGFP, MACF1 iso3 GFP, MACF1 iso3-CH2 GFP, Nesprin-1 ABD GFP und Nesprin-3 ΔC GFP. Aus diesen Zellen wurden Zellysate hergestellt. Diese wurden als Kontrolle (links) mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF Membran geblottet. Fusionsproteine wurden durch Inkubation mit GFP-spezifischen Antikörpern detektiert. Als Ladekontrolle wurde diese Membran mit β -Aktin-spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Zellysate (rechts) wurden mit den an Glutathion Agarose *Bead-gekoppelten* SR1 Nesprin-3 GST Fusionsproteinen für 4 Stunden inkubiert.

Mittels einer SDS-PAGE wurden diese Komplexe aufgetrennt und auf PVDF Membran geblotet. Die gebundenen Fusionsproteine wurden durch die Immunoblotanalyse des GFP Proteins visualisiert. Als Ladekontrolle wurde dieselbe Membran mit GST-spezifischen Antikörpern inkubiert, die das rekombinante SR1 Nesprin-3 Protein detektierten. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit sekundären α -Maus oder α -Kaninchen Peroxidase-gekoppelten Antikörpern und anschließender Chemilumineszenz.

5.6. Die transiente Expression von Nesprin-3 rekrutiert MACF1 Isoform-3 an die Kernhülle in COS7 Zellen.

Nach der Bestätigung, dass die N-Termini von MACF1 Isoform-3 und Nesprin-3 *in vitro* interagieren können (Abb. 5.5.), sollte nun überprüft werden, ob diese Interaktion auch in Zellen funktional ist. Dafür wurde das Nesprin-3 Protein (Abb. 5.4.2.) in COS7 Zellen transient überexprimiert und anschließend die endogene MACF1 Isoform-3 Verteilung in der indirekten Immunfluoreszenz analysiert. In COS7 Zellen lokalisieren die Plectin und MACF1 Isoform-3 Proteine nur gelegentlich an der äußeren Kernhülle (eigene Beobachtungen). Aus diesem Grunde wurde diese Zelllinie für dieses Experiment verwendet. Wie in der Abbildung 5.6. A dargestellt, lokalisiert das transient exprimierte Nesprin-3 fusioniert zu HA Proteinen in an der äußeren Kernhülle. In dieser Zelle lokalisiert MACF1 Isoform-3 ebenfalls in einer Ringstruktur entlang des Zellkerns (Abb. 5.6. A', Pfeile).

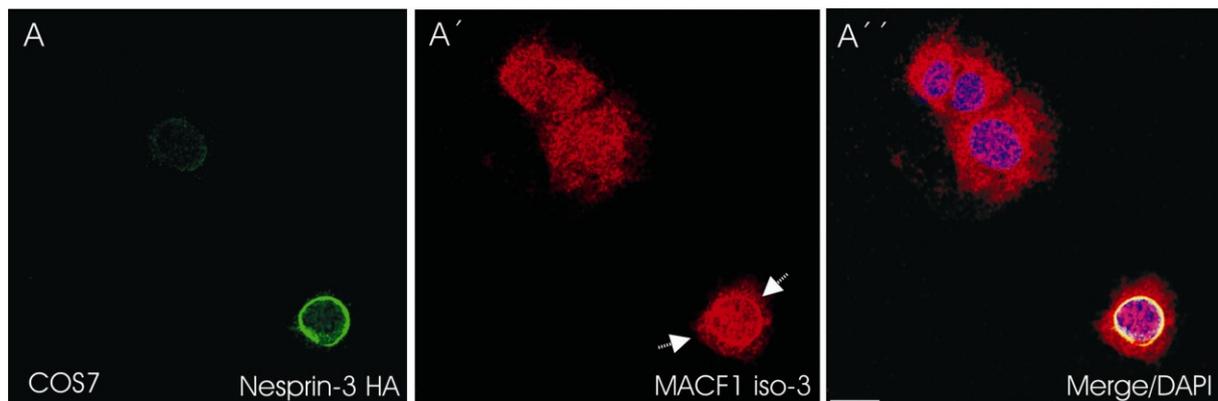


Abb. 5.6.: Immunfluoreszenzanalyse der endogenen Verteilung von MACF1 Isoform-3 in Nesprin-3 über-exprimierenden COS7 Zellen.

Die transiente Expression von Nesprin-3 fusioniert zu HA Proteinen rekrutiert MACF1 Isoform-3 an die Kernhülle in COS7 Zellen. Pfeile (A') deuten auf eine Nesprin-3-positive Zelle (A), in der MACF1 Isoform-3 Proteine (A') an der Kernmembran lokalisieren. COS7 Zellen exprimierten transient das Nesprin-3 HA Fusionsprotein. Nach der Fixierung der Zellen mit MeOH wurden diese mit MACF1 Isoform-3 (iso-3 pAb) und HA-spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit α -Kaninchen (AF 568) und α -Ratte (AF 488) Alexa Fluor-gekoppelten Antikörpern. Die Zellkerne wurden durch den DAPI Farbstoff visualisiert. Balken: 10 μ m.

5.7. Die Mikrotubuli Verteilung an der äußeren Kernhülle in Nesprin-3-positiven COS7 Zellen.

5.7.1. Mikrotubulifilamente beeinflussen die endogene MACF1 Isoform-3 Lokalisation an der äußeren Kernhülle in Nesprin-3-positiven COS7 Zellen.

In weiteren Experimenten wurde die MACF1 Isoform-3 Interaktion in einer statistischen Analyse untersucht und der Interaktion von Plectin 1C mit Nesprin-3 gegenübergestellt. In Abb. 5.3.5-6. wurde gezeigt, dass Mikrotubulifilamente einen Einfluss auf die Verankerung von MACF1 Isoform-3 an der

Kernmembran ausüben. Aus diesem Grund wurde hier statistisch evaluiert, ob MACF1 Isoform-3 ohne die Präsenz von Mikrotubuli und nur durch die transiente Expression von Nesprin-3 HA Fusionsproteinen, an die äußere Kernhülle transloziert wird. Für diesen Zweck exprimierten COS7 Zellen das Nesprin-3 fusioniert zu HA Proteinen und wurden zusätzlich mit Colchizin behandelt. In unbehandelten und nicht-transfizierten COS7 Zellen liegen die MACF1 Isoform-3 bzw. Plectin Proteine in 9% bzw. 8% an der Kernhülle vor (Abb. 5.7.1.). Wird Nesprin-3 transient exprimiert, so lokalisiert MACF1 Isoform-3 in 79% der Transgen-exprimierenden Zellen an der Kernhülle. Plectin lokalisiert dagegen in nahezu jeder Nesprin-3-positiven Zelle (94%) an der äußeren Kernmembran. Wird das Mikrotubuli-Netzwerk durch Colchizin destabilisiert, so lokalisiert MACF1 Isoform-3 nur noch in 22% der Transgen-exprimierenden Zellen an der Kernhülle, während die Plectin 1C-Nesprin-3 Interaktionen unbeeinträchtigt bleiben (96%). Dies deutet auf unterschiedliche Mechanismen in der Verankerung von Plectin 1C und MACF1 Isoform-3 an der äußeren Kernhülle hin.

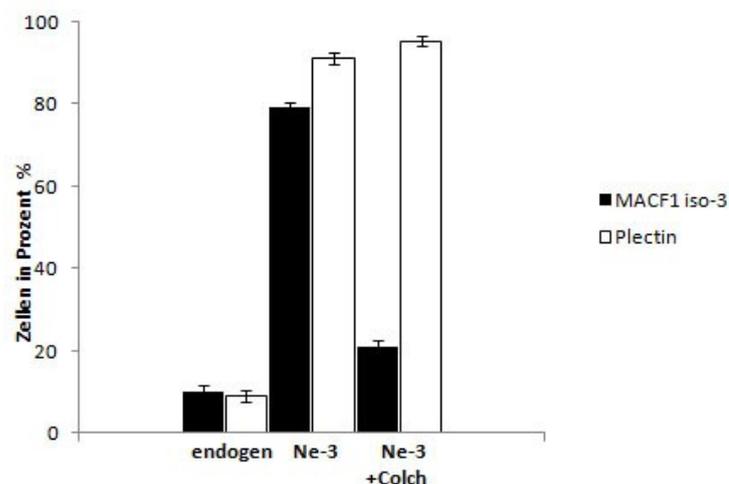


Abb. 5.7.1.: Lokalisation der MACF1 Isoform-3 an der Kernhülle in Nesprin-3-positiven COS7 Zellen und ihr Bezug zu Mikrotubulifilamenten.

MACF1 Isoform-3 wird durch MT-Filamente und durch die transiente Expression von Nesprin-3 fusioniert zu HA Proteinen an der äußeren Kernhülle verankert. In drei unabhängigen Experimenten wurden je 300 COS7 Zellen unter unterschiedlichen Konditionen untersucht: unbehandelte Zellen; Nesprin-3-positive (Ne-3); und Transgen-exprimierende Zellen. Letztere wurden für 4.5 h mit Colchizin (Colch) behandelt. In den jeweiligen Zellen wurde die Anwesenheit des MACF1 Isoform-3 (schwarzer Balken) und des Plectin Proteins (weiser Balken) an der Kernhülle ausgewertet. Dafür exprimierten COS7 Zellen transient das Nesprin-3 HA Fusionsprotein und MeOH-fixierte Zellen wurden mit MACF1 Isoform-3 (iso-3 pAb) spezifischen, bzw. Plectin und HA-spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit sekundären α -Kaninchen (AF 488), bzw. α -Meerschweinchen (AF 568) Alexa Fluor-gekoppelten Antikörpern oder mit sekundären α -Ratte (Cy5) Antikörpern. Die Zellkerne wurden durch den DAPI Farbstoff visualisiert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Auszählung wieder.

5.7.2. Mikrotubulifilamente werden in Nesprin-3-exprimierenden Zellen an der Kernhülle angereichert.

MACF1 Isoform-3 ist ein MT-bindendes Protein (Abb.3.3.2; Abb.3.3.3.) und wie im vorherigen Experiment zu beobachten ist, scheinen Mikrotubulifilamente eine wichtige Rolle auf die Topologie von MACF1 Isoform-3 an der Kernhülle in Nesprin-3-exprimierenden Zellen auszuüben (Abb. 5.7.1.). Aus

diesem Grund wurde in der indirekten Immunfluoreszenz die Lokalisation aller drei Proteine an der Kernmembran eingehender analysiert. In Abbildung 5.7.2. A'' lokalisiert MACF1 Isoform-3 entlang der äußeren Kernhülle in Nesprin-3-positiven COS7 Zellen (Abb. 5.7.2. A', A'', Pfeile). In diesen Zellen können ebenfalls deutlich Mikrotubulifilamente entlang des Zellkerns beobachtet werden, jedoch nicht in untransfizierten Zellen (Abb. 5.7.2. A-A''). In der Vergrößerung ist Lokalisation der Proteine in einer anderen Ebene des der Nesprin-3-positiven Zellkerns dargestellt (Abb. 5.7.2. A-A'''). Hier kolokalisiert MACF1 Isoform-3 entlang der äußeren Kernhülle mit Nesprin-3 und ebenfalls mit Mikrotubulifilamenten. Jedoch wird keine deutliche Überlagerung der MT und Myc-Nesprin-3 beobachtet (Abb. 5.7.2. A-A'', Vergrößerung).

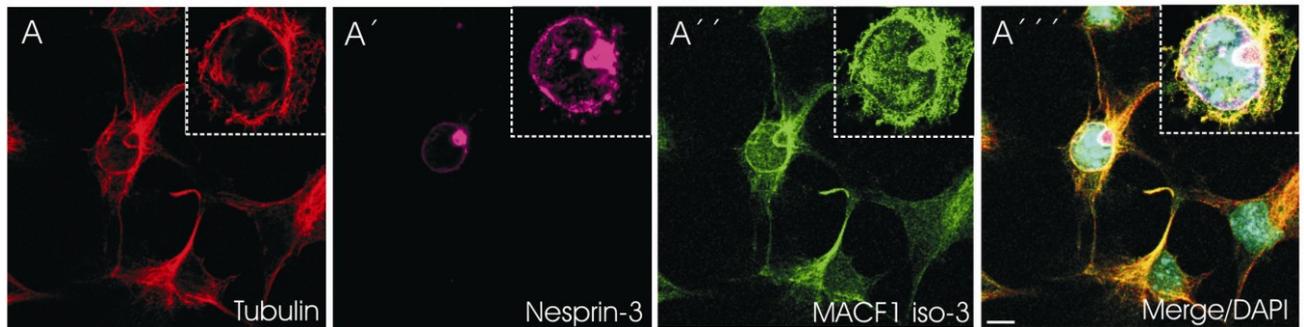


Abb. 5.7.2.: Immunfluoreszenzanalyse der endogenen MACF1 Isoform-3 und Mikrotubuli Lokalisation an der Kernhülle in Nesprin-3 überexprimierenden COS7 Zellen.

In COS7 Zellen wurde transient das Nesprin-3 fusioniert zu Myc Proteinen exprimiert, welches an der äußeren Kernhülle lokalisiert (A'). Dort überlagert es mit Mikrotubuli (A) und MACF1 Isoform-3 (A''). In den eingefügten Vergrößerungen ist der Zellkern der Nesprin-3 positiven Zelle abgebildet. Dort kolokalisiert MACF1 Isoform-3 mit MT-Filamenten und Nesprin-3 an der äußeren Kernhülle (A-A'''). Eine Überlagerung von transient exprimierten Nesprin-3 Proteinen und MT kann nicht beobachtet werden.

Nach der Fixierung der Zellen mit MeOH wurden diese mit A: β -Tubulin (YL 1/2), A': Myc und A'': MACF1 Isoform-3 (iso-3 pAb) spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit α -Maus (AF 633), α -Ratte (AF 568), bzw. α -Kaninchen (AF 488) Alexa Fluor-gekoppelten Antikörpern. Balken: 10 μ m.

5.7.3. Die Präsenz von MACF1 Isoform-3 an der äußeren Kernhülle beeinflusst die MT Organisation.

Im vorherigen Abschnitt wurde dargestellt, dass in Nesprin-3-exprimierenden COS7 Zellen, in denen das MACF1 Isoform-3 Protein an die Kernhülle transloziert, vermehrt Mikrotubulifilamente an der Kernmembran lokalisieren und mit MACF1 Isoform-3 Proteinen dort überlagern (Abb. 5.7.1-2.). Des Weiteren wurde in Abb. 5.7.1. für 22% der Nesprin-3 positiven Zellen gezeigt, dass die MACF1 Isoform-3 Lokalisation an der äußeren Kernhülle durch die Depolymerisation von MT in nicht beeinflusst wurde. Daher wurde als nächstes überprüft, ob MACF1 Isoform-3 eine stabilisierende Wirkung auf die Mikrotubuli an der äußeren Kernhülle ausübt. Aus diesem Grund wurde in Colchizin-behandelten Zellen die Lokalisation von Mikrotubuli, MACF1 Isoform-3 und transient exprimierten Nesprin-3 fusioniert zu HA Proteinen an der Kernmembran eingehender untersucht.

Wie in Abbildung 5.7.3. A-A'' zu sehen ist, wird durch die Colchizin-Behandlung die MT im Zytoplasma vollständig depolymerisiert. Jedoch können in Nesprin-3-exprimierenden Zellen Mikrotubulifilamente an der äußeren Kernhülle detektiert werden (Abb. 5.7.3. A-A'). Diese liegen zudem gebündelt

vor, wodurch sie voluminöser erscheinen (Abb. 5.7.3. A., Pfeil). Nesprin-3 fusioniert zu HA Proteinen und MACF1 Isoform-3 lokalisieren entlang dieser Bündel an der Kernmembran und im Zytoplasma (Abb. 5.7.3. A'-A'', Pfeil). Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass in Nesprin-3 positiven Zellen die MT-Organisation an der Kernmembran verändert vorliegt. Weiterhin deuten diese Experimente an, dass durch die Rekrutierung von MACF1 Isoform-3 in transient exprimierten Nesprin-3 Proteinen Mikrotubulifilamente an der äußeren Kernhülle stabilisiert werden.

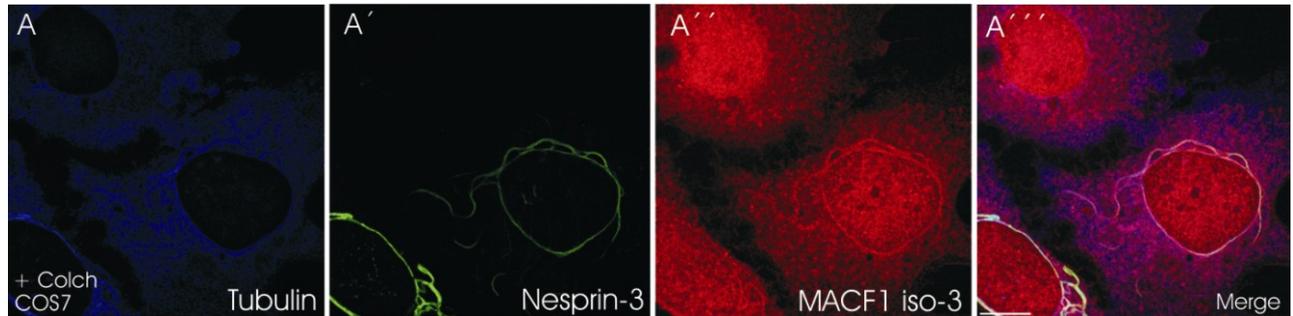


Abb. 5.7.3.: Immunfluoreszenzanalyse der endogenen MACF1 Isoform-3 Lokalisierung an der Kernmembran in Nesprin-3 überexprimierenden Zellen nach Colchizin Behandlung.

Die Präsenz von MACF1 Isoform-3 in Nesprin-3-positiven Zellen stabilisiert MT-Filamente in Colchizin-behandelten Zellen an der äußeren Kernhülle ist dargestellt. COS7 Zellen, die das Nesprin-3 fusioniert zu HA Proteinen transient exprimieren (A'), wurden für 4,5 Stunden mit Colchizin inkubiert. In diesen Zellen lokalisieren nicht-polymerisierte MT-Filamente (A) an der äußeren Kernhülle. MACF1 Isoform-3 Proteine lokalisieren diffus im Zytoplasma und im Zellkern (A''). Des Weiteren wird eine prominente Ring-ähnliche Struktur entlang des Nukleus in Nesprin-3 positiven Zellen beobachtet, die mit den MT-Filamenten und dem Transgen überlagern (A'''). Nach der Fixierung der COS7 Zellen mit MeOH wurden diese mit A: β -Tubulin (WA3), A': HA und A'': MACF1 Isoform-3 (iso-3 pAb) spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit einem α -Maus (AF 633), α -Ratte (AF 488) bzw. α -Kaninchen (AF 568) Alexa Fluor-gekoppelten Antikörpern. Balken: 10 μ m.

5.8. Nesprin-3 interagiert mit MACF1 Isoform-3 *in vitro* und *in vivo*.

5.8.1. Nesprin-3 und MACF1 Isoform-3 interagieren im Hefe-Zwei-Hybrid System.

Mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems wurde untersucht, ob Nesprin-3 direkt mit MACF1 Isoform-3 interagieren kann. Als Positivkontrolle wurde die Interaktion zwischen Plectin 1C und Nesprin-3 überprüft. Als Negativkontrolle diente die GAL4 Transkriptionsdomäne des pGADT7 Expressionsvektor. Abbildung 5.8.1. zeigt in einer Tabelle die verwendeten Fusionskonstrukte. Daneben sind die entsprechend kotransformierten, auf Selektionsmedien ausgestrichenen Y190 Hefezellen, gezeigt. PGADT7-Nesprin-3 Δ C und pGBKT7-Plectin 1C kotransformierte Zellen wachsen auf den Selektionsplatten und waren zusätzlich positiv für den β -Galactosidasetest (Abbildung 5.8.1.). Im Vergleich dazu interagierte MACF1 Iso3-CH2 mit Nesprin-3 Δ C auch, jedoch wird eine schwächere β -Galactosidase Färbung (Abb. 5.8.1) beobachtet. Die ausgestrichenen Hefe Y190 Hefezellen, die den Leervektor pGADT7 und pGBKT7-Nesprin-3 Δ C exprimieren, können nicht auf den Selektionsplatten wachsen und weisen keine Blaufärbung auf (Abb. 5.8.1). Diese Ergebnisse zeigen, dass Nesprin-3 und MACF1 Isoform-3 über ihre N-Termini *in vivo* miteinander interagieren können.

pGADT-7	pGBKT-7
Nesprin-3 Δ C	Plectin 1C
Nesprin-3 Δ C	MACF1 iso3-CH2
Nesprin-3 Δ C	pGADT-7



Abb. 5.8.1.: Hefe-Zwei-Hybrid Analyse der *in vivo* Interaktion zwischen Nesprin-3 und MACF1 Isoform-3.

Y190 Hefe wurden mit den pGADT7-Nesprin-3 Δ C und pGBKT7-Plectin 1C (AS 1-339), pGADT7-Nesprin-3 Δ C und pGBKT7-MACF1 iso 3-CH2 oder pGADT7-Nesprin-3 Δ C und den Leervektor pGBKT7 transformiert. Die kotransformierten Hefen wurden für einen Wachstumstest auf SD Selektionsplatten (-Trp/-Leu/-His) ausgestrichen und das Wachstum wurde nach 3 Tagen analysiert. Entsprechend wurden die kotransformierten Y190 Hefezellen für den β -Galaktosidase Test auf den Selektionsplatten ausgestrichen und für drei Tage wachsen gelassen. Anschließend wurden die Hefen durch flüssigen Stickstoff aufgebrochen und durch Zugabe von X-Gal wurde das β -Galactosidase Markerprotein angefärbt.

5.8.2. MACF1 Isoform-3 interagiert mit transient-exprimierten Nesprin-3 Myc Fusionsproteinen *in vivo* in COS7 Zellen.

Um das Ergebnis der Hefe-Zwei-Hybrid Analyse in COS7 Zellen zu validieren, wurde eine Immunpräzipitation (IP) durchgeführt. Dafür wurde das Nesprin-3 Myc Fusions- bzw. das Myc Epitop (Kontrolle) transient in COS7 Zellen exprimiert und mit Hilfe eines Myc-spezifischen Antikörpers präzipitiert. Die gebundenen Immunkomplexe wurden mit spezifischen Antikörpern analysiert (Abb. 5.8.2.). Die Spezifität des Ansatzes wurde durch eine Silberfärbung der immunpräzipitierten Komplexe evaluiert (Abb. 5.8.2. B). In den mit Silbernitrat gefärbten Gelen konnte die Anwesenheit von schweren und leichten Ketten des eingesetzten Antikörpers sichtbar gemacht werden.

Wie in Abb. 5.8.2. A zu beobachten ist, detektiert der iso-3 pAb das MACF1 Isoform-3 Protein in COS7 Zelllysaten in einem komplexen Bandenmuster. In der Kontrollimmunpräzipitation wird MACF1 Isoform-3 nicht detektiert, jedoch in dem Nesprin-3 Myc Immunpräzipitat (Abb. 5.8.2. A). Dabei wird nur eine MACF1 Isoform-3 Bande im hochmolekularen Bereich detektiert (Abb. 5.8.2. A, Pfeil). Als Kontrolle, um eine erfolgreiche IP zu demonstrieren, wurde die Membran mit Myc und Plectin-spezifischen Antikörpern inkubiert (Abb. 5.8.2. A). Eine deutliche Anreicherung des Nesprin-3 Myc Transgens und des endogenen Plectin Proteins, im Vergleich zum Input, ist festzustellen (Abb. 5.8.2.). Diese Daten verdeutlichen, dass MACF1 Isoform-3 *in vivo* mit Nesprin-3 interagieren kann.

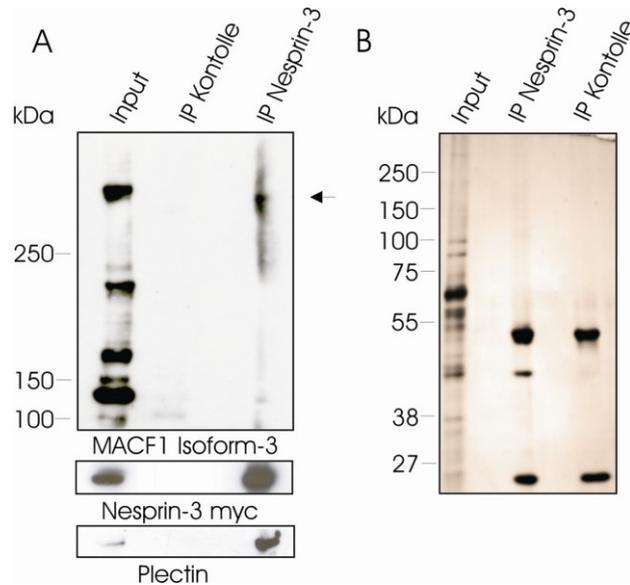


Abb. 5.8.2.: A. SDS-PAGE Immunoblotanalyse der Immunkomplexe aus Nesprin-3 transient-exprimierenden COS7 Zellen. B. Silberfärbung der SDS-PAGE.

A. Transient-exprimierte Nesprin-3 Myc Fusionsproteine interagieren mit endogenen MACF1 Isoform-3 Proteinen. COS7 Zellysate, die das Nesprin-3 fusioniert zu Myc Proteinen exprimierten wurden über Nacht mit Myc spezifischen Antikörpern inkubiert und mit Hilfe von Sepharose A Beads präzipitiert. Die Immunkomplexe wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF Membran geblotet. Diese Membran wurde mit iso-3 pAb-spezifischen Antikörpern inkubiert. Das Fusionsprotein wurde mittels der Immunoblotanalyse durch Myc-spezifische Antikörper detektiert. Als Kontrolle wurde diese Membran mit Plectin spezifischen Antikörpern inkubiert. Der Pfeil deutet auf das MACF1 Isoform-3 präzipitierte Protein. In B ist eine Silberfärbung der Immunpräzipitation abgebildet. Immunkomplexe und COS7 Zellysate wurden mittels der SDS-PAGE aufgetrennt. In den mit Silbernitrat gefärbten Gelen konnte die Anwesenheit von schweren (55 kDa) und leichteren (25 kDa) Ketten des eingesetzten Myc Antikörpers sichtbar gemacht werden.

5.8.3. MACF1 Isoform-3 interagiert mit Nesprin-3 *in vitro*.

Es wurde in Wilhemsen *et al.*, 2005 konstatiert, dass Plectin 1C mit der ersten Spektrinwiederholung des Nesprin-3 Proteins interagiert. Die Proteininteraktionsanalyse in Abb. 5.5. zeigt, das MACF1 Isoform-3 ebenfalls eine Affinität zu dieser Domäne aufweist. Eine Kompetition zwischen Plectin 1C und MACF1 Isoform-3 um diese Bindedomäne, konnte in den bisherigen Experimenten nicht beobachtet werden (Abb. 5.7.2.). Aus diesem Grunde wurde in einer weiteren Proteininteraktionsanalyse untersucht, ob möglicherweise weitere Spektrinwiederholungen für die Interaktion von MACF1 Isoform-3 mit Nesprin-3 wichtig sind. Hierfür wurden rekombinante SR Nesprin-3 GST Proteine, die für die Spektrinwiederholungen 1-3 (SR1 Nesprin-3 GST (AS 1-105), SR1+SR2 Nesprin-3 GST (AS 1-229) und SR1+SR2+SR3 Nesprin-3 GST (AS 1-325)) kodieren, verwendet. Diese wurden mit COS7 Zellen, die transient MACF1 iso3-CH2 GFP- oder Plectin 1C GFP-Fusionsproteine exprimierten, inkubiert. Mittels einer Glutathion-Agarose-Matrix wurden die rekombinanten GST Proteine, und die damit interagierenden GFP Fusionsproteine, präzipitiert. Diese wurden durch GFP-spezifische Antikörper in der Immunoblotanalyse visualisiert (Abb. 5.8.3.). Die für die Interaktion eingesetzten Mengen der verschiedenen rekombinanten SR Nesprin-3 GST Proteine wurde durch das Anfärben des GST-Markierungsprotein visualisiert (Abb. 5.8.3., unterer Teil des Immunoblots). Es konnte gezeigt werden, dass die MACF1 iso3-CH2 GFP Fusionsproteine mit den drei verschiedenen rekombinanten Nesprin-3 SR Proteinen interagieren (Abb. 5.8.3.). Die Plectin 1C GFP Fusionsproteine präzipitieren ebenfalls mit

allen verwendeten rekombinanten SR Nesprin-3 GST Proteinen, am prominentesten jedoch mit dem SR1+SR2+SR3 Nesprin-3 GST Fusionsprotein. Für die Interaktion von MACF1 iso3-CH2 und SR1+SR2 Nesprin-3 GST wird eine geringere Menge an GFP Fusionsproteinen präzipitiert. Dies kann darauf zurück geführt werden, dass ebenfalls etwas weniger des rekombinanten Proteins eingesetzt wurde.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass für eine Interaktion zwischen MACF1 Isoform-3 und Nesprin-3 die erste SR Domäne notwendig ist. Weiterhin intensiviert die SR3 Domäne von Nesprin-3 die Menge an präzipitierten Plectin und MACF1 Isoform-3 Protein. Möglicherweise beinhaltet die SR3 Domäne zusätzliche Bindungsstellen für das Plectin Protein oder induziert die Bildung höher geordneter Strukturen.

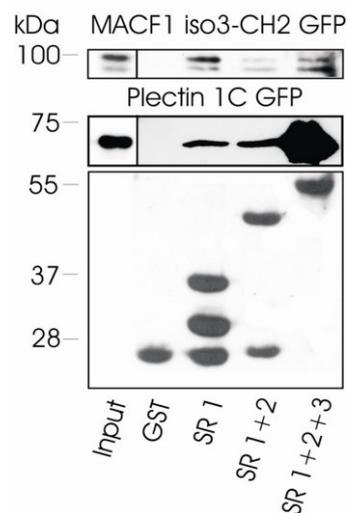


Abb. 5.8.3.: GST-Nesprin-3 Bindungsanalysen implizieren *in vitro* Interaktionen zu Plectin und MACF1 Isoform-3 Proteinen. Rekombinante GST oder GST Fusionsproteine zu Nesprin-3 (SR1 GST, SR1+2 GST, SR1+2+3 GST) wurden an Glutathion-Agarose-Matrix gekoppelt und mit MACF1 iso3-CH2 GFP (AS 1-449) oder Plectin 1C GFP (AS 1-339)-exprimierenden COS7 Zelllysaten inkubiert und anschließend präzipitiert. Die Versuchsansätze wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF Membran geblottet. Fusionsproteine wurden durch Inkubation mit GFP spezifischen Antikörpern in Immunoblotanalysen detektiert. Als Ladekontrolle wurde diese Membran mit GST-spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit einem sekundären α -Maus, bzw. α -Kaninchen Peroxidase-gekoppelten Antikörper und anschließender Chemilumineszenz.

6. MACF1 Isoform-3 lokalisiert im Zellkern und assoziiert mit Kernproteinen.

Für ein Mitglied der Spektraplakinfamilie ist die beobachtete Lokalisation von MACF1 Isoform-3 im Zellkern ungewöhnlich (Abb. 3.2.1). Aus diesem Grunde wurde die nukleäre Verteilung in den folgenden Experimenten eingehender examiniert und im Kontext der putativen Modifikationen (HMG Box, NLS) untersucht.

6.1. Die Verteilung des MACF1 Isoform-3 Proteins während des Zellzyklus.

Wie in Abbildung 3.2.1. E zu beobachten ist, lokalisiert MACF1 Isoform-3 an den Spindelpolen und entlang kondensierter Chromosomen. Aus diesem Grund wurde die Lokalisation von MACF1 Isoform-3

während des Zellzyklus in 3T3 Fibroblasten charakterisiert. In Abbildung 5.1. sind 3T3 Zellen in verschiedenen Zellzyklusstadien der Mitose dargestellt, in denen die MACF1 Isoform-3, Mikrotubuli und Histon 1 Verteilung durch spezifische Antikörper visualisiert wurde. Während der Prophase akkumuliert MACF1 Isoform-3 an den Centrosomen und zeigt eine strahlenförmige, filamentöse Verteilung auf, die mit Mikrotubulifilamenten überlagert (Abb. 6.1. A-A'') Während der Metaphase verteilt sich MACF1 Isoform-3 entlang der mitotischen Spindel. Auch hier lokalisiert das Protein mit Mikrotubuli (Abb. 6.1. B-B''). Zusätzlich kann eine partielle Überlagerung des MACF1 Isoform-3 Proteins mit den kondensierten Chromosomen entlang der Metaphaseplatte beobachtet werden (Abb. 6.1. B-B''). In der Zytokinese wird das Protein im Zytoplasma exprimiert, wobei es angereichert an dem kontraktilen Ring und an den MTOCs/Centrosomen vorliegt (Abb. 6.1. C-C''). Die hier beschriebene Verteilung des MACF1 Isoform-3 Proteins entlang der Mikrotubuli und chromosomalen Strukturen deutet an, dass dieses Protein eine Funktion in der Zellteilung besitzt.

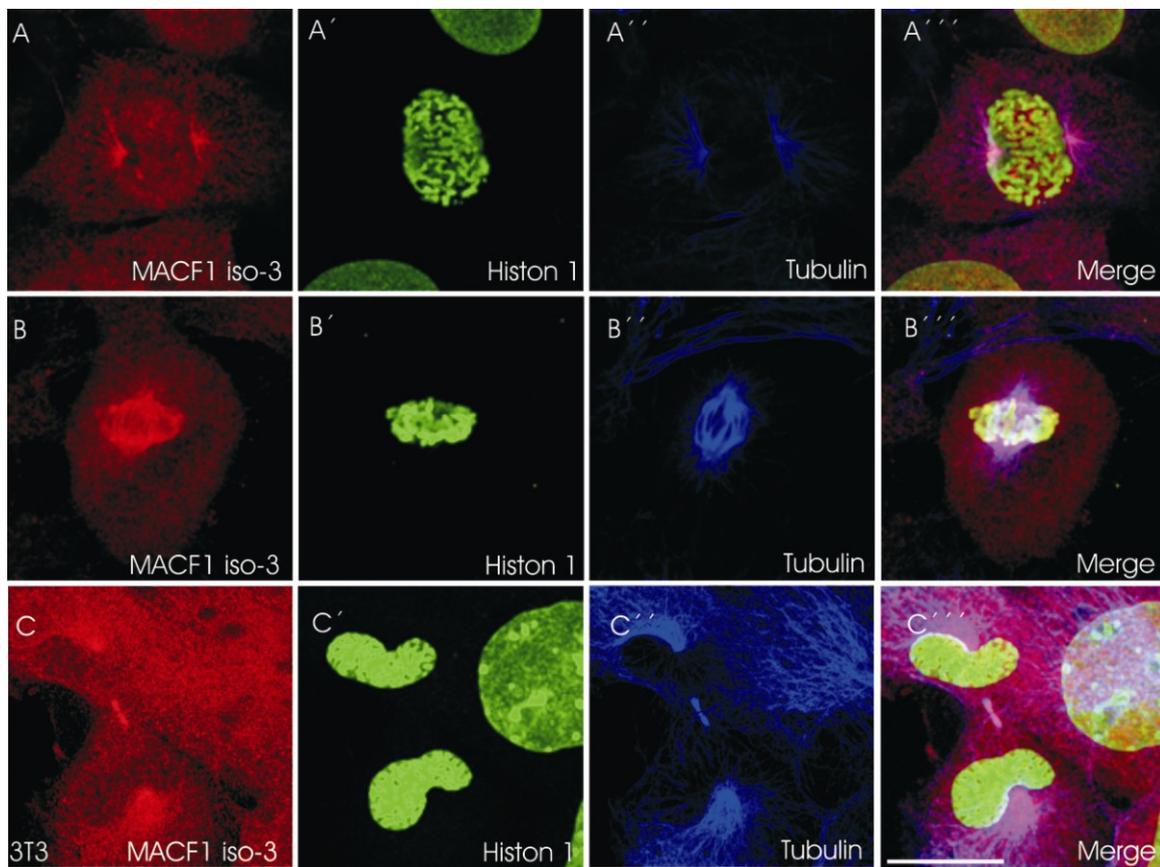


Abb. 6.1.: Immunfluoreszenzanalyse der MACF1 Isoform-3 Verteilung in verschiedenen Stadien des Zellzyklus.

In A-A'' ist eine mitotische Zelle in der Prophase dargestellt. Hier lokalisiert MACF1 Isoform-3 mit MT (A''). In der Metaphase überlagert MACF1 Isoform-3 (B) partiell mit kondensierten Chromosomen (B') und entlang der MT (B''). Während der Zytokinese wird MACF1 Isoform-3 an den Centrosomen und verstärkt am kontraktilen Ring exprimiert und überlagert hier ebenfalls mit MT (C''). 3T3 Fibroblasten wurden mit MeOH fixiert und in einer Dreifachfärbung mit MACF1 Isoform-3 (iso-3pAb) (A, B, C), Histon 1 (H1) (A', B', C') und Mikrotubuli (YL ½) (A'', B'', C'')-spezifischen und Antikörpern inkubiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit sekundären α -Maus- (AF 488) bzw. α -Kaninchen (AF 568) oder α -Ratte (Cy 5) Alexa Fluor-gekoppelten Antikörpern. Balken: 10 μ m.

6.2. MACF1 Isoform-3 interagiert mit Chromatin.

In der MACF1 Isoform-3 spezifischen Proteininteraktionsanalyse, die in unserem Labor durchgeführt wurde, konnten Histon 1c, und 1d als Interaktionspartner identifiziert werden (persönliche Kommunikation, Dr. I. Karakesisoglou). Weiterhin wird in der Aminosäuresequenz des N-Terminus von MACF1 Isoform-3 eine putative HMG Box postuliert (Abb. 1.1.). Aus diesen Gründen wurde hier in einer Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) evaluiert, ob MACF1 Isoform-3 mit Chromatin interagieren kann. Hierfür wurde Formaldehyd vernetztes Chromatin von sonifizierten HaCaT Zellkernextrakten mit MACF1 Isoform-3 spezifischen Antikörpern (iso-3 pAb) inkubiert. Nach der Immunpräzipitation wurden die Proteine durch eine Proteinase K Behandlung entfernt. Die präzipitierte DNA wurde in der PCR Analyse, unter Verwendung von GAPDH spezifischen Primern, analysiert. Diese Primer binden an die 5'UTR Gensequenz von GAPDH. Antikörper, gerichtet gegen die RNA Polymerase II, wurden als Positivkontrolle und unspezifische Antikörper (negativ IgG) als Negativkontrolle verwendet. Wie in Abb. 6.2. dargestellt, kann das GAPDH DNA Fragment durch MACF1 Isoform-3 Antikörper kopräzipitiert werden. Jedoch nicht durch die Kontrollantikörper (negativ IgG). Dieses Experiment zeigt, dass MACF1 Isoform-3 mit Chromatin interagieren kann.

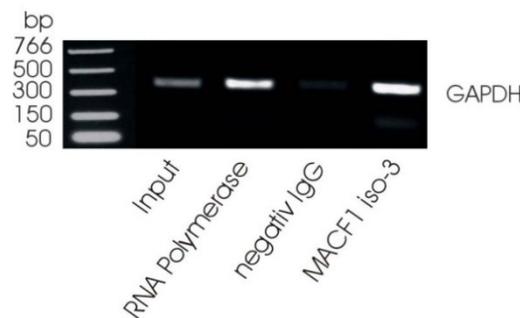


Abb. 6.2.: Semi-quantitative PCR Analyse der MACF1 Isoform-3 Chromatin Immunpräzipitation aus HaCaT Zellkernextrakten.

MACF1 Isoform-3 interagiert mit Chromosomen. Formaldehyd vernetzte HaCaT Zellkernextrakten wurde sonifiziert und mit RNA Polymerase II, unspezifischen IgGs und MACF1 Isoform-3 (iso-3 pAb) Antikörpern inkubiert. Nach der Immunpräzipitation wurden die Proteine durch die Proteinase K Behandlung entfernt. Die präzipitierte DNA wurde als Template für eine semi-quantitative PCR (25 Zyklen) mit GAPDH-spezifischen Primern eingesetzt. Die PCR Produkte wurden auf ein 1%iges Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die DNA durch Ethidimbromid angefärbt.

7. Das MACF1 Isoform-3 Protein weist verschiedene subzelluläre Verteilung auf.

Während der Durchführung dieser Arbeit wurde gezeigt, dass MACF1 Isoform-3 eine vielseitige Lokalisation innerhalb der Zelle aufweist. In der Analyse der Domänenstruktur wurden einige potentielle Phosphorylierungen vorausgesagt, die im Zusammenhang mit Wachstumsfaktoren (EGF, TGF) stehen. Solche Regulationsmechanismen sind für Proteine beschrieben, die eine dynamische Regulierung und Lokalisation innerhalb der Zelle aufweisen. In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob MACF1 Isoform-3 solch eine dynamische Lokalisation aufweist und wie diese reguliert werden kann.

7.1. Durch Serumentzug transloziert MACF1 Isoform-3 aus dem Kern und kolokalisiert mit Mitochondrien.

Der Serumentzug während der Kultivierung von Zellen, stellt eine einfache, aber effiziente Methode zur Überprüfung dar, ob das zu untersuchende Protein durch Wachstumsfaktoren in seiner Lokalisation beeinflusst wird (O'Keefe *et al.*, 1983; zur Übersicht Prather *et al.*, 1999). Aus diesem Grunde wurden 3T3 Fibroblasten ohne Serum für 2 Tage unter Zellkulturbedingungen gehalten. Anschließend in der indirekten Immunfluoreszenz die subzelluläre Verteilung von MACF1 Isoform-3 untersucht. In 3T3 Fibroblasten lokalisiert MACF1 Isoform-3 unter den üblichen Zellkulturbedingungen im Zellkern und innerhalb des gesamten Zytoplasmas (Abb. 7.1. A). Durch den zweitägigen Serumentzug wird MACF1 Isoform-3 im Zellkern deutlich reduziert (Abb. 7.1.B., Pfeilspitzen). Zusätzlich verändert sich auch die zytoplasmatische Verteilung des Proteins, da es nicht länger an der Zellperipherie (Abb. 7.1. B-B'', Stern) und im Zellkern (Abb. 7.1. B, B'', Pfeil) zu detektieren ist. Stattdessen lokalisiert MACF1 Isoform-3 in diskreten zytosolischen Strukturen, die an Mitochondrien erinnern (Abb. 7.1. B, B'', Pfeilspitze). Um zu überprüfen, ob es sich bei diesen Strukturen um Mitochondrien handelt, wurden die 3T3 Fibroblasten mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Mitochondrienmarker (Mito-Tracker) inkubiert. Wie in Abb. 7.1. C-C'' zu sehen, ist das MACF1 Isoform-3 Protein unter Serumentzug an Mitochondrien lokalisiert, da beide Färbungen überlagern.

Diese Ergebnisse deuten an, MACF1 Isoform-3 durch Wachstumsfaktoren beeinflusst werden kann. Zudem kolokalisiert das Protein mit Mitochondrien, wenn kein Serum im Medium vorhanden ist.

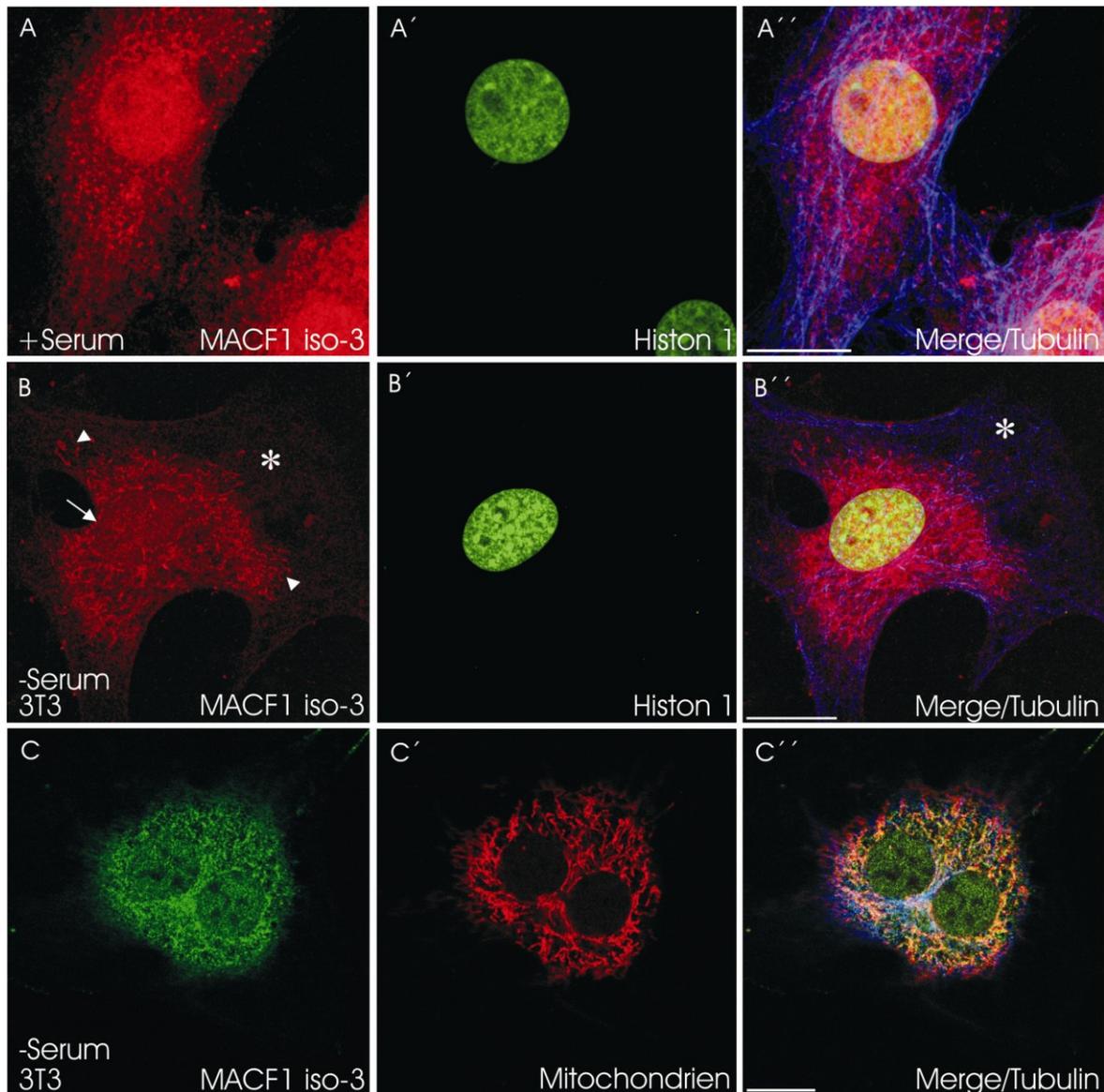


Abb. 7.1.: Immunfluoreszenzanalyse der MACF1 Isoform-3 Verteilung in 3T3 Fibroblasten unter Serumentzug.

MACF1 Isoform-3 Proteine lokalisieren in 3T3 Fibroblasten, die unter Standardbedingungen kultiviert wurden, im Zellkern und im Zytoplasma (A). In Zellen, die ohne Serum für zwei Tage wuchsen, wird eine deutliche Reduktion von MACF1 Isoform-3 im Zellkern detektiert. Dabei lokalisiert das Protein nicht mehr im gesamten Zytoplasma, sondern in prominenten Strukturen (B). Um das Zytoskelett zu visualisieren wurden MT angefärbt (A', B', C'). Die prominenten Strukturen, in denen MACF1 Isoform-3 (C) lokalisiert, überlagern mit dem Mitochondrienmarker (C'). Der Pfeil deutet auf den Zellkern hin. Pfeilspitzen verweisen auf die zytoplasmatischen MACF1 Isoform-3 Strukturen. Der Stern markiert das Abhanden sein von MACF1 Isoform-3 im Zytoplasma.

3T3 Fibroblasten wurden mit 3%igem PFA fixiert. In einer Dreifachfärbung wurden die Zellen mit MACF1 Isoform-3 (iso-3 pAb) (A, B, C), Histon 1 (H1) (A', B') und Mikrotubuli (Y1 1/2) (A'', B'', C'') spezifischen und Antikörpern inkubiert. Die Mitochondrien wurden durch einen TRITC-gekoppelten interkalierenden Farbstoff (Mito-Tracker) für 30 min bei 37°C mit den Zellen inkubiert, die anschließend mit 3%igem PFA fixiert wurden. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit sekundären α -Maus (AF 488), α -Kaninchen (AF 568 (A, B) oder AF488 (C), bzw. α -Ratten (AF 633) Alexa Fluor-gekoppelten Antikörpern. Balken: 10 μ m.

7.2. Das DISC1 (*Disrupted in Schizophrenia 1*) Protein interagiert mit MACF1 Isoform-3.

Um zu klären wie MACF1 Isoform-3 an die Mitochondrien binden kann, wurde in der Fachliteratur nach Proteinen gesucht, die sowohl mit diesen Zellorganellen als auch mit MACF1 Isoform-3 interagieren können. Ein Protein, das ebenfalls an die Mitochondrien bindet, ist das DISC1 (*Disrupted in Schizophrenia 1*) Protein (Millar et al., 2005). Dieses Protein wurde in einem Hefe-Zwei-Hybrid Screen als

Bindungspartner der MACF1 Isoform-3 identifiziert (Camargo *et al.*, 2006). In den nächsten Experimenten wurde eine mögliche Interaktion der beiden Proteine untersucht.

7.2.1. Das transient-exprimierte DISC1 HA Fusionsprotein lokalisiert mit MACF1 Isoform-3 in COS7 Zellen.

Um die konstatierte Interaktion zwischen DISC1 und MACF1 Isoform-3 in COS7 Zellen zu validieren, wurde ein Konstrukt verwendet (Ozeki *et al.*, 2003), das für die vollständige murine cDNA des DISC1 Proteins kodiert und mit HA fusioniert ist. Dieses wurde in COS7 Zellen transient überexprimiert. Anschließend wurde in diesen Zellen die endogene Verteilung von MACF1 Isoform-3 in der indirekten Immunfluoreszenz untersucht. Das transient-exprimierte DISC1 Protein lokalisiert in einer punktförmigen Struktur im Zytoplasma. Wie in Abbildung 7.2.1. zu sehen ist, verändert MACF1 Isoform-3 seine zytoplasmatische Lokalisation in DISC1 positiven Zellen. Es akkumuliert in Bereichen, die mit dem DISC1 Verteilungsmuster kolokalisieren (Abb. 7.2.1. A-A'' Vergrößerung und Pfeile).

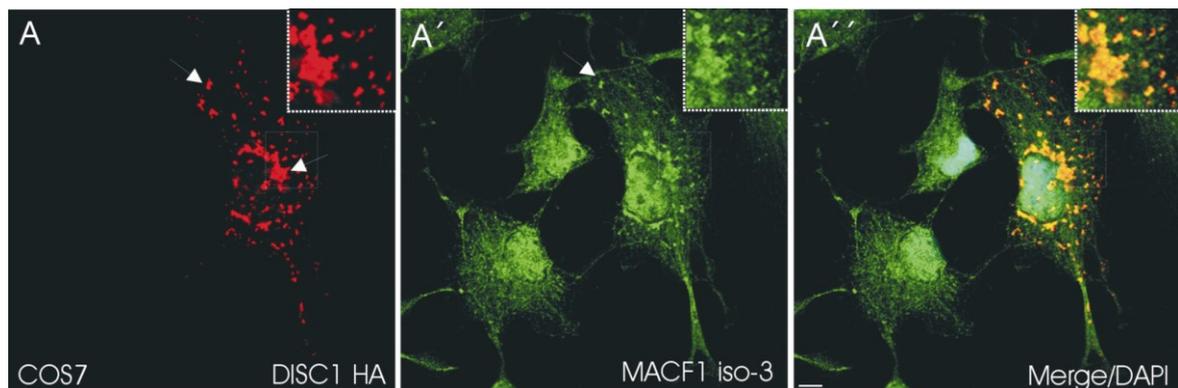


Abb. 7.2.1: Immunfluoreszenzanalyse der endogenen MACF1 Isoform-3 Verteilung in DISC1 HA-exprimierenden COS7 Zellen.

Transientes-exprimiertes DISC1 fusioniert zu HA Proteinen lokalisiert in punktförmigen Strukturen im Zytoplasma (A). MACF1 Isoform-3 akkumuliert ebenfalls in diesen Strukturen (A'). Pfeile deuten auf die punktförmigen Akkumulationen des DISC1 Proteins hin, die mit endogenem MACF1 Isoform-3 Proteinen kolokalisieren. COS7 Zellen wurden mit MeOH fixiert und mit HA- und MACF1 Isoform-3 (Iso-3 pAb) spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit sekundären α -Ratte (AF 568) oder α -Kaninchen (AF 488) Alexa Fluor-gekoppelten Antikörpern. Zellkerne wurden durch den DAPI Farbstoff visualisiert. Balken: 10 μ m.

7.2.2. Die transiente Expression des DISC1 Proteins beeinflusst die Lokalisation von MACF1 Isoform-3 und Mitochondrien.

Der N-Terminus des DISC1 Proteins interagiert mit Mitochondrien (Millar *et al.*, 2005). Aus diesem Grunde wurde mit Hilfe von Expressionsstudien erörtert, ob MACF1 Isoform-3 durch die Interaktion mit dem DISC1 Protein an Mitochondrien assoziieren kann. Hierfür wurde das DISC1 HA Fusionsprotein in COS7 Zellen transfiziert und die Lokalisation der Mitochondrien und des MACF1 Isoform-3 Proteins in der indirekten Immunfluoreszenz analysiert. Durch die transiente Expression des DISC1

Proteins wird eine Umverteilung und Akkumulation der Mitochondrien in dieser Zelle beobachtet (Abb. 7.2.2. A-A''). Eine vergleichende Auswirkung weist die transiente Expression auf das endogene MACF1 Isoform-3 Protein auf (Abb. 7.2.2. A').

Diese Daten zeigen, dass die DISC1 Überexpression die Verteilung der Mitochondrien und des MACF1 Isoform-3 Proteins im Zytoplasma moduliert.

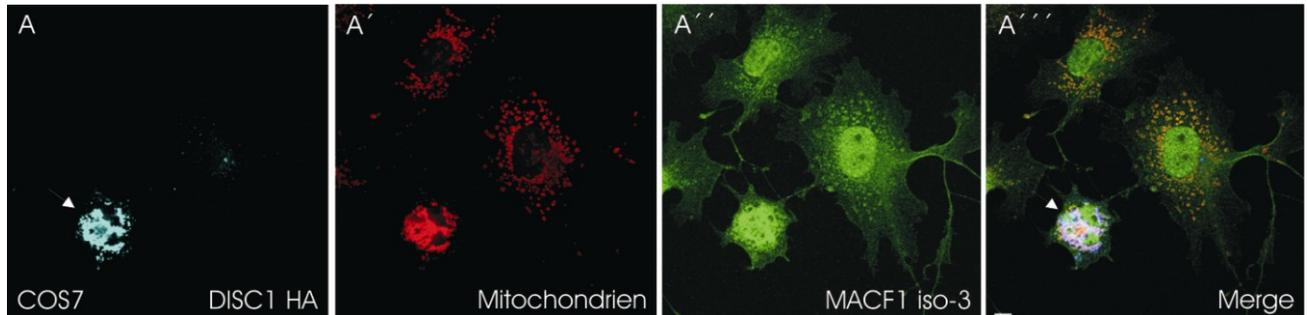


Abb. 7.2.2.: Immunfluoreszenzanalyse der endogenen MACF1 Isoform-3 und Mitochondrien Verteilung in DISC1 exprimierenden COS7 Zellen.

Die transiente Expression von DISC1 fusioniert zu HA Proteinen (A) akkumuliert in COS7 Zellen. Ebenfalls zeigen die Mitochondrien (A') und die MACF1 Isoform-3 (A'') eine subzelluläre Relokalisation und Überlagerung mit dem Transgen auf (A-A'''). Der Pfeil deutet auf die DISC1-positive Zelle hin. COS7 Zellen wurden mit MeOH fixiert und mit HA- und MACF1 Isoform-3 (Iso-3 pAb) spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Mitochondrien wurden durch einen TRITC-gekoppelten interkalierenden Farbstoff (Mito-Tacker) für 30min bei 37°C mit den Zellen inkubiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit sekundären α -Ratte (AF 568), α -Kaninchen (AF 488) Alexa Fluor-gekoppelten Antikörpern. Zellkerne wurden durch den DAPI Farbstoff visualisiert. Balken: 10 μ m.

7.2.3. Die endogenen DISC1 und MACF1 Isoform-3 Proteine weisen eine ähnliche subzelluläre Verteilung in Glioma C6 Zellen auf.

Mit Hilfe der Expressionsstudien konnte eine Beziehung zwischen dem transient exprimierten DISC1 und endogenen MACF1 Isoform-3 Proteinen gezeigt werden. In den nächsten zwei Experimenten wurde die endogene Verteilung und Interaktion der beiden Proteine in Glioma C6 Zellen untersucht. Diese Zelllinie wurde aufgrund ihres neuronalen Ursprungs ausgewählt, da das DISC1 Protein essentielle Funktionen im Gehirn ausübt (siehe Einleitung). In Abbildung 7.2.3. ist die endogene DISC1 und MACF1 Isoform-3 Verteilung in der indirekten Immunfluoreszenz dargestellt. Die beiden Proteine kolo-kalisieren im Zellkern entlang der Kernmembran und im Zytoplasma (Abb. 7.2.2. A-A'', Pfeile).

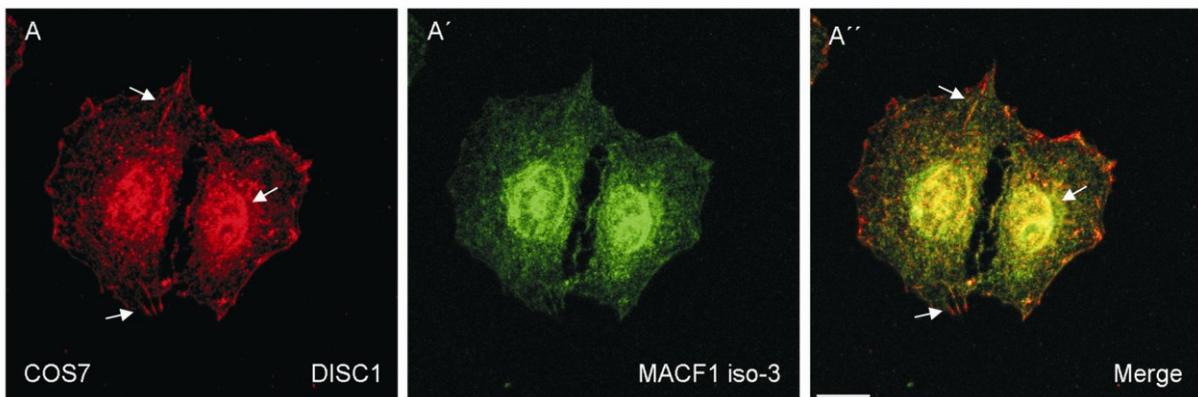


Abb. 7.2.3: Immunfluoreszenzanalyse der endogenen MACF1 Isoform-3 und DISC1 Verteilung in Glioma C6 Zellen.

Das endogene DISC1 Protein lokalisiert im Zytoplasma, entlang und innerhalb des Zellkernes und weist eine heterogene kortikale

Verteilung auf (A). MACF1 Isoform-3 kolokalisiert mit DISC1 entlang und innerhalb des Zellkernes sowie im Zytoplasma. Pfeile deuten auf die Überlagerung der beiden Proteine hin. Glioma C6 Zellen wurden mit MeOH fixiert und mit DISC1(C-20) und MACF1 Isoform-3 (iso-3 pAb) spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit sekundären α -Ziege (AF 568), α -Kaninchen (AF 488) Alexa Fluor-gekoppelten Antikörpern. Balken: 10 μ m.

7.2.4. MACF1 Isoform-3 und DISC1 interagieren *in vivo*.

Weiterführend wurde die konstatierte Interaktion von MACF1 Isoform-3 und DISC1 durch eine Immunpräzipitation an Glioma C6 Zellen verifiziert. Dafür wurde das MACF1 Isoform-3 Protein mit Hilfe des iso-3 pAb Antikörpers immunpräzipitiert. Anschließend wurden die MACF1 Isoform-3 spezifischen Immunkomplexe auf das Vorhandensein des DISC1 Proteins mittels einer Immunoblotanalyse untersucht. Wie in Abb. 7.2.4. A durch den Pfeil gekennzeichnet, wurden die große Isoform-3 von MACF1 sowie einige weitere Banden im niedermolekularen Bereich präzipitiert. Um die Spezifität der Immunpräzipitation zu beurteilen, wurde das Aktin Protein angefärbt, da dieses Protein nicht mit MACF1 Isoform-3 interagiert (Abb. 2.2.). Außer in den Zelllysaten konnte Aktin nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der MT-bindenden Fähigkeit von MACF1 Isoform-3 (Ab. 3.3.2 und Abb. 3.3.3), wurde hier als Positivkontrolle das Tubulin Protein immunologisch nachgewiesen. Dieses konnte es in den Zelllysaten (Input) und in der MACF1 Isoform-3 spezifischen Immunkomplexen, nicht jedoch in der Kontrollimmunpräzipitation, detektiert werden.

In Glioma C6 Zelllysaten werden mehrere Banden des DISC1 Proteins detektiert (Abb. 7.2.4. B). Die Angaben stimmen mit dem detektierten Bandenmuster (120, 140, 150 kDa) überein (zur Übersicht Ishizuka *et al.*, 2006; James *et al.*, 2004). In dem Immunoblot der MACF1 Isoform-3 spezifischen Immunkomplexe kann eine Bande bei ca. 120 kDa des DISC1 Proteins visualisiert werden.

Um zu zeigen, dass die Immunpräzipitation erfolgreich war, wurde zusätzlich zu den internen Kontrollen (Tubulin und Aktin) eine Silberfärbung der Ansätze durchgeführt (Abb. 7.2.4. C). In den mit Silbernitrat gefärbten Gelen konnte die Anwesenheit der schweren Ketten des eingesetzten Antikörpers in den Immunpräzipitationen sichtbar gemacht werden.

Diese Daten zeigen, dass MACF1 Isoform-3 mit dem DISC1 Protein *in vivo* interagieren kann.

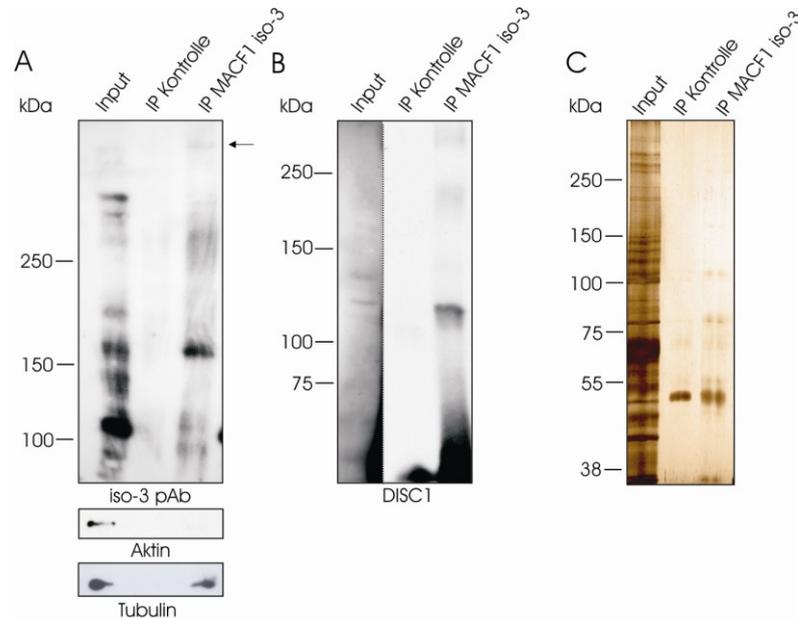


Abb. 7.2.4.: MACF1 Isoform-3 interagiert *in vivo* mit DISC1 in Glioma C6 Zellen. A. Immunpräzipitation des endogenen MACF1 Isoform-3 Proteins mittels des iso-3 pAb Antikörpers. B. Immunoblotanalyse des DISC1 Proteins in MACF1 Isoform-3 spezifischen Immunkomplexen. C Silberfärbung der immunpräzipitierten Komplexe nach einer SDS-PAGE.

Glioma C6 Zellen wurden über Nacht mit MACF1 Isoform-3 (iso-3 pAb) spezifischen Antikörpern inkubiert und mit Hilfe von Sepharose A Beads präzipitiert. Die Immunkomplexe wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF Membran geblotet. Diese Membran wurde mit iso-3 pAb-spezifischen Antikörpern inkubiert. As Kontrolle wurde die Membran mit β -Aktin und β -Tubulin (WA3) spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit sekundären α -Maus, bzw. α -Kaninchen Peroxidase-gekoppelten Antikörper und anschließender Chemilumineszenz. Der Pfeil deutet auf die große Isoform des MACF1 Isoform-3 Proteins hin. In B wurden die MACF1 Isoform-3 spezifischen Immunkomplexe mit DISC1 (rb-DISC1) spezifischen Antikörpern inkubiert. In C ist eine Silberfärbung der Immunpräzipitation dargestellt. Gleiche Mengen des Inputs und der Immunkomplexe wurden aufgetragen und in der SDS-PAGE aufgetrennt. Die 55 kDa Bande zeigt die schwere leichte Kette des iso-3 pAb Antikörpers.

7.3. Eine erhöhte Calcium-Ionen Konzentration verändert die Lokalisation von MACF1 Isoform-3 in HaCaT Zellen.

Auf der Suche nach möglichen Regulationsmechanismen, die die subzelluläre Verteilung von MACF1 Isoform-3 tangieren, wurde der Einfluss von Calcium-Ionen evaluiert. Die Zugabe von Calcium könnte einerseits direkt an das Calcium-bindende Motiv (EF Hand Domänen) im C-Terminus von MACF1 Isoform-3 binden oder als zellulärer Botenstoff die Aktivierung von verschiedenen Signaltransduktionskaskaden imitieren (Mcilwain *et al.*, 1977; Lichtenstein und Rodbard, 1987; zur Übersicht Bootman und Berridge, 1995).

Für diesen Zweck wurden HaCaT Zellen in der Anwesenheit von einer erhöhten Calcium-Konzentration (2 mM) im Medium über Nacht kultiviert und anschließend in der indirekten Immunfluoreszenz analysiert. Durch die Calcium-Ionen Zugabe kann eine Reorganisation der MACF1 Isoform-3 subzellulären Verteilung observiert werden. MACF1 Isoform-3 lokalisiert nicht mehr in dem Zellkern (Abb. 7.3. B, Pfeilspitzen), dafür wird es angereichert im Zytoplasma detektiert (Abb. 7.3. B, Pfeil). Eine ähnliche Lokalisation wurde auch in primären murinen Keratinozyten beobachtet (Abb. 3.2.1. C-C'').

Diese Ergebnisse zeigen, dass MACF1 Isoform-3 durch Calcium-Ionen reguliert werden kann.

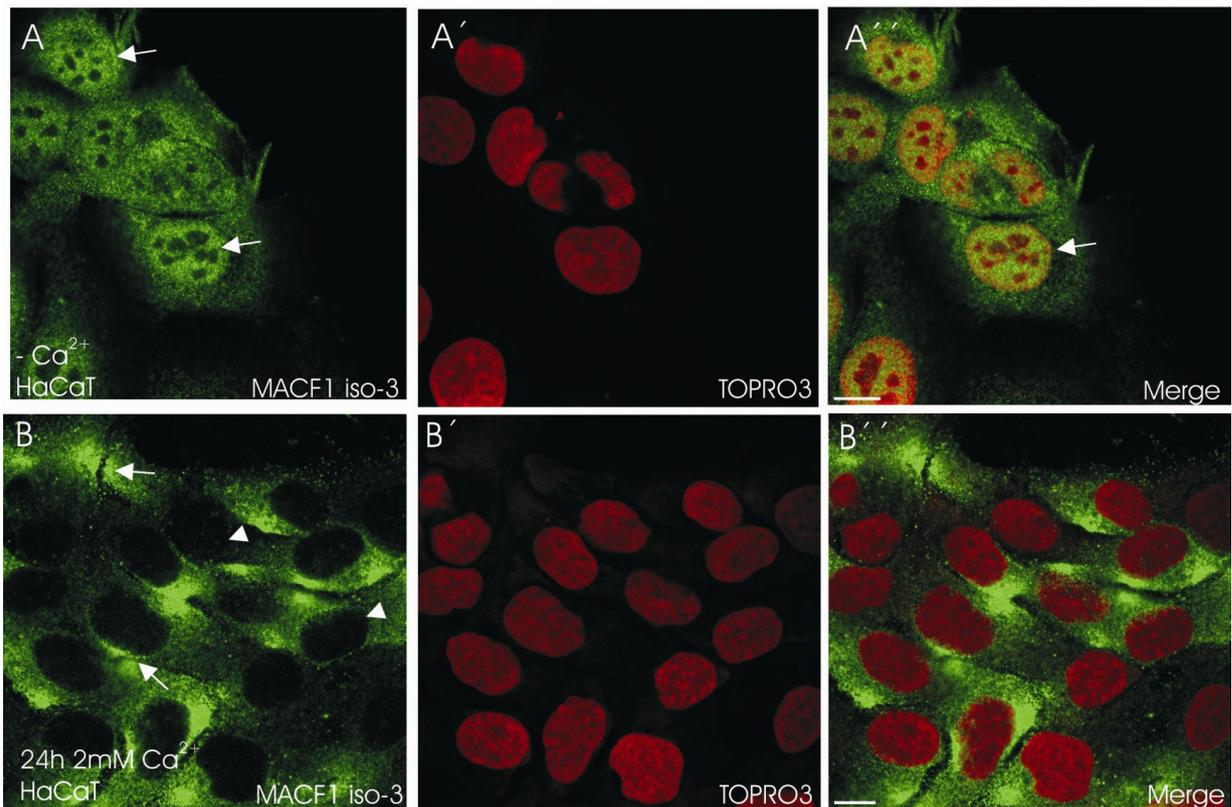


Abb.7.3.: Immunfluoreszenzanalyse der endogenen MACF1 Isoform-3 Verteilung in HaCaT Zellen in Abhängigkeit von Calcium-Ionen.

Die MACF1 Isoform-3 Proteine lokalisieren in HaCaT Zellen, die unter Standardbedingungen kultiviert wurden, im Zellkern und im Zytoplasma (A-A''). Durch die Kultivierung über Nacht in einer erhöhten Calcium-Konzentration (2 mM) im Medium wird MACF1 Isoform-3 im Zytoplasma, jedoch nicht im Zellkern beobachtet (B-B''). Die Pfeile deuten auf die MACF1 Isoform-3 Proteine im Zytoplasma hin. Pfeilspitzen verweisen auf die Zellkerne, in denen kein MACF1 Isoform-3 Protein detektiert wird.

HaCaT Zellen wurden mit MeOH fixiert. Die Zellen wurden mit MACF1 Isoform-3 (iso-3 pAb) spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit sekundären α -Kaninchen (AF 488) Alexa Fluor-gekoppelten Antikörpern. Die Zellkerne wurden mit dem TROPO Farbstoff visualisiert. Balken: 10 μ m.

7.4. Wachstumsfaktoren beeinflussen die Lokalisation von MACF1 Isoform-3.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass das MACF1 Isoform-3 eine dynamische Verteilung innerhalb der Zelle besitzt, die mit einer Reduktion der nukleären Lokalisierung einhergeht. In den nun folgenden Experimenten soll überprüft werden, wie eine Anreicherung des nukleären MACF1 Isoform-3 Verteilung induziert werden kann. In 1.1. wurden putative Phosphorylierungsstellen vorhergesagt, die auf eine mögliche Regulation durch die Wachstumsfaktoren HGF und TGF hinwiesen. Dies wurde in den folgenden Experimenten überprüft.

7.4.1. HGF induziert eine Translokation des MACF1 Isoform-3 Proteins aus dem Zytoplasma und von den Zell-Zell-Kontakten in den Kern.

Der Wachstumsfaktor HGF/SF (*hepatocyte growth factor / scatter factor*) ist ein multifunktionaler Faktor, der vielfältige moto-, mito- und morphogenetische Effekte auf Zellen ausübt (Harvey *et al.*, 1998). Er hat die Fähigkeit, Epithelverbände zu dissoziieren (zur Übersicht Gherardi *et al.*, 1993). Deshalb wurde für die folgenden Versuche Nierenepithelzellen (Madin-Darby Canine Kidney MDCK) verwen-

det. In MDCK Zellen lokalisiert MACF1 Isoform-3 entlang der Zell-Zell-Kontakte (Abb. 7.4.1. A, Pfeil), im Zytoplasma und im Zellkern (Abb. 7.4.1. A). In diesen Zellen lokalisiert β -Catenin diffus im Zytoplasma und entlang der Zell-Zell-Kontakte (Abb. 7.4.1. A). Durch Zugabe des Wachstumsfaktors HGF dissoziieren die Zellen und Zell-Zell-Kontakte werden aufgelöst. Wie in Abb. 7.4.1. B-B' zu sehen ist, transloziert MACF1 Isoform-3 von Zell-Zell-Kontakten (Abb. 7.4.1. B, Pfeile) und reichert sich im Kern an. β -Catenin lokalisiert noch entlang der verbleibenden Zell-Zell-Kontakte und reichert sich ebenfalls in den Zellkernen an (Abb. 7.4.1. B').

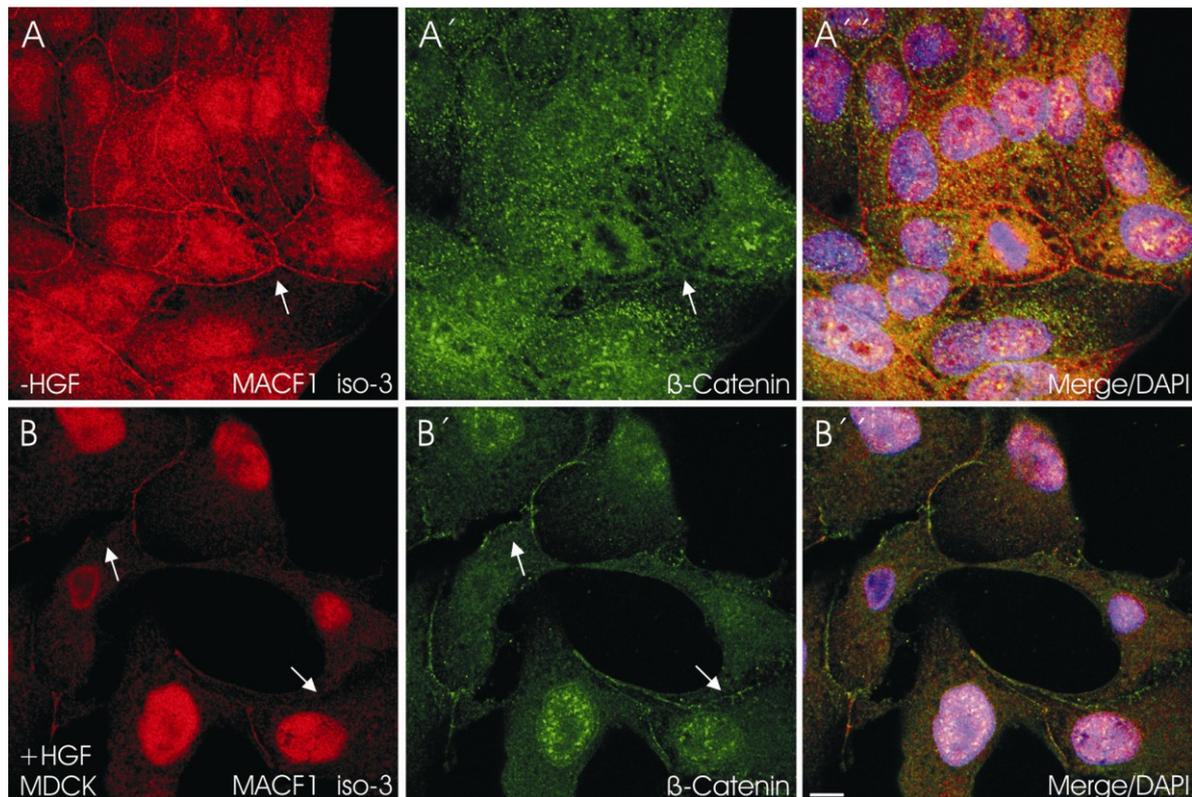


Abb. 7.4.1.: Immunfluoreszenzanalyse der endogenen MACF1 Isoform-3 Verteilung in MDCK Zellen nach Zugabe von HGF. MACF1 Isoform-3 lokalisiert in MDCK Zellen entlang von Zell-Zell-Kontakten, im Zytoplasma und im Zellkern (A). β -Catenin wird im Zytoplasma und an den Zell-Zell-Kontakten detektiert (A'). Durch die Kultivierung der Zellen über Nacht mit HGF (10 ng/ml) (B-B') lokalisierte MACF1 Isoform-3 prominent im Zellkern. Die zytoplasmatische Verteilung und die Lokalisierung an den Zell-Zell-Kontakten waren jedoch deutlich reduziert (B). β -Catenin wurde prominent im Zellkern und an den noch vorhandenen Zell-Zell-Kontakten detektiert (B'). MDCK Zellen wurden mit MeOH fixiert. Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden MACF1 Isoform-3 (iso-3 pAb), und β -Catenin-spezifischen Antikörpern verwendet. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit sekundären α -Kaninchen (AF 568), bzw. α -Maus (AF 488) Alexa Fluor-gekoppelten Antikörpern. Die Zellkerne wurden durch den DAPI Farbstoff visualisiert. Balken: 10 μ m.

7.4.2. TGF- β induziert eine Translokation von MACF1 Isoform-3 in den Kern.

TGF- β ist ein weiterer Wachstumsfaktor, der in Fibroblasten die Proliferation anregt (zur Übersicht Roberts *et al.*, 1986; Wenner und Yan, 2003) und die EGF Rezeptor Signalkaskade (zur Übersicht Schevning *et al.*, 2002; Murillo *et al.*, 2005, 2007), wie der HGF Faktor, aktivieren kann. Im Anschluss an 7.4.1. wurde in 3T3 Fibroblasten die Wirkung dieses Wachstumsfaktors auf die subzelluläre MACF1 Isoform-3 Verteilung untersucht. Dafür wurden die Zellen für einen Tag im serumfreien Medium belassen, um die nukleäre MACF1 Isoform-3 Verteilung zu reduzieren (Abb. 7.4.2. A-A'). Durch die Zugabe des TGF- β Faktor kann eine Translokation des Proteins in den Zellkern beobachtet werden (Abb.

7.4.2. B, Pfeile). Für den Nachweis, dass TGF- β eine Wirkung auf die Zellen ausübt, wurden die SMAD2/3 Proteine angefärbt (Abb. 7.4.2. A', B'). Diese werden spezifisch durch TGF- β aktiviert und translozieren in den Zellkern. Dort initiieren sie die Gentranskription ihrer Zielgene (Dennler *et al.*, 1998). Diese Versuche implizieren, dass die subzelluläre Lokalisation von MACF1 Isoform-3 durch die Wachstumsfaktoren HGF und TGF- β reguliert werden können.

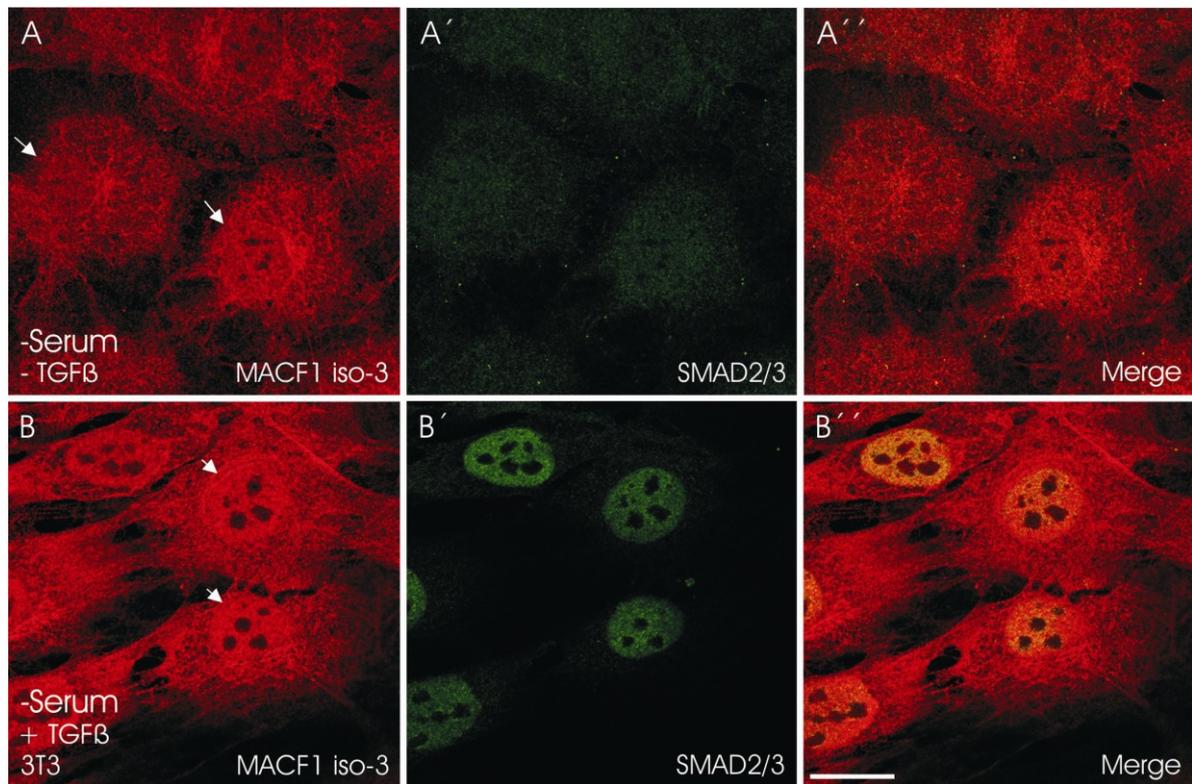


Abb. 7.4.2.: Immunfluoreszenzanalyse der endogenen MACF1 Isoform-3 Verteilung in serumentzogenen 3T3 Fibroblasten nach Zugabe von TGF- β .

3T3 Fibroblasten wurden für 24 Stunden ohne Serum im Medium kultiviert. In diesen Zellen wird eine reduzierte MACF1 Isoform-3 Lokalisation im Zellkern beobachtet (A). Über Nacht wuchsen die Fibroblasten in einem Kulturmedium, das mit TGF- β (10 ng/ml) angereichert war. In diesen Zellen war eine prominente Anreicherung von MACF1 Isoform-3 im Zellkern zu beobachten (B). In diesen Zellen wurde das SMAD2/3 Proteine im Zellkern detektiert (B'). 3T3 Fibroblasten wurden mit MeOH fixiert. In einer Doppelfärbung wurden die Zellen mit SMAD 2/3 und MACF1 Isoform-3 (iso-3pAb) spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit sekundären α -Kaninchen (AF 568), bzw. α -Maus (AF 488) Alexa Fluor-gekoppelten Antikörpern. Balken: 10 μ m.

7.4.3. Die Stimulation des Wnt-Signaltransduktionsweges verändert die subzelluläre Lokalisation von MACF1 Isoform-3.

In einer Studie von Chen *et al.*, 2005 wurde gezeigt, dass MACF1 eine Bedeutung im Aufbau und in der Regulation des Wnt-Signaltransduktionsweges aufweist. Um diese Funktion spezifisch der MACF1 Isoform-3 nachzuweisen, wurden MDCK Zellen mit dem Wnt-3 Protein über Nacht inkubiert und in der indirekten Immunfluoreszenz analysiert. Wie in den unbehandelten Kontrollzellen zu sehen ist, lokalisiert MACF1 Isoform-3 im Kern (Abb. 7.4.3. A, Pfeile), im Zytoplasma und kolokalisiert mit β -Catenin an den Zell-Zell-Kontakten (Abb. 7.4.3. A-A'', Pfeilspitzen). Die Zugabe der Wnt-3 Proteine verändert die subzelluläre Lokalisation von MACF1 Isoform-3: an den Zell-Zell-Kontakten ist es nicht mehr zu

detektieren. Weiterhin wird eine Reduktion der MACF1 Isoform-3 Proteine im Zellkern beobachtet (Abb. 7.4.3. B, Pfeile). Interessanterweise lokalisiert MACF1 Isoform-3 mit β -Catenin an der Kernhülle der Zellen (Abb. 7.4.3. C, Pfeil). In Abbildung 7.4.3. C-C'' ist eine einzelne migrierende Zelle am Rand einer MDCK Zellkolonie abgebildet. Diese weist eine von der oben beschriebenen abweichende subzelluläre Lokalisation für MACF1 Isoform-3 auf. Das Protein wird im Zellkern detektiert (Abb. 7.4.3. C-C). Diese Untersuchungen deuten an, dass die MACF1 Isoform-3 in den Wnt-3 Signaltransduktionsweg involviert ist.

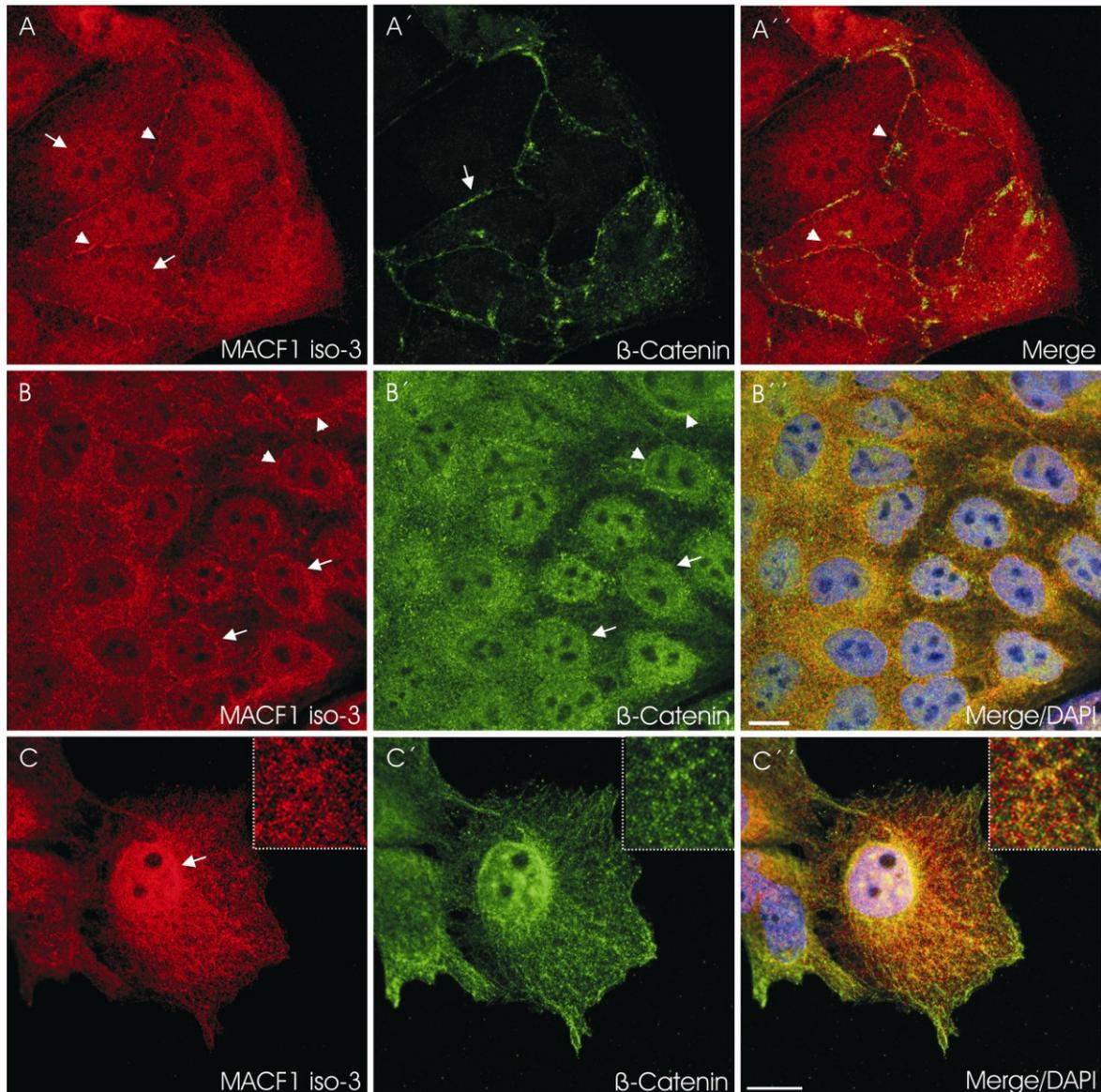


Abb. 7.4.3.: Immunfluoreszenzanalyse der endogenen MACF1 Isoform-3 Verteilung in MDCK Zellen nach Zugabe von Wnt-3 Proteinen.

In MDCK Zellen lokalisiert MACF1 Isoform-3 im Zytoplasma und im Zellkern. An den Zell-Zell-Kontakten kolokalisiert es mit β -Catenin (A-A'). MDCK Zellen, die über Nacht mit Wnt-3 angereichertem Zellkulturmedium kultiviert wurden, zeigen eine Reduktion der MACF1 Isoform-3 Proteine im Zellkern auf. Des Weiteren wird es nicht an den Zell-Zell-Kontakten, genau wie die β -Catenin Proteine, detektiert (B-B'). In einer migrierenden Zelle (C-C'') lokalisiert MACF1 Isoform-3 im Zellkern, ebenso wie β -Catenin. Pfeile deuten auf die Zellkerne hin. Pfeilspitzen verweisen auf die Überlagerung der MACF1 Isoform-3 und β -Catenin Proteine entlang des Zellkerns. Die Zellen wurden mit MeOH fixiert. Anschließend wurden diese mit MACF1 Isoform-3 (iso-3 pAb), und β -Catenin spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit sekundären α -Kaninchen (AF 568), bzw. Maus (AF 488) Alexa Fluor-gekoppelten Antikörpern. Die Zellkerne wurden durch den DAPI Farbstoff visualisiert. Balken: 10 μ m.

IV DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung einer spezifischen Isoform eines Vertreters der Spektraplakin Proteinfamilie: MACF1 Isoform-3. Diese Isoform erweckte das Interesse aufgrund ihrer für MACF1 Proteine untypischen N-terminalen Sequenz. Es wurden zellbiologische und biochemische Ansätze gewählt, um jeweils die subzelluläre Lokalisation unter verschiedenen physiologischen Bedingungen sowie Wechselwirkungen mit anderen Proteinen zu erforschen. Im Folgenden werden die bezüglich des MACF1 Isoform-3 Proteins erlangten Erkenntnisse in Hinblick auf zelluläre Funktion, Regulation und potentielle Beteiligung an genetischen Erkrankungen diskutiert. Abschließend werden die Ergebnisse in ein Modell integriert.

1. Der N-Terminus von MACF1 Isoform-3 bindet nicht an F-Aktin und scheint durch eine N-Myristylierung an der Plasmamembran verankert zu werden.

Die Isoformen Vielfaltigkeit der Plakin Großfamilie wird zu einem erheblichen Maße durch ihre N-Termini generiert. Diese N-terminalen Sequenzen scheinen zudem einen Einfluss auf Funktion und Lokalisierung auszuüben. So werden die 11 verschiedenen Plectin Isoformen Zelltyp-abhängig und gewebespezifisch exprimiert (Elliot *et al.*, 1997; Fuchs *et al.*, 1999). Weiterhin wurden für einige der Isoformen eine spezifische subzelluläre Verteilung gezeigt (Fuchs *et al.*, 1999). So lokalisiert beispielsweise die Plectin Isoform 1b in Fibroblasten exklusiv an den Mitochondrien (Reznicek *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus von MACF1 Isoform-3 in Säugetieren hochkonserviert vorliegt und so auf eine essentielle Funktion hindeutet (Abb.1.2). Jedoch wird diese Isoform-3 nicht Zelltyp- oder gewebespezifisch exprimiert (Abb. 3.1.1. und Abb. 3.1.2.).

Im Gegensatz zu dem gut charakterisierten Plectin Protein sind die Funktionen der einzelnen Isoformen der Spektraplakine, insbesondere die von MACF1, noch nicht vollständig aufgeklärt.

Es wird jedoch angenommen, dass der N-Terminus der Spektraplakin Proteine wichtig für die subzelluläre Lokalisation und die Interaktion mit verschiedenen Filamenttypen ist. So zeigte eine Analyse der drei verschiedenen neuronalen Bpag1/Dystonin Isoformen, dass der N-Terminus der Dystonin Isoform-1 eine hohe Affinität zu kortikalem Aktin besitzt (Jefferson *et al.*, 2006). Die Isoform-2 lokalisiert nicht mit kortikalem Aktin, bindet jedoch an zytoplasmatische Aktinfilamente entlang des Nukleus (Jefferson *et al.*, 2006). Für die neuronale Bpag1n3 Isoform wurde keine Überlagerung mit Aktinfilamenten beobachtet (Jefferson *et al.*, 2006), und es ist nicht in der Lage an F-Aktin zu binden (Yang *et al.*, 1999). Des Weiteren wird im N-Terminus von BPAG1n3 durch das Fehlen der CH1 Domäne eine kryptische Mikrotubuli-bindende Domäne (M1) aktiviert, so dass BPAG1n3 bevorzugt an Mikrotubuli und Intermediärfilamente bindet (Yang *et al.*, 1999). Aufgrund des gleichen strukturellen Aufbaus des N-Terminus von MACF1 Isoform-3 lässt sich analog vermuten, dass dieser ebenfalls nicht mit Aktinfilamenten assoziiert und weitere noch unbeschriebene Funktionen in der Zelle ausübt. Tatsächlich wurde

in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die MACF1 Isoform-3, durch die Aktin-depolymerisierende Chemikalie Latrunkulin B, nicht in seiner subzellulären Verteilung beeinflusst wurde (Abb. 3.3.1.). Weiterhin konnte Aktin in einer MACF1 Isoform-3-spezifischen Immunpräzipitation nicht detektiert werden (Abb. 7.2.4.), so dass eine stabile Interaktion dieser Proteine unwahrscheinlich ist. In einer Studie von Fuchs *et al.*, (1999) wurde beschrieben, dass die zum MACF1 Isoform-3 hochhomologe CH2 Domäne von Plectin nicht in der Lage ist *in vitro*, an F-Aktin zu binden. Dieses kann als weiterer Beleg für eine nicht funktionale F-Aktinbinung von MACF1 Isoform-3 gesehen werden. Weiterhin kann der N-Terminus von Bpag1n3 durch eine N-Myristilierung in der Plasmamembran verankert werden (Jefferson *et al.*, 2006). Welche Funktion das Protein hier ausübt, ist bisher noch unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte für den N-Terminus der MACF1 Isoform-3 eine entsprechende Modifikation *in silico* postuliert werden (Abb. 1.1.). Durch transiente Expression C-terminaler MACF1 Isoform-3 GFP Fusionsproteine (MACF1 iso3 GFP und MACF1 iso3-CH2 GFP) in COS7 Zellen, zeigte sich eine Lokalisation an der Plasmamembran (Abb. 4.2.). Dieses deutet auf eine Myristyl-vermittelte Verankerung in der Plasmamembran hin. Bekräftigt wird es durch die Lokalisation des Fusionsproteins im Zellkern nach Einführen von Punktmutationen in das potentielle Myristilierungssignal (Glyzin zu Alanin Abb. 1.1., Abb. 4.3.). Derselbe Effekt konnte durch Fusion des GFP-Tags N-terminal an den N-Terminus des MACF1 Isoform-3 Proteins hervorgerufen werden (Abb. 4.2.). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass MACF1 Isoform-3 ebenfalls durch Myristilierung in der Plasmamembran verankert werden kann. Welchen Einfluss diese potentielle Myristilierung auf die Funktion von MACF1 Isoform-3 ausübt, bedarf weiterer Experimente.

2. MACF1 Isoform-3 weist eine nukleäre Lokalisation auf.

Wie im vorangegangenen Abschnitt dargelegt wurde, verhält sich die MACF1 Isoform-3 in Bezug auf die Bindung an die Plasmamembran wie auch an das Aktin-Zytoskelett anders, als die verbleibenden MACF1-Isoformen. Die Isoform-3 unterscheidet sich maßgeblich von den anderen Isoformen durch ihren verlängerten N-Terminus. Eine *in silico* Proteinmotivanalyse dieses N-Terminus sollte Hinweise auf die Lokalisation und die Eigenschaften dieses Proteins liefern. Überraschenderweise wurden innerhalb des N-Terminus ein HMG Box Motiv sowie ein sich darin befindendes nukleäres Lokalisationssignal (NLS) vorhergesagt (Abb. 1.1.). HMG Boxen vermitteln die Bindung an DNA in transkriptionell aktiven Bereichen des Chromatins (Hu *et al.*, 1998). Im Einklang damit wurde in Immunfluoreszenzstudien eine prominente nukleäre Verteilung des MACF1 Isoform-3 Proteins beobachtet (Abb. 3.2.1.-2., Abb. 3.2.4.). Ein zusätzliches Argument lieferten Expressionsstudien an COS7 Zellen. Die transiente Expression des N-Terminus von MACF1 Isoform-3, der N-terminal mit GFP fusioniert war, lokalisierte im Zellkern (Abb. 4.2.). Aufgrund der Größe des Fusionsproteins (70 kDa) kann eine passive Diffusion in den Zellkern hierbei ausgeschlossen werden (Görlich und Mattaj, 1996). Somit kann daraus geschlossen werden, dass das NLS Signal aktiv ist und den Transport in den Zellkern vermittelt. Für die murine,

neuronalen Dystonin-b Isoform-2 (Dystonin 1b2) konnte ein NLS Signal nachgewiesen werden (QKSPVKRRRRMISS), dass für eine spezifische nukleäre Lokalisation des Proteins in C2C12 Muskelzellen verantwortlich gemacht wird (Young *et al.*, 2005). Die Sequenz dieses NLS weist eine hohe Homologie zu dem murinen MACF1 (QKSPGKRRRMISS) auf. Interessanterweise liegt diese Sequenz hinter der CH2 Domäne (1517-1529 AS Isoform-3; 1308-1320 AS Isoform-1/-2) und ist in allen murinen, neuronalen MACF1 Isoformen anzutreffen (Pubmed *Accessionnr.* AAC52988-90). Mit Hilfe des Rod pAb Antikörpers, der alle Isoformen erkennt, konnte eine prominente nukleäre Lokalisation wie sie für die Isoform-3 gezeigt, nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise ist dieses NLS in MACF1 nicht aktiv oder es liegt im gefalteten Protein unzugänglich vor.

Proteine, die mit Chromatin interagieren können, weisen in der Regel einen charakteristisch niedrigen, isoelektrischen Punkt (pI) auf. Da der N-Terminus von MACF1 Isoform-3 einen niedrigen pI-Wert besitzt (pI 5,1), wurde überprüft, ob die MACF1 Isoform-3 in der Lage ist mit Chromatin in Wechselwirkung zu treten. Durch Chromatin Immunpräzipitation, durchgeführt an Zellkernextrakten von HaCaT Zellen (Abb. 6.2.), konnte in der Tat eine Interaktion zwischen MACF1 Isoform-3 und Chromatin bestätigt werden. Weiterführend wurde in unserem Labor an COS7 Zellkernextrakten eine Proteinbindungsanalyse durchgeführt, in der MACF1 Isoform-3 mit Histon 1b und 1c präzipitierte (persönliche Kommunikation, Dr. I. Karakesisglou). Das untypische Vorhandensein eines Spektraplakinproteins innerhalb des Zellkernes könnte damit erklärt werden, dass MACF1 Isoform-3 Gerüstfunktionen in der Kernmatrix übernimmt.

Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit erwähnt, sind Spektraplakine für ihre Gerüstfunktion bekannt. Interessanterweise ist für Plectin eine additional Funktion im Zellkern von Glioma C6 Zellen beschrieben worden. Dort interagiert Plectin mit dem Lamin B Protein *in vivo* und *in vitro* (Foisner *et al.*, 1999). Durch die Phosphorylierung von Plectin durch Proteinkinase A bzw. C (PKA bzw. PKC) kann dieser Interaktion entgegengewirkt werden (Foisner *et al.*, 1999). Die Autoren nehmen daher an, dass durch Plectin Intermediärfilamente an den Zellkern angeschlossen werden. Im Zellkern liegen Aktinfilamente, Lamine (Typ V Intermediärfilamente), Chromatin und eine Reihe von Proteinen vor, die ebenfalls koordiniert und miteinander verknüpft werden müssen. So erklärt es sich, dass in letzter Zeit einige Studien veröffentlicht worden sind, die für zytoskelettale Verknüpfungproteine neue Funktionen im Zellkern zeigen. Für die Spektrine ist seit langem bekannt, dass es wichtige Verknüpfungsfunktionen für die zytoskelettale Organisation an der Plasmamembran ausübt (zur Übersicht Chakrabarti *et al.*, 2006, Bennet, 1990). Jedoch sind einige Studien erschienen, die eine nukleäre Lokalisation von Spektrinen konstatieren (Bachs *et al.*, 1990; Vendrell *et al.*, 1991; Tse *et al.*, 2001; Dingova *et al.*, 2008). Weitere Studien zeigten, dass α II Spectrin dort mit Proteinen der DNA Reparatur, Transkription, RNA Prozessierung (Dingová *et al.*, 2008; McMahon *et al.*, 2001; Sridharan *et al.*, 2003, 2006), strukturellen Proteinen, wie Lamin A/C, B, Emerin (Sridharan *et al.*, 2006; Zhong *et al.*, 2008) und Chromatin-assoziierten Proteinen interagiert (Sridharan *et al.*, 2006). Weiterhin wurde für α II Spectrin gezeigt, dass

durch transiente Überexpression mehrkernige Zellen induziert und durch dessen Suppression die Zellen in der G1 Phase arretiert werden (Metran *et al.*, 2008; Zhong *et al.*, 2008). Eine solche strukturgebende Funktion im Zellkern wäre auch für MACF1 Isoform-3 denkbar. Durch transiente Überexpression eines Lamin B Δ^{2+} GFP-Fusionsproteins, das auch die Lamin A/C und Nesprin Organisation verändert (Libotte *et al.*, 2005), konnte ebenfalls die Lokalisation des MACF1 Isoform-3.

Während der Mitose wurde für MACF1 Isoform-3 ein Färbemuster wie für Mikrotubuli des Spindelapparats, beobachtet. Ausserdem lokalisierte das Protein an Chromosomen (Abb. 3.2.1.). Darüber hinaus präzipitierte MACF1 Isoform-3 mit Histonen/Chromatin und Mikrotubuli (Abb. 6.2.; Abb. 7.2.4.). Ähnlich wie für α II Spectrin konnte durch die transiente Überexpression von MACF1 Isoform-3 Fusionsproteinen mehrkernige Zellen beobachtet werden (Abb. 4.5.2.). Zusammenfassend eröffnen die erwähnten Beobachtungen die Möglichkeit einer strukturgebenden Aufgabe für MACF1 Isoform-3 im Zellkern und im Verlauf der Zellteilung: während der Mitose verknüpft es Chromatin mit Mikrotubuli und in der Interphase stabilisiert es die Protein/Chromatin-Interaktion mit dem Lamin-Netzwerk an der inneren Kernmembran.

3. MACF1 Isoform-3 wird durch externe Stimuli in seiner zellulären Funktion reguliert.

Im N-Terminus der MACF1 Isoform-3 wurde bioinformatisch eine Phosphorylierungsstelle für die EGF-Rezeptor Kinase vorhergesagt (Abb.1.1.). Durch die Bindung von Liganden an diesen Rezeptor werden zelluläre Proteine phosphoryliert, die über weiterführende Signalkaskaden die Aktivierung von Zielgenen und dadurch das Zellwachstum stimulieren (siehe 1.1.). Viele Plakinproteine werden durch Phosphorylierung in ihrer Interaktion mit Proteinen und Filamenten reguliert (van de Heuvel *et al.*, 2002; Rampazzo *et al.*, 2002; Stappenbeck *et al.*, 1994; Herrmann *et al.*, 1983). Daher ist es wahrscheinlich, dass MACF1 Isoform-3 ebenfalls durch Phosphorylierungen reguliert wird. Der Serumsentzug während der Kultivierung von Zellen, stellt eine einfache, aber effiziente Methode zur Überprüfung dar, ob das zu untersuchende Protein durch Wachstumsfaktoren in seiner Lokalisation beeinflusst wird (O'Keefe *et al.*, 1983; zur Übersicht Prather *et al.*, 1999). Aus diesem Grunde wurde die MACF1 Isoform-3 Lokalisation in serumsentzogenen NIH 3T3 Fibroblasten beobachtet. Dabei wurde eine deutliche Reduktion der sonst prominenten nukleären Lokalisation beobachtet (Abb. 7.1.). Eine Stimulation der EGF Rezeptor Kinase durch HGF und TGF Wachstumsfaktoren ist bekannt (Scheving *et al.*, 2001; Presnell *et al.*, 1997; Tomiya *et al.*, 2000). Interessanterweise wurde durch die Zugabe von TGF- β zu den serumentzogenen Zellen MACF1 Isoform-3 wieder deutlich im Zellkern angereichert (Abb. 7.4.2.). Ebenfalls konnte durch die Stimulation mit HGF eine Anreicherung von MACF1 Isoform-3 im Zellkern beobachtet werden (Abb. 7.4.3.). Effektoren der EGF-Rezeptor Signalübertragung beeinflussen also die subzelluläre Lokalisation von MACF1 Isoform-3 und offenbaren einen "dynamischen" Charakter des Proteins. Interessanterweise ist für ein verwandtes Protein, α -Actinin-4, das der Spektrinfamilie ange-

hört, gezeigt worden (zur Übersicht Otey und Carpen, 2004), dass es ebenfalls durch extrazelluläre Stimuli (EGF) im Zellkern akkumuliert. Dabei interagiert es mit dem NFkB Untereinheit p65 im Zytoplasma und wird so in den Zellkern transportiert (Honda *et al.*, 1998). Ein ähnlicher Transportmechanismus könnte auch der beobachteten MACF1 Isoform-3 Translokation zugrunde liegen. Zukünftige Studien hierzu könnten wichtige Kontrollinstanzen der zellulären Lokalisation und Funktion von MACF1 Isoform-3 aufzeigen.

Ein weiteres Indiz, dass MACF1 ein dynamisches Protein darstellt, welches durch externe Signalmoleküle beeinflusst wird, zeigten Versuche an Epithelzellen. Signalübertragungsprozesse werden unter anderem durch Calcium-Ionen induziert, welches an diversen zellulären Prozessen beteiligt ist (Mcilwain *et al.*, 1977; Übersicht in Wang und Weisman, 1979 und Bootman und Berridge, 1995). In Hinblick auf Spektrine übt die Bindung von Calcium-Ionen an deren EF Hand Domänen eine wichtige Konformationsänderung ihrer globulären C-terminalen Domäne aus. So werden Helixes neu ausgerichtet und hydrophobe Reste freigelegt, folglich können neue Protein Interaktionen vermittelt werden können (Trave *et al.*, 1995; Witke *et al.*, 1993; Lundberg *et al.*, 1995). Durch diese Konformationsänderung stabilisieren bzw. destabilisieren sie die Filamentnetzwerke (zur Übersicht Klymkowsky, 1999). Ferner wurde für Shot, dem *Drosophila* Homolog von MACF1, gezeigt, dass die beiden EF Hand Domänen funktional sind (Lee und Kolodziej *et al.*, 2001). Des Weiteren stimuliert die Zugabe von Calcium-Ionen die Differenzierung von primären Keratinozyten epidermalen Ursprungs und vermittelt auch hier die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten. Erstaunlicherweise verändert das MACF1 Isoform-3 Protein seine subzelluläre Lokalisation in primären Keratinozyten nach Zugabe von Calcium-Ionen (Abb. 7.3.; Abb. 3.2.1.). In diesem Zelltyp transloziert es aus dem Zellkern und lokalisiert zytoplasmatisch. Weiterhin konnte MACF1 Isoform-3 verstärkt an den Zell-Zell-Kontakten detektiert werden, wobei die sonst filamentöse Verteilung des Proteins nicht mehr beobachtet werden konnte. Für MACF1 wurde bereits beschrieben, dass durch die Zugabe von Calcium-Ionen das Protein an die Zell-Zell-Kontakte transloziert (Karakesiosoglou *et al.*, 2000). Interessanterweise fand die beobachtete Translokation auch nach Depolymerisation von Mikrotubuli, also MT-unabhängig, statt. MACF1 Isoform-3 verfügt über zwei C-terminale EF Hand Domänen direkt vor der MT-bindenden Domäne (Abb. 2.1.). Die beobachteten Effekte hinsichtlich der MACF1 Isoform-3 Lokalisation könnten darauf hindeuten, dass die EF Hand Motive im C-Terminus des Proteins funktional sind, und dass durch Calcium-Ionen eine Konformationsänderung des C-Terminus induziert wird, wodurch die Mikrotubuli-bindende Domäne eine andere Konformation eingeht und Interaktionen mit Proteinen an den Zell-Zell-Kontakten möglich werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Effekte der Calcium-abhängigen zellulären Positionierung von MACF1 unabhängig von den EF-Hand Motiven bewerkstelligt werden. Es ist gemeinhin bekannt, dass Calcium-Ionen Signalkaskaden initiieren.

Eine Lokalisation von MACF1 Isoform-3 an Zell-Zell-Kontakten konnte darüber hinaus in epidermalen MDCK und HaCaT Zellen beobachtet werden (Abb. 3.2.2.; Abb. 7.4.1.). Die Konzentration des Proteins

an diesen Bereichen epidermaler Zellen lässt eine spezifische Funktion von MACF1 Isoform-3 vermuten. Zell-Zell-Kontakte werden durch große Proteinkomplexe vermittelt, die u.a. aus E-Cadherin, α - und β -Catenin bestehen und durch eine Vielzahl von Proteinen wie der RhoA GTPase reguliert werden (Fukata und Kaibuc, 2001, Anastasiadis *et al.*, 2000, Noren *et al.*, 2000). Bemerkenswerterweise wurde bereits für Shot gezeigt, dass es mit RhoA den Aufbau von E-Cadherin-haltigen Zell-Zell-Kontakten reguliert (Lee *et al.*, 2002). In der erwähnten Studie wurde zusätzlich beobachtet, dass Zellen, die konstitutiv aktives RhoA exprimierten, keine E-Cadherin-haltigen Kontakte ausbilden. Der Aktivitätszustand von RhoA ist entscheidend für seine Funktion hinsichtlich der Regulation von Zell-Zell-Kontakten. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde mittels einer *in silico* Analyse eine Rho-Inhibierungsdomäne (HR1) innerhalb des N-Terminus von MACF1 Isoform-3 postuliert (Abb. 1.1.). Im Übrigen konnten weitere Indikationen für eine tatsächliche Wechselwirkung zwischen RhoA und MACF1 Isoform-3, durch verschiedene experimentelle Ansätze, erbracht werden. Eine direkte Interaktion von RhoA und dem N-Terminus von MACF1 Isoform-3 konnte mittels des Hefe-Zwei-Hybrid Systems geliefert werden (Abb. 4.6.4.). Darüberhinaus resultierte die transiente Expression des MACF1 Isoform-3 N-Terminus in einem ähnlichen Phänotyp (Abb. 4.2.) wie die Expression von Rho GTPase-Mutanten (Ridley *et al.*, 1992, Nobes *et al.*, 1995). Dieser Phänotyp konnte durch die simultane Expression von konstitutiv aktivem RhoA neutralisiert werden (Abb. 4.6.1.). Zusammenfassend liefern die durchgeführten Experimente deutliche Hinweise auf einen inhibitorischen Effekt von MACF1 Isoform-3 auf RhoA.

Die in diesem Abschnitt aufgeführten Beobachtungen könnten im Folgendem Szenario integriert werden: Durch Calcium Zugabe werden Zell-Zell-Kontakte ausgebildet und gleichzeitig induzieren die Ionen eine Konformationsänderung des C-Terminus von MACF1 Isoform-3 wodurch die Interaktion mit Mikrotubuli aufgelöst wird und das Protein an die Zell-Zell-Kontakte transloziert. Hier könnte es über eine Interaktion mit β -Catenin (Chen *et al.*, 2006) die Zell-Zell-Kontakte stabilisieren. Ausserdem unterbindet es die Aktivität von RhoA, wodurch eine weitere stabilisierende Wirkung auf Zell-Zell-Kontakte ausgeübt werden könnte. Durch den Wachstumsfaktor HGF wird MACF1 Isoform-3 von den Zell-Zell-Kontakten abgelöst (Abb. 7.4.1). Gleichzeitig wird β -Catenin von den Zell-Zell-Kontakten freigesetzt und transloziert in den Zellkern (Monga *et al.*, 2002). Denkbar wäre eine Destabilisierung von E-Cadherin/ β -Catenin Komplexen in Abwesenheit von MACF1 Isoform-3. Ohne das Vorhandensein von MACF1 Isoform-3 könnte RhoA aktiviert werden und die weitere Dissoziation von den E-Cadherin Komplexen verstärken.

4. Interaktionen mit Nesprin-3 und Mikrotubuli beeinflussen die Lokalisierung von MACF1 Isoform-3 an der Außenseite der Kernhülle.

In Glioma C6 Zellen wies die MACF1 Isoform-3 eine prominente Lokalisation an der Kernmembran auf, die mit Mikrotubuli überlagerte (Abb. 3.2.1; 3.2.3-4). Diese wurde in der vorliegenden Arbeit näher

untersucht. An der Kernhülle verknüpfen die Typ II Transmembranproteine Nesprin 1, 2, 3 das Zytoskelett mit dem Zellkern (Zhang *et al.*, 2001 und 2002; Padmarkumar *et al.*, 2004, Wilhemsen *et al.*, 2005). Interessanterweise wurde bereits für zwei Plakine, Dystonin-a2 und Plectin 1C, eine Interaktion mit Nesprin-3 α an der Kernhülle gezeigt (Young *et al.*, 2008; Wilhemsen *et al.*, 2005). Im Folgenden wird Nesprin-3 α als Nesprin-3 bezeichnet. Ursprünglich wurde die Interaktion mit Plectin durch einen Hefe-Zwei-Hybrid Screen gefunden; hierbei interagierte die ABD des Plectin 1C Proteins mit der ersten Spektrinwiederholung (SR1) von Nesprin-3. Die CH2 Domäne von Plectin 1C und die sich davor befindliche N-terminale Sequenz weisen eine deutliche Homologie zum N-Terminus der MACF1 Isoform-3 auf (Abb. 5.4.1.; Fuchs *et al.*, 1999). Entsprechend konnte *in vivo* und *in vitro* eine Interaktion zwischen MACF1 Isoform-3 und Nesprin-3 in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Die Wechselbeziehung der beiden Proteine findet zwischen dem N-Terminus von MACF1 Isoform-3 und der SR1 Sequenz von Nesprin-3 statt. (Abb. 5.5.; Abb. 5.8.3., Abb. 5.8.1.) In allen durchgeführten Versuchen wurde Plectin 1C zum Vergleich analysiert und Unterschiede der MACF1 Isoform-3 in seinen Bindungseigenschaften zu Nesprin-3 gefunden: Plectin 1C weist eine höhere Affinität zu Nesprin-3 auf (Abb. 5.5.; Abb. 5.8.1.; Abb. 5.8.3.) und die Interaktion von Plectin und Nesprin-3 ist nicht Mikrotubuli-abhängig wie für die MACF1 Isoform-3 beobachtet wurde (Abb. 5.3.3., Abb. 5.7.-3.).

Plectin hat eine starke Tendenz zur Selbstassoziation (Foisner und Wiche, 1987) und kann parallele Dimere durch seine Coiled-Coil Rod Domäne ausbilden (Foisner *et al.*, 1991; Green *et al.*, 1992; Uitto *et al.*, 1996; Wiche, 1998, Wiche *et al.*, 1991). Die dimerisierten ABD Domänen vermitteln u.a. die Bündelung von Aktinfilamenten (Fontao *et al.*, 2001). Weiterhin können höhere oligomere Strukturen durch die globulären (ABD und EF Hand) Domänen von Plectin ausgebildet werden (Foisner und Wiche, 1987; Weitzer und Wiche, 1987). Für eine stabile Interaktion von Nesprin-3 und Plectin 1C müssen die beiden Proteine Homodimere ausbilden. Denn erst das Plectin Dimer mit seinen beiden ABD Domänen kann eine stabile Interaktion mit dem dimerisierten Nesprin-3 an der äußeren Kernhülle eingehen und dadurch das Intermediärfilamentsystem an den Zellkern anschließen (Ketama *et al.*, 2007). Für die Plakin und Spektrin Familienmitglieder ist seit langem bekannt, dass diese anti-parallele Dimere ausbilden können. Während die Plakine ihre EF Hand, Coiled Coil Rod und ABD Domänen für die Ausbildung anti-paralleler Dimere verwenden, kann eine Dimerisierung von Spektrinen additional durch deren SR Sequenzen vermittelt werden (zur Übersicht Djnovic-Carugo *et al.*, 2002; Djnovic-Carugo *et al.*, 1999; Imamura *et al.*, 1988, Mislow *et al.*, 2002). Aufgrund der Homologie und dem vergleichbaren Aufbau der Domänen innerhalb der Spektrin, Plakin und Spektriplakin Familien wäre es möglich, dass auch MACF1 Isoform-3 Dimere ausbilden könnte. Dies würde auch erklären warum N-terminale MACF1 Isoform-3 GFP Fusionsproteine nicht an die äußere Kernhülle von Nesprin-3-positiven Zellen lokalisieren (Daten nicht gezeigt), wie dies auch für Plectin 1C N-terminale Fusionsproteine bekannt ist (Ketama *et al.*, 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die MACF1 Isoform-3 für eine Lokalisation an der äußeren Kernhülle die simultane Interaktion mit Nesprin-3 und Mikrotubuli benötigt (Abb. 5.3.5-6., Abb. 5.7.1.). Erstaunlicherweise konnte eine Anreicherung der sonst nur schwach an der Kernhülle detektierbaren MT in Nesprin-3-exprimierenden COS7 Zellen beobachtet werden (Abb. 5.7.2.). Diese Anreicherung könnte der beobachteten Translokation von MACF1 Isoform-3 zugrunde liegen. Die Zellen, in denen MACF1 Isoform-3 trotz Colchizinbehandlung an der Kernhülle lokalisierte, zeigten stark gebündelte MT entlang der Kernhülle, die mit Nesprin-3 und MACF1 Isoform-3 überlagerten (Abb. 5.7.3.). Für MACF1 wurde gezeigt, dass die transiente Expression des C-Terminus, der die Gas2, GSR und die EF Hand Domänen beinhaltet, die Fähigkeit aufweist, Mikrotubuli zu bündeln und zu stabilisieren (Leung, *et al.*, 1999). Dies vermindert die Wirkung von MT-depolymerisierenden Substanzen (Sun *et al.*, 2001; Jefferson *et al.*, 2006). Für Plectin wurde gezeigt, dass die dimerisierten ABD Domänen die Bündelung von Aktinfilamenten vermitteln (Fontao *et al.*, 2001) und das weiterhin Plectin dimerisieren muss um mit Nesprin-3 zu interagieren (Ketama *et al.*, 2007). Analog wäre es möglich, dass MACF1 Isoform-3 ebenfalls dimerisiert. Da es eine Mikrotubuli-bindende Domäne aufweist, könnten diese Dimere mit Nesprin-3 interagieren und gleichzeitig Mikrotubuli gebündelt werden, so dass weiterhin Mikrotubuli vor der Einwirkung der Cholchizinbehandlung geschützt werden.

MACF1 Isoform-3 wies eine schwächere Interaktion zu Nesprin-3 als Plectin auf. Dies könnte darauf hindeuten, dass MACF1 Isoform-3 nur unter bestimmten Bedingungen mit Nesprin-3 interagiert und Mikrotubuli an die äußere Kernhülle anschließt. Während in migrierenden Zellen MACF1 Isoform-3 an der äußeren Kernhülle detektierbar war, konnte diese charakteristische Ringstruktur nicht in konfluenten Glioma C6 Zellen beobachtet werden (eigene Beobachtungen). Dies deutet auf eine dynamische Interaktion von MACF1 Isoform-3 mit der Kernhülle hin. Wie in Abschnitt 3 dargelegt, beeinflussen Wachstumsfaktoren die Lokalisation von MACF1 Isoform-3. Dies könnte in dem hier beobachteten Phänomen resultieren. Möglicherweise werden durch die MACF1 Isoform-3 Mikrotubuli nur in migrierenden Zellen an den Zellkern gebracht, da in diesem Stadium verstärkt Mikrotubuli benötigt werden (zur Übersicht Morris, 2003). Denkbar wäre auch eine indirekte Bindung über einen noch unbekanntem Bindungspartner, der diesen Komplex stabilisiert und die Interaktion verstärkt.

Das Aktin-Zytoskelett der Vertebraten kann durch die Interaktion mit Nesprin-1 und -2 mit dem Zellkern verbunden werden (Padmarkumar *et al.*, 2004; Zhen *et al.*, 2002). Durch die Interaktion von Nesprin-3 mit Plectin 1C und Dystonin-a2 wird das Intermediär- und möglicherweise Mikrotubuli-Filamentsystem mit der äußeren Kernhülle verknüpft (Svithina *et al.*, 1996; Wilhelmsen *et al.*, 2006; Young *et al.*, 2008). Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit kann MACF1 Isoform-3 ebenfalls zu den Proteinen gezählt werden, die das Zytoskelett mit dem Zellkern verknüpfen.

5. Mögliche Beteiligung der MACF1 Isoform-3 an genetischen Erkrankungen.

Bisher wurde für das MACF1 Isoform-3 Protein keine Beteiligung an genetischen Erkrankungen beschrieben. Knock-Out Mausmodelle zeigten jedoch eine essentielle Funktion von MACF1 während der Embryonalentwicklung (Kodama *et al.*, 2003, Chen *et al.*, 2006). Durch den hohen MACF1 Isoform-3 Konservierungsgrad in Säugetieren (Abb. 1.2.) ist anzunehmen, dass dieses Protein auch eine vergleichbar wichtige Funktion im menschlichen Organismus ausübt wie in der Maus. So basiert die Entstehung vieler Krankheiten auf einer gestörten Wnt-Signaltransduktion (Übersicht in Logan und Nusse, 2004). Chen *et al.*, (2006) konstatierten eine Bedeutung für MACF1 hinsichtlich der Regulation des Wnt-Signaltransduktionswegs. In der vorliegenden Arbeit konnten zudem spezifisch für die Isoform-3 der MACF1 Proteine erste Hinweise für eine Beteiligung an dieser Signalkaskade erbracht werden (Abb. 7.4.3.). Daher wäre es möglich, dass das Fehlen oder die Expression verkürzter MACF1 Proteine den Ablauf der Wnt-Signaltransduktion stört und so eine der molekularen Ursachen für die Entstehung der Wnt-vermittelten Krankheiten ist.

Eine Studie von Wu *et al.* (2008) deutete an, dass MACF1 wichtig für die Migration der Zelle ist und daher eine Funktion in der Metastasierung von Tumoren haben könnte. Tatsächlich wurde das MACF1 Protein in vielen Microarray-Screens verschiedener Krebsarten auffällig hoch-reguliert vorgefunden (Sjoblom *et al.*, 2006; Schleiermacher *et al.*, 2005).

Im Folgenden wird die Interaktion mit DISC1, einem Protein, für welches eine Bedeutung während der Pathogenese des Krankheitsbildes der Schizophrenie postuliert wird, näher diskutiert. In serumentzogenen NIH 3T3 Fibroblasten lokalisiert MACF1 Isoform-3 exklusiv an Mitochondrien (Abb. 7.1.). Auf der Suche nach Proteinen, die MACF1 Isoform-3 mit Mitochondrien verknüpfen könnten, wurde eine Studie entdeckt, die mittels eines Hefe-Zwei-Hybrid Screens MACF1 als Bindungspartner für DISC1 beschreibt (Camargo *et al.*, 2006). Dem DISC1 Gen (*Disrupted In Schizophrenia 1*) wird derzeit viel Beachtung geschenkt, da es im Zusammenhang mit der Entstehung von Schizophrenie und bipolaren (manisch-depressiven) Erkrankung gebracht wird. Zytogenetische und zellbiologische Studien zeigten, dass der Verlust der DISC1 Funktion (entweder halbinsuffizient oder dominant negativ) mit Schizophrenie und manisch-depressiven Erkrankungen assoziiert ist (zur Übersicht: Muir *et al.*, 2008). DISC1 wird in vielen Isoformen im Gehirn exprimiert, wobei den Isoformen unterschiedliche Funktionen innerhalb der Dendriten und Axone zugeordnet wurden (James *et al.*, 2004). Es wurde in diversen Bereichen innerhalb der Zelle detektiert wie zum Beispiel in Centrosomen, an Mikrotubuli, an Mitochondrien sowie im Zellkern (Ishizuka *et al.*, 2008). Durch den N-Terminus assoziiert DISC1 mit Mitochondrien. Der C-Terminus ermöglicht die Bindung an die Centrosomen (Ozeki *et al.*, 2003; Brandon *et al.*, 2004; Millar *et al.*, 2005). Bisherige Studien ergaben ein Netzwerk an Proteinen, welche mit DISC1 in Wechselwirkung treten können. Dieses Netzwerk wird als das DISC1 Interaktom bezeichnet (Camargo *et al.*, 2006). In dieser Studie wurde MACF1 als Interaktionspartner für das DISC1 Protein gefunden, wobei Wechselwirkungen mit dem C-Terminus, dem N-Terminus und mit verkürztem DISC1 Protein postuliert

wurden. Weiterhin wurde eine Interaktion von MACF1 mit einem weiteren Schizophrenie Kandidatengen, DTNBP1, gefunden. Dies unterstreicht die Vermutung, dass MACF1 Proteine als Teil dieses Interaktionskomplexes in die Pathogenese von Schizophrenie involviert sein könnten. Die genauen Interaktionsdomänen der MACF1 Proteine wurden nicht angegeben, wodurch eine Zuordnung zu den jeweiligen Isoformen nicht möglich ist. Jedoch wurde die Isoform-3 spezifisch in diesem Screen detektiert (Carmago *et al.*, 2006). Daher ist anzunehmen, dass diese Interaktion zwischen dem N-Terminus von MACF1 und DISC1 stattfand.

Eine Interaktion zwischen MACF1 Isoform-3 und DISC1 wurde durch Immunpräzipitations-, Expressions- und indirekte Immunfluoreszenzstudien näher untersucht. Wie auch DISC1 werden MACF1 Isoform-3 und verstärkt im Gehirn exprimiert (Abb. 3.1.1-2.). Aus diesem Grunde wurde im Rahmen dieser Arbeit die Glioma C6, eine gehirnspezifische Zelllinie, verwendet. Diese wurde aus dem Gehirn von *Rattus norvegicus* gewonnen (Whittle *et al.*, 1998). Tatsächlich kolokalisierte DISC1 Protein mit endogenem MACF1 Isoform-3 an der Kernmembran und in filamentösen Strukturen im Zytoplasma in Glioma C6 Zellen (Abb. 7.2.3.). Die Kopräzipitation des DISC1 Proteins mit MACF1 Isoform-3 aus diesen Zellen kann als weiterer Beleg für einen molekularen Kontakt dieser Proteine gewertet werden (Abb. 7.2.4.). Wird das DISC1 Protein in COS7 Zellen überexprimiert, so ist eine Umverteilung der Mitochondrien und des MACF1 Isoform-3 Proteins zu beobachten (Abb. 7.2.2.). Diese Beobachtung steht im Einklang mit bereits publizierten Effekten über eine Reorganisation von Mitochondrien nach DISC1 Überexpression (Millar *et al.*, 2001). Interessanterweise konnte diese Reorganisation durch Zugabe Mikrotubuli-depolymerisierender Chemikalien gestört werden (zur Übersicht: Stephens, 1969). Weiter vermuteten die Autoren einer weiteren Studie, dass DISC1 in einem Mikrotubuli-abhängigen Mechanismus mit den Mitochondrien assoziiert vorliegt (James *et al.*, 2003). Ebenso wurde bereits eine Interaktion von DISC1 mit den Mikrotubuli Motorproteinen Dynein und Kinesin-1 postuliert (Kamiya *et al.*, 2005). Übereinstimmend damit wurde durch eine Immunpräzipitation von MACF1 Isoform-3 in Glioma C6 Zellen und nachfolgender Maldi-TOF Analyse Dynein als Interaktionspartner gefunden (Daten nicht gezeigt). MACF1 hat die Fähigkeit große Proteinkomplexe aufzubauen (Chen *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2008). Dies legt die Vermutung nahe, dass MACF1 Isoform-3 in einem Komplex vorliegt, welcher eine Interaktion zwischen Mikrotubuli/DISC1/Mitochondrien stabilisiert. In der erwähnten MACF1 Isoform-3 spezifischen Koimmunpräzipitation an Glioma C6 Zellen, konnte DISC1 als ein Protein von 120 kDa präzipitiert werden. Für einige Isoformen des DISC1 Proteins wurden spezifische Lokalisationen innerhalb der Zelle gefunden (Übersicht in Ishizuka *et al.*, 2006). Bisher wurde über diese bereits bekannte 120 kDa Isoform jedoch noch nichts hinsichtlich ihrer Funktion beschrieben.

Aufgrund der Interaktion von MACF1 Isoform-3 und DISC1 ist denkbar, dass ein verändertes MACF1 ebenfalls in die Pathogenese genetischer, neurodegenerativer Erkrankungen involviert ist.

6. Ein Modell der MACF1 Isoform-3 Funktionen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen vielseitige Funktionen des MACF1 Isoform-3 Proteins innerhalb der Zelle. Durch seinen besonderen N-Terminus bindet das Protein an weitere Bindungspartner wie DISC1, RhoA, Nesprin-3 und Chromatin. Durch Myristilierung kann es in der Plasmamembran verankert und somit in räumliche Nähe zu Bindungspartner gebracht werden. Externe Signale wie TGF- β und HGF können die Lokalisation und/oder die Funktion des MACF1 Isoform-3 Proteins modulieren. So könnte MACF1 Isoform-3 durch die Interaktion mit der Rho-GTPase RhoA in Zellwanderungsprozesse eingreifen.

Durch eine Interaktion mit DISC1 lokalisiert MACF1 Isoform-3 an Mitochondrien. An der Kernhülle liegt MACF1 Isoform-3 assoziiert mit Nesprin-3 vor. Durch diese Interaktion können hier Mikrotubuli verankert und der Zellkern mit dem Zytoskelett verbunden werden. MACF1 Isoform-3 lokalisiert im Zellkern und kann mit Chromatin interagieren und diese möglicherweise mit dem Lamin-Netzwerk verknüpfen. Die Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit erbracht wurden, sind in das unten dargestellte Modell integriert.

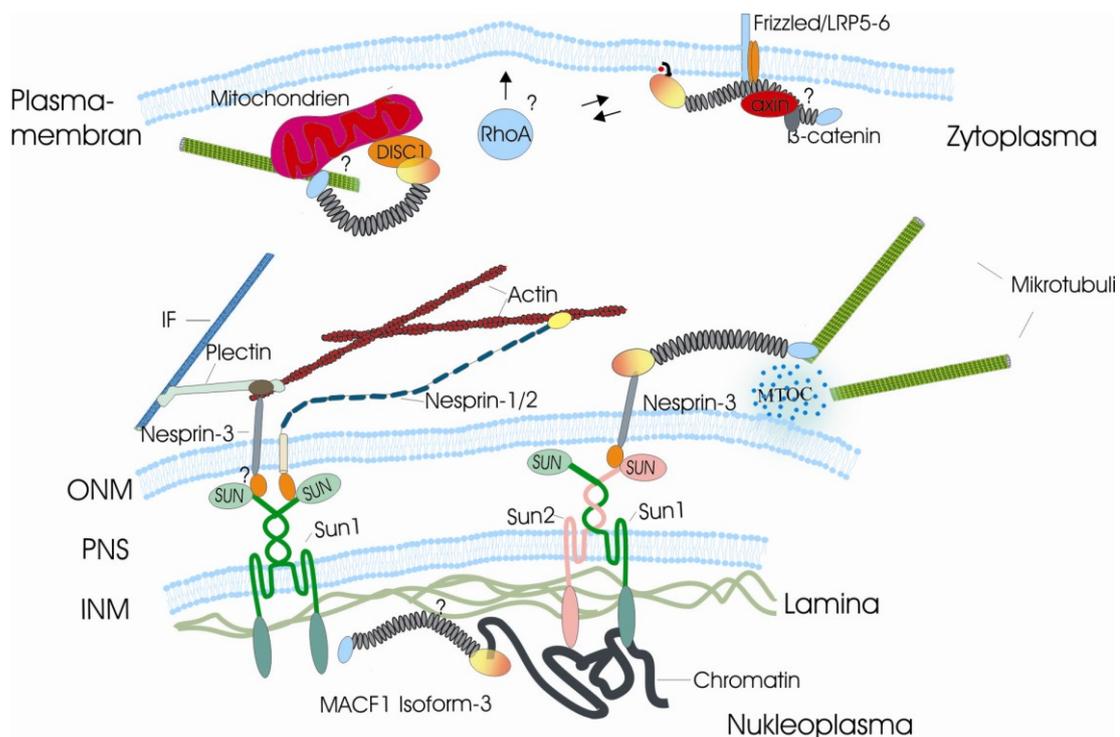


Abb.1. Modell für die Funktionen des MACF1 Isoform-3 Proteins.

Das Schema zeigt die Verankerung der MACF1 Isoform-3 (N-Terminus in Rot, CH2 Domäne in Gelb, Spektrinwiederholungen (SR) in Grau, MT bindende Domäne in Hellblau) an der Plasmamembran durch eine Myristilierung. Die Isoform-3 bindet direkt an den Frizzled/LRP5-6 Rezeptorkomplex und an β -Catenin/Axin Komplex (Chen *et al.*, 2006). Durch die Interaktion mit RhoA (Hellblau) könnte MACF1 Isoform-3 in die Migrationsprozesse eingreifen (Pfeile und Fragezeichen). MACF1 Isoform-3 interagiert mit DISC1 (Orange) im Zytoplasma und stabilisiert die Interaktion zwischen Mitochondrien/DISC1/MT. An der äußeren Kernmembran verbinden Nesprin-1/-2 den Zellkern mit dem Aktin-Zytoskelett (Rot). Nesprin-3 verbindet durch seine Interaktion mit Plectin (Hellblau) das Intermediärfilamentsystem (IF) und das Aktin-Zytoskelett mit dem Zellkern. Die Interaktion zwischen Sun1 (Grün), Sun2 (Pink) und den KASH-Proteinen (Nesprin-1/-2-3) an der äußeren (ONM) und inneren Kernmembran (INM) sind dargestellt. Nesprin-3 interagiert mit MACF1 Isoform-3 und verknüpft so Mikrotubuli mit der äußeren Kernmembran. Isoform-3 kann mit Chromatin interagieren und verankert diese möglicherweise mit Laminen. PNS: Perinukleärer Spalt; MTOC: Mikrotubuli organisierendes Zentrum. Fragezeichen deuten unbekannte Proteine oder hypothetische Interaktionen an.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Spektraplakin Familienmitglied MACF1 (*Microtubule Actin Cross-linking Factor 1*) ist ein großes (620-800 kDa) Multidomänenprotein, welches Mikrofilamente und Mikrotubuli quervernetzt. Das *MACF1* Gen kodiert für verschiedene alternativ gespleißte Isoformen, die in Größe, Länge und Domänenkomposition variieren. MACF1 Isoform-3 weist einen ungewöhnlichen N-Terminus auf, der auf neue Funktionen schließen lässt. Dieser ist aus einem einzigartig hoch konservierten 35 kDa N-Terminus aufgebaut, der direkt an die zweite Hälfte der Aktin-bindenden Domäne fusioniert ist. Die transiente Expression dieses N-Terminus inhibiert die Signaltransduktion der Rho-GTPasen. Durch die Verwendung des Hefe-Zwei-Hybrid Systems und Expressionsstudien konnte eine Interaktion mit dem Zytoskelettmodulator RhoA gezeigt werden.

Immunfluoreszenzstudien mit einem neu generierten polyklonalen MACF1 Isoform-3 Antikörper zeigten eine ungewöhnliche Lokalisierung um und innerhalb des Nukleus in verschiedenen Zelllinien und Geweben zusätzlich zu der gut charakterisierten Mikrotubuli Lokalisation. Permeabilisationassays mit Digitonin wiesen auf die Lokalisation von MACF1 Isoform-3 an der äußeren Kernhülle hin. Dort kolo-kalisiert MACF1 mit Nesprinen. Nesprine sind integrale Membranproteine der äußeren Kernhülle, die den Zellkern mit dem Zytoskelett verbinden. Durch GST-Proteininteraktions-, Immunpräzipitations-, Hefe-Zwei-Hybrid- und Expressionsstudien konnte eine Interaktion von MACF1 Isoform-3 mit Nesprin-3 gezeigt werden. Weiterhin deuten die Ergebnisse an, dass durch diese Interaktion MACF1 Isoform-3 Mikrotubuli an die Kernhülle transloziert und dort stabilisiert. Während der Mitose lokalisiert MACF1 Isoform-3 entlang der mitotischen Spindel. Durch Chromatin Immunpräzipitation und Expressionsstudien konnte eine neue Assoziation mit Chromatin und Laminen für MACF1 Proteine gezeigt werden.

Weiterhin konnten erste Belege für Umlagerungen von MACF1 Isoform-3 gezeigt werden. Durch Zugabe von Wachstumsfaktoren (Wnt-3, HGF und TGF β) sowie durch Serumentzug und Zugabe von Calcium-Ionen konnte in Immunfluoreszenzstudien die subzelluläre Verteilung von MACF1 Isoform-3 beeinflusst werden, wobei MACF1 Isoform-3 nach Serumentzug mit Mitochondrien kolo-kalisierte. Ein möglicher Interaktionspartner an den Mitochondrien ist DISC1 (*Disrupted in Schizophrenia 1*), das als *high risk gene* für die Entstehung von Schizophrenie gilt. Durch Hefe-Zwei-Hybrid (Carmago *et al.*, 2006) Immunpräzipitations- und Expressionsstudien wurde eine Interaktion mit MACF1 Isoform-3 nachgewiesen. Diese Daten deuten an, dass MACF1 Isoform-3 eine mögliche Funktion in der Entstehung von Schizophrenie besitzt. Wir stellen daher die Hypothese auf, dass MACF1 Isoform-3 eine wichtige Rolle in der Migration und Proliferation von Zellen ausübt und hierbei in die RhoA- und Wnt Signaltransduktion involviert ist.

ABSTRACT

MACF1 (Microtubule Actin Cross-linking Factor 1, 620-800 kDa) is a multidomain protein that associates with microfilaments and microtubules. The *MACF1* gene encodes several alternatively spliced transcripts, which differ in length, domain composition and their expression pattern. In particular, MACF1 isoform-3 shows an unusual N-terminus, which suggests novel functions. It is composed of a unique and highly conserved 35 kDa segment that is fused to the second half of the actin-binding domain, which when overexpressed inhibits Rho-GTPase signalling. Using the yeast two hybrid and transfection assays we document an isoform-3 functional association with the cytoskeleton modulator RhoA. By employing a specific antibody against isoform-3, we reveal for the endogenous MACF1 protein an unusual localization pattern in and around the nucleus in various cell lines and tissues, in addition to its well-characterized microtubule-network pattern. Utilizing selective plasmamembrane permeabilization assays we demonstrate the presence of the MACF1 isoform-3 at the outer nuclear envelope, where it colocalizes with Nesprins. Nesprins are specific integral nuclear envelope proteins that facilitate the integration of the nuclear surface with the surrounding cytoskeleton. Using GST-pulldown, immunoprecipitation and colocalization studies, we demonstrate the association of the MACF1 N-terminus with Nesprin-3. Furthermore our results suggest that MACF1 isoform-3 tethers and stabilizes microtubules at the nuclear envelope. During mitosis, however, MACF1 isoform-3 localizes at the mitotic spindle apparatus. Using chromatin immunoprecipitation and transfection assays, we document novel nuclear functions for MACF1 that include associations with chromatin and the nuclear lamina.

We provide compelling evidence underlining the dynamic nature of the MACF1 molecule. In particular, we show that its subcellular localization is influenced by serum starvation, calcium-ions, Wnt-3, TGF- β and HGF growth factors treatment. Strikingly, upon serum starvation MACF1 isoform-3 colocalized with mitochondria. By performing immunoprecipitation and transfection studies, we identify the high risk gene for schizophrenia DISC1 (Disrupted in Schizophrenia 1), a well described mitochondria binding protein, as a novel functional binding partner for MACF1 isoform-3. These results suggest a potential role for MACF1 isoform-3 in the schizophrenia pathogenesis. In summary our data suggest novel and multiple functions for MACF1 isoform-3 in cellular architecture and the Wnt- and RhoA-signalling pathways.

LITERATUR

- Akhmanova, A., A.L. Mausset-Bonnefont, W. van Cappellen, N. Keijzer, C.C. Hoogenraad, T. Stepanova, K. Drabek, J. van der Wees, M. Mommaas, J. Onderwater, H. van der Meulen, M.E. Tanenbaum, R.H. Medema, J. Hoogerbrugge, J. Vreeburg, E.J. Uringa, J.A. Grootegoed, F. Grosveld, and N. Galjart. 2005. The microtubule plus-end-tracking protein CLIP-170 associates with the spermatid manchette and is essential for spermatogenesis. *Genes Dev.* 19:2501-15.
- Anastasiadis, P.Z., and A.B. Reynolds. 2000. The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer. *J Cell Sci.* 113 (Pt 8):1319-34.
- Antolik, C., D.H. Catino, A.M. O'Neill, W.G. Resneck, J.A. Ursitti, and R.J. Bloch. 2007. The actin binding domain of ACF7 binds directly to the tetratricopeptide repeat domains of rapsyn. *Neuroscience.* 145:56-65.
- Babakov, V.N., D.E. Bobkov, O.A. Petukhova, L.V. Turoverova, I.V. Kropacheva, E.P. Podol'skaia, and G.P. Pinaev. 2004. [alpha-Actinin-4 and p65/RelA subunit of NF-kappaB transcription factor are co-localized and migrate together into the nucleus in EGF-stimulated A431 cell]. *Tsitologiya.* 46:1064-72.
- Baines, A.J. 2003. Comprehensive analysis of all triple helical repeats in beta-spectrins reveals patterns of selective evolutionary conservation. *Cell Mol Biol Lett.* 8:195-214.
- Bernier, G., A. Brown, G. Dalpe, Y. De Repentigny, M. Mathieu, and R. Kothary. 1995. Dystonin expression in the developing nervous system predominates in the neurons that degenerate in dystonia musculorum mutant mice. *Mol Cell Neurosci.* 6:509-20.
- Bernier, G., A. Brown, G. Dalpe, M. Mathieu, Y. De Repentigny, and R. Kothary. 1995. Dystonin transcripts are altered and their levels are reduced in the mouse neurological mutant dt24J. *Biochem Cell Biol.* 73:605-9.
- Bernier, G., M. Mathieu, Y. De Repentigny, S.M. Vidal, and R. Kothary. 1996. Cloning and characterization of mouse ACF7, a novel member of the dystonin subfamily of actin binding proteins. *Genomics.* 38:19-29.
- Bernier, G., M. Pool, M. Kilcup, J. Alfoldi, Y. De Repentigny, and R. Kothary. 2000. Acf7 (MACF) is an actin and microtubule linker protein whose expression predominates in neural, muscle, and lung development. *Dev Dyn.* 219:216-25.
- Bertram, C., N. von Neuhoff, B. Skawran, D. Steinemann, B. Schlegelberger, and R. Hass. 2008. The differentiation/retrodifferentiation program of human U937 leukemia cells is accompanied by changes of VCP/p97. *BMC Cell Biol.* 9:12.
- Bewley, C.A., A.M. Gronenborn, and G.M. Clore. 1998. Minor groove-binding architectural proteins: structure, function, and DNA recognition. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 27:105-31.
- Blackwood, D.H., A. Fordyce, M.T. Walker, D.M. St Clair, D.J. Porteous, and W.J. Muir. 2001. Schizophrenia and affective disorders--cosegregation with a translocation at chromosome 1q42 that directly disrupts brain-expressed genes: clinical and P300 findings in a family. *Am J Hum Genet.* 69:428-33.
- Bootman, M.D., and M.J. Berridge. 1995. The elemental principles of calcium signaling. *Cell.* 83:675-8.
- Bosher, J.M., B.S. Hahn, R. Legouis, S. Sookhareea, R.M. Weimer, A. Gansmuller, A.D. Chisholm, A.M. Rose, J.L. Bessereau, and M. Labouesse. 2003. The *Caenorhabditis elegans* vab-10 spectraplakins isoforms protect the epidermis against internal and external forces. *J Cell Biol.* 161:757-68.
- Bourne, H.R., L. Wrischnik, and C. Kenyon. 1990. Ras proteins. Some signal developments. *Nature.* 348:678-9.
- Bown, N., S. Cotterill, M. Lastowska, S. O'Neill, A.D. Pearson, D. Plantaz, M. Meddeb, G. Danglot, C. Brinkschmidt, H. Christiansen, G. Laureys, F. Speleman, J. Nicholson, A. Bernheim, D.R. Betts, J. Vandesompele, and N. Van Roy. 1999. Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med.* 340:1954-61.
- Bowyer, P.W., R.S. Gunaratne, M. Grainger, C. Withers-Martinez, S.R. Wickramasinghe, E.W. Tate, R.J. Leatherbarrow, K.A. Brown, A.A. Holder, and D.F. Smith. 2007. Molecules incorporating a benzothiazole core scaffold inhibit the N-myristoyltransferase of *Plasmodium falciparum*. *Biochem J.* 408:173-80.

- Broderick, M.J., and S.J. Winder. 2005. Spectrin, alpha-actinin, and dystrophin. *Adv Protein Chem.* 70:203-46.
- Broers, J.L., F.C. Ramaekers, G. Bonne, R.B. Yaou, and C.J. Hutchison. 2006. Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing. *Physiol Rev.* 86:967-1008.
- Brown, A., G. Bernier, M. Mathieu, J. Rossant, and R. Kothary. 1995. The mouse dystonia musculorum gene is a neural isoform of bullous pemphigoid antigen 1. *Nat Genet.* 10:301-6.
- Brown, A., G. Dalpe, M. Mathieu, and R. Kothary. 1995. Cloning and characterization of the neural isoforms of human dystonin. *Genomics.* 29:777-80.
- Brown, N.H., and F.C. Kafatos. 1988. Functional cDNA libraries from *Drosophila* embryos. *J Mol Biol.* 203:425-37.
- Burgoyne, R.D., D.W. O'Callaghan, B. Hasdemir, L.P. Haynes, and A.V. Tepikin. 2004. Neuronal Ca²⁺-sensor proteins: multitasking regulators of neuronal function. *Trends Neurosci.* 27:203-9.
- Burridge, K., and P. Mangeat. 1984. An interaction between vinculin and talin. *Nature.* 308:744-6.
- Byers, T.J., A.H. Beggs, E.M. McNally, and L.M. Kunkel. 1995. Novel actin crosslinker superfamily member identified by a two step degenerate PCR procedure. *FEBS Lett.* 368:500-4.
- Camargo, L.M., V. Collura, J.C. Rain, K. Mizuguchi, H. Hermjakob, S. Kerrien, T.P. Bonnert, P.J. Whiting, and N.J. Brandon. 2007. Disrupted in Schizophrenia 1 Interactome: evidence for the close connectivity of risk genes and a potential synaptic basis for schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 12:74-86.
- Cassimeris, L., and C. Spittle. 2001. Regulation of microtubule-associated proteins. *Int Rev Cytol.* 210:163-226.
- Chakrabarti, A., D.A. Kelkar, and A. Chattopadhyay. 2006. Spectrin organization and dynamics: new insights. *Biosci Rep.* 26:369-86.
- Chen, H.J., C.M. Lin, C.S. Lin, R. Perez-Olle, C.L. Leung, and R.K. Liem. 2006. The role of microtubule actin cross-linking factor 1 (MACF1) in the Wnt signaling pathway. *Genes Dev.* 20:1933-45.
- Choi, H.J., S. Park-Snyder, L.T. Pascoe, K.J. Green, and W.I. Weis. 2002. Structures of two intermediate filament-binding fragments of desmoplakin reveal a unique repeat motif structure. *Nat Struct Biol.* 9:612-20.
- Clevers, H. 2006. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell.* 127:469-80.
- Clevers, H., and M. van de Wetering. 1997. TCF/LEF factor earn their wings. *Trends Genet.* 13:485-9.
- Cokol, M., R. Nair, and B. Rost. 2000. Finding nuclear localization signals. *EMBO Rep.* 1:411-5.
- Crisp, M., Q. Liu, K. Roux, J.B. Rattner, C. Shanahan, B. Burke, P.D. Stahl, and D. Hodzic. 2006. Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *J Cell Biol.* 172:41-53.
- Dennler, S., S. Itoh, D. Vivien, P. ten Dijke, S. Huet, and J.M. Gauthier. 1998. Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *Embo J.* 17:3091-100.
- Dingova, H., J. Fukalova, M. Maninova, V.V. Philimonenko, and P. Hozak. 2008. Ultrastructural localization of actin and actin-binding proteins in the nucleus. *Histochem Cell Biol.*
- Djinovic-Carugo, K., M. Gautel, J. Ylanne, and P. Young. 2002. The spectrin repeat: a structural platform for cytoskeletal protein assemblies. *FEBS Lett.* 513:119-23.
- Djinovic-Carugo, K., P. Young, M. Gautel, and M. Saraste. 1999. Structure of the alpha-actinin rod: molecular basis for cross-linking of actin filaments. *Cell.* 98:537-46.
- Dowling, J., Y. Yang, R. Wollmann, L.F. Reichardt, and E. Fuchs. 1997. Developmental expression of BPAG1-n: insights into the spastic ataxia and gross neurologic degeneration in dystonia musculorum mice. *Dev Biol.* 187:131-42.

- Drabek, K., M. van Ham, T. Stepanova, K. Draegestein, R. van Horsen, C.L. Sayas, A. Akhmanova, T. Ten Hagen, R. Smits, R. Fodde, F. Grosveld, and N. Galjart. 2006. Role of CLASP2 in microtubule stabilization and the regulation of persistent motility. *Curr Biol.* 16:2259-64.
- Dunn, L.A., and R.W. Holz. 1983. Catecholamine secretion from digitonin-treated adrenal medullary chromaffin cells. *J Biol Chem.* 258:4989-93.
- Dwyer, N., and G. Blobel. 1976. A modified procedure for the isolation of a pore complex-lamina fraction from rat liver nuclei. *J Cell Biol.* 70:581-91.
- Eastman, Q., and R. Grosschedl. 1999. Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Curr Opin Cell Biol.* 11:233-40.
- Eddy, S.R., G. Mitchison, and R. Durbin. 1995. Maximum discrimination hidden Markov models of sequence consensus. *J Comput Biol.* 2:9-23.
- Eisenmenger, W., J. Wilske, and D. Stiefel. 1989. [Shot-stop ammunition]. *Z Rechtsmed.* 103:137-45.
- Elliott, C.E., B. Becker, S. Oehler, M.J. Castanon, R. Hauptmann, and G. Wiche. 1997. Plectin transcript diversity: identification and tissue distribution of variants with distinct first coding exons and rodless isoforms. *Genomics.* 42:115-25.
- Ellis, D.J., H. Jenkins, W.G. Whitfield, and C.J. Hutchison. 1997. GST-lamin fusion proteins act as dominant negative mutants in *Xenopus* egg extract and reveal the function of the lamina in DNA replication. *J Cell Sci.* 110 (Pt 20):2507-18.
- Foisner, R., B. Feldman, L. Sander, and G. Wiche. 1991. Monoclonal antibody mapping of structural and functional plectin epitopes. *J Cell Biol.* 112:397-405.
- Foisner, R., P. Traub, and G. Wiche. 1991. Protein kinase A- and protein kinase C-regulated interaction of plectin with lamin B and vimentin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:3812-6.
- Foisner, R., and G. Wiche. 1987. Structure and hydrodynamic properties of plectin molecules. *J Mol Biol.* 198:515-31.
- Fontao, L., D. Geerts, I. Kuikman, J. Koster, D. Kramer, and A. Sonnenberg. 2001. The interaction of plectin with actin: evidence for cross-linking of actin filaments by dimerization of the actin-binding domain of plectin. *J Cell Sci.* 114:2065-76.
- Franke, W.W., U. Scheer, G. Krohne, and E.D. Jarasch. 1981. The nuclear envelope and the architecture of the nuclear periphery. *J Cell Biol.* 91:39s-50s.
- Fuchs, E., and D.W. Cleveland. 1998. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science.* 279:514-9.
- Fuchs, E., and I. Karakesisoglou. 2001. Bridging cytoskeletal intersections. *Genes Dev.* 15:1-14.
- Fuchs, E., and Y. Yang. 1999. Crossroads on cytoskeletal highways. *Cell.* 98:547-50.
- Fuchs, P., M. Zorer, G.A. Reznicek, D. Spazierer, S. Oehler, M.J. Castanon, R. Hauptmann, and G. Wiche. 1999. Unusual 5' transcript complexity of plectin isoforms: novel tissue-specific exons modulate actin binding activity. *Hum Mol Genet.* 8:2461-72.
- Fukata, M., and K. Kaibuchi. 2001. Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:887-97.
- Fuss, B., F. Josten, M. Feix, and M. Hoch. 2004. Cell movements controlled by the Notch signalling cascade during foregut development in *Drosophila*. *Development.* 131:1587-95.
- Geerts, D., L. Fontao, M.G. Nievers, R.Q. Schaapveld, P.E. Purkis, G.N. Wheeler, E.B. Lane, I.M. Leigh, and A. Sonnenberg. 1999. Binding of integrin alpha6beta4 to plectin prevents plectin association with F-actin but does not interfere with intermediate filament binding. *J Cell Biol.* 147:417-34.

- Gerace, L., and B. Burke. 1988. Functional organization of the nuclear envelope. *Annu Rev Cell Biol.* 4:335-74.
- Gherardi, E., M. Sharpe, K. Lane, A. Sirulnik, and M. Stoker. 1993. Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF), the c-met receptor and the behaviour of epithelial cells. *Symp Soc Exp Biol.* 47:163-81.
- Gimona, M., K. Djinovic-Carugo, W.J. Kranewitter, and S.J. Winder. 2002. Functional plasticity of CH domains. *FEBS Lett.* 513:98-106.
- Gong, T.W., C.G. Besirli, and M.I. Lomax. 2001. MACF1 gene structure: a hybrid of plectin and dystrophin. *Mamm Genome.* 12:852-61.
- Goriounov, D., C.L. Leung, and R.K. Liem. 2003. Protein products of human Gas2-related genes on chromosomes 17 and 22 (hGAR17 and hGAR22) associate with both microfilaments and microtubules. *J Cell Sci.* 116:1045-58.
- Gorlich, D., and I.W. Mattaj. 1996. Nucleocytoplasmic transport. *Science.* 271:1513-8.
- Gotzmann, J., and R. Foisner. 1999. Lamins and lamin-binding proteins in functional chromatin organization. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 9:257-65.
- Green, K.J., D.A. Parry, P.M. Steinert, M.L. Virata, R.M. Wagner, B.D. Angst, and L.A. Nilles. 1990. Structure of the human desmoplakins. Implications for function in the desmosomal plaque. *J Biol Chem.* 265:11406-7.
- Green, K.J., M.L. Virata, G.W. Elgart, J.R. Stanley, and D.A. Parry. 1992. Comparative structural analysis of desmoplakin, bullous pemphigoid antigen and plectin: members of a new gene family involved in organization of intermediate filaments. *Int J Biol Macromol.* 14:145-53.
- Gregory, S.L., and N.H. Brown. 1998. kakapo, a gene required for adhesion between and within cell layers in *Drosophila*, encodes a large cytoskeletal linker protein related to plectin and dystrophin. *J Cell Biol.* 143:1271-82.
- Grevengoed, E.E., and M. Peifer. 2003. Cytoskeletal connections: building strong cells in new ways. *Curr Biol.* 13:R568-70.
- Grzesiak, J.J., and M.D. Pierschbacher. 1995. Shifts in the concentrations of magnesium and calcium in early porcine and rat wound fluids activate the cell migratory response. *J Clin Invest.* 95:227-33.
- Guo, L., L. Degenstein, J. Dowling, Q.C. Yu, R. Wollmann, B. Perman, and E. Fuchs. 1995. Gene targeting of BPAG1: abnormalities in mechanical strength and cell migration in stratified epithelia and neurologic degeneration. *Cell.* 81:233-43.
- Hall, A., and C.D. Nobes. 2000. Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 355:965-70.
- Hartwig, J.H. 1994. Actin-binding proteins 1: spectrin superfamily. *Protein Profile.* 1:706-78.
- Harvey, P., A. Warn, S. Dobbin, N. Arakaki, Y. Daikuhara, M.C. Jaurand, and R.M. Warn. 1998. Expression of HGF/SF in mesothelioma cell lines and its effects on cell motility, proliferation and morphology. *Br J Cancer.* 77:1052-9.
- Herrmann, H., and G. Wiche. 1983. Specific in situ phosphorylation of plectin in detergent-resistant cytoskeletons from cultured Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 258:14610-8.
- Holmer, L., and H.J. Worman. 2001. Inner nuclear membrane proteins: functions and targeting. *Cell Mol Life Sci.* 58:1741-7.
- Ikura, M. 1996. Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends Biochem Sci.* 21:14-7.
- Imamura, M., T. Endo, M. Kuroda, T. Tanaka, and T. Masaki. 1988. Substructure and higher structure of chicken smooth muscle alpha-actinin molecule. *J Biol Chem.* 263:7800-5.
- Ishizuka, K., M. Paek, A. Kamiya, and A. Sawa. 2006. A review of Disrupted-In-Schizophrenia-1 (DISC1): neurodevelopment, cognition, and mental conditions. *Biol Psychiatry.* 59:1189-97.

- James, R., R.R. Adams, S. Christie, S.R. Buchanan, D.J. Porteous, and J.K. Millar. 2004. Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1) is a multicompartimentalized protein that predominantly localizes to mitochondria. *Mol Cell Neurosci.* 26:112-22.
- Jefferson, J.J., C.L. Leung, and R.K. Liem. 2006. Dissecting the sequence specific functions of alternative N-terminal isoforms of mouse bullous pemphigoid antigen 1. *Exp Cell Res.* 312:2712-25.
- Jefferson, J.J., C.L. Leung, and R.K. Liem. 2004. Plakins: goliaths that link cell junctions and the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:542-53.
- Jin, T., I. George Fantus, and J. Sun. 2008. Wnt and beyond Wnt: multiple mechanisms control the transcriptional property of beta-catenin. *Cell Signal.* 20:1697-704.
- Kakinuma, T., H. Ichikawa, Y. Tsukada, T. Nakamura, and B.H. Toh. 2004. Interaction between p230 and MACF1 is associated with transport of a glycosyl phosphatidyl inositol-anchored protein from the Golgi to the cell periphery. *Exp Cell Res.* 298:388-98.
- Kandert, S., Y. Luke, T. Kleinhenz, S. Neumann, W. Lu, V.M. Jaeger, M. Munck, M. Wehnert, C.R. Muller, Z. Zhou, A.A. Noegel, M.C. Dabauvalle, and I. Karakesisoglou. 2007. Nesprin-2 giant safeguards nuclear envelope architecture in LMNA S143F progeria cells. *Hum Mol Genet.* 16:2944-59.
- Kerr, J.R. 2005. Pathogenesis of parvovirus B19 infection: host gene variability, and possible means and effects of virus persistence. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 52:335-9.
- Ketema, M., K. Wilhelmsen, I. Kuikman, H. Janssen, D. Hodzic, and A. Sonnenberg. 2007. Requirements for the localization of nesprin-3 at the nuclear envelope and its interaction with plectin. *J Cell Sci.* 120:3384-94.
- Klymkowsky, M.W. 1999. Weaving a tangled web: the interconnected cytoskeleton. *Nat Cell Biol.* 1:E121-3.
- Kodama, A., I. Karakesisoglou, E. Wong, A. Vaezi, and E. Fuchs. 2003. ACF7: an essential integrator of microtubule dynamics. *Cell.* 115:343-54.
- Korenbaum, E., and F. Rivero. 2002. Calponin homology domains at a glance. *J Cell Sci.* 115:3543-5.
- Kouklis, P.D., E. Hutton, and E. Fuchs. 1994. Making a connection: direct binding between keratin intermediate filaments and desmosomal proteins. *J Cell Biol.* 127:1049-60.
- Krohne, G., S.L. Wolin, F.D. McKeon, W.W. Franke, and M.W. Kirschner. 1987. 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.
- Lankes, W.T., and H. Furthmayr. 1991. Moesin: a member of the protein 4.1-talin-ezrin family of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:8297-301.
- Lansbergen, G., and A. Akhmanova. 2006. Microtubule plus end: a hub of cellular activities. *Traffic.* 7:499-507.
- Lee, S., K.L. Harris, P.M. Whittington, and P.A. Kolodziej. 2000. Shot stop is allelic to kakapo, and encodes rod-like cytoskeletal-associated proteins required for axon extension. *J Neurosci.* 20:1096-108.
- Lee, S., and P.A. Kolodziej. 2002. Shot Stop provides an essential link between F-actin and microtubules during axon extension. *Development.* 129:1195-204.
- Lee, S., and P.A. Kolodziej. 2002. The plakin Shot Stop and the RhoA GTPase are required for E-cadherin-dependent apical surface remodeling during tracheal tube fusion. *Development.* 129:1509-20.
- Leung, C.L., K.J. Green, and R.K. Liem. 2002. Plakins: a family of versatile cytolinker proteins. *Trends Cell Biol.* 12:37-45.
- Leung, C.L., D. Sun, and R.K. Liem. 1999. The intermediate filament protein peripherin is the specific interaction partner of mouse BPAG1-n (dystonin) in neurons. *J Cell Biol.* 144:435-46.

- Leung, C.L., D. Sun, M. Zheng, D.R. Knowles, and R.K. Liem. 1999. Microtubule actin cross-linking factor (MACF): a hybrid of dystonin and dystrophin that can interact with the actin and microtubule cytoskeletons. *J Cell Biol.* 147:1275-86.
- Leung, C.L., M. Zheng, S.M. Prater, and R.K. Liem. 2001. The BPAG1 locus: Alternative splicing produces multiple isoforms with distinct cytoskeletal linker domains, including predominant isoforms in neurons and muscles. *J Cell Biol.* 154:691-7.
- Libotte, T., H. Zaim, S. Abraham, V.C. Padmakumar, M. Schneider, W. Lu, M. Munck, C. Hutchison, M. Wehnert, B. Fahrenkrog, U. Sauder, U. Aebi, A.A. Noegel, and I. Karakesisoglou. 2005. Lamin A/C-dependent localization of Nesprin-2, a giant scaffolder at the nuclear envelope. *Mol Biol Cell.* 16:3411-24.
- Lichtstein, D., and D. Rodbard. 1987. A second look at the second messenger hypothesis. *Life Sci.* 40:2041-51.
- Lin, C.M., H.J. Chen, C.L. Leung, D.A. Parry, and R.K. Liem. 2005. Microtubule actin crosslinking factor 1b: a novel plakin that localizes to the Golgi complex. *J Cell Sci.* 118:3727-38.
- Litjens, S.H., J. Koster, I. Kuikman, S. van Wilpe, J.M. de Pereda, and A. Sonnenberg. 2003. Specificity of binding of the plectin actin-binding domain to beta4 integrin. *Mol Biol Cell.* 14:4039-50.
- Liu, J.J., J. Ding, A.S. Kowal, T. Nardine, E. Allen, J.D. Delcroix, C. Wu, W. Mobley, E. Fuchs, and Y. Yang. 2003. BPAG1n4 is essential for retrograde axonal transport in sensory neurons. *J Cell Biol.* 163:223-9.
- Lovejoy, B., S. Choe, D. Cascio, D.K. McRorie, W.F. DeGrado, and D. Eisenberg. 1993. Crystal structure of a synthetic triple-stranded alpha-helical bundle. *Science.* 259:1288-93.
- Lu, Wenshu Sun proteins in higher eukaryotes, "structural bridges" connecting the nuclear interior with the cytoskeleton, 2007 Dissertation Universität zu Köln
- Lu, W., J. Gotzmann, L. Sironi, V.M. Jaeger, M. Schneider, Y. Luke, M. Uhlen, C.A. Szigartyo, A. Brachner, J. Ellenberg, R. Foisner, A.A. Noegel, and I. Karakesisoglou. 2008. Sun1 forms immobile macromolecular assemblies at the nuclear envelope. *Biochim Biophys Acta.* 1783:2415-26.
- Luke, Y., H. Zaim, I. Karakesisoglou, V.M. Jaeger, L. Sellin, W. Lu, M. Schneider, S. Neumann, A. Beijer, M. Munck, V.C. Padmakumar, J. Gloy, G. Walz, and A.A. Noegel. 2008. Nesprin-2 Giant (NUANCE) maintains nuclear envelope architecture and composition in skin. *J Cell Sci.* 121:1887-98.
- Lüke, Yvonne Charakterisierung der Nesprin-2 Giant Funktionen bei der Kernmembranarchitektur und in Laminopathien, 2008 Dissertation Universität zu Köln
- Lundberg, S., J. Bjork, L. Lofvenberg, and L. Backman. 1995. Cloning, expression and characterization of two putative calcium-binding sites in human non-erythroid alpha-spectrin. *Eur J Biochem.* 230:658-65.
- Malone, C.J., L. Misner, N. Le Bot, M.C. Tsai, J.M. Campbell, J. Ahringer, and J.G. White. 2003. The *C. elegans* hook protein, ZYG-12, mediates the essential attachment between the centrosome and nucleus. *Cell.* 115:825-36.
- Massague, J., and D. Wotton. 2000. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *Embo J.* 19:1745-54.
- McIlwain, H. 1977. Extended roles in the brain for second-messenger systems. *Neuroscience.* 2:357-72.
- McKeon, F.D., M.W. Kirschner, and D. Caput. 1986. Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature.* 319:463-8.
- McMahon, L.W., J. Sangerman, S.R. Goodman, K. Kumaresan, and M.W. Lambert. 2001. Human alpha spectrin II and the FANCA, FANCC, and FANCG proteins bind to DNA containing psoralen interstrand cross-links. *Biochemistry.* 40:7025-34.
- Meng, J.J., E.A. Bornslaeger, K.J. Green, P.M. Steinert, and W. Ip. 1997. Two-hybrid analysis reveals fundamental differences in direct interactions between desmoplakin and cell type-specific intermediate filaments. *J Biol Chem.* 272:21495-503.

- Metral, S., B. Machnicka, S. Bigot, Y. Colin, D. Dhermy, and M.C. Lecomte. 2008. Alpha II-spectrin is critical for cell adhesion and cell cycle. *J Biol Chem*.
- Michalopoulos, G.K., W. Bowen, A.K. Nussler, M.J. Becich, and T.A. Howard. 1993. Comparative analysis of mitogenic and morphogenic effects of HGF and EGF on rat and human hepatocytes maintained in collagen gels. *J Cell Physiol*. 156:443-52.
- Millar, J.K., R. James, S. Christie, and D.J. Porteous. 2005. Disrupted in schizophrenia 1 (DISC1): subcellular targeting and induction of ring mitochondria. *Mol Cell Neurosci*. 30:477-84.
- Millar, J.K., J.C. Wilson-Annan, S. Anderson, S. Christie, M.S. Taylor, C.A. Semple, R.S. Devon, D.M. Clair, W.J. Muir, D.H. Blackwood, and D.J. Porteous. 2000. Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. *Hum Mol Genet*. 9:1415-23.
- Miller, J.E., M.J. Rico, and R.P. Hall, 3rd. 1993. IgG antibodies from patients with bullous pemphigoid bind to fusion proteins encoded by BPAg1 cDNA. *J Invest Dermatol*. 101:779-82.
- Mislow, J.M., J.M. Holaska, M.S. Kim, K.K. Lee, M. Segura-Totten, K.L. Wilson, and E.M. McNally. 2002. Nesprin-1alpha self-associates and binds directly to emerin and lamin A in vitro. *FEBS Lett*. 525:135-40.
- Mislow, J.M., M.S. Kim, D.B. Davis, and E.M. McNally. 2002. Myne-1, a spectrin repeat transmembrane protein of the myocyte inner nuclear membrane, interacts with lamin A/C. *J Cell Sci*. 115:61-70.
- Monga, S.P., W.M. Mars, P. Pediaditakis, A. Bell, K. Mule, W.C. Bowen, X. Wang, R. Zarnegar, and G.K. Michalopoulos. 2002. Hepatocyte growth factor induces Wnt-independent nuclear translocation of beta-catenin after Met-beta-catenin dissociation in hepatocytes. *Cancer Res*. 62:2064-71.
- Murillo, M.M., I. Carmona-Cuenca, G. Del Castillo, C. Ortiz, C. Roncero, A. Sanchez, M. Fernandez, and I. Fabregat. 2007. Activation of NADPH oxidase by transforming growth factor-beta in hepatocytes mediates up-regulation of epidermal growth factor receptor ligands through a nuclear factor-kappaB-dependent mechanism. *Biochem J*. 405:251-9.
- Murillo, M.M., G. del Castillo, A. Sanchez, M. Fernandez, and I. Fabregat. 2005. Involvement of EGF receptor and c-Src in the survival signals induced by TGF-beta1 in hepatocytes. *Oncogene*. 24:4580-7.
- Nelson, W.J. 2008. Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex. *Biochem Soc Trans*. 36:149-55.
- Nikolic, B., E. Mac Nulty, B. Mir, and G. Wiche. 1996. Basic amino acid residue cluster within nuclear targeting sequence motif is essential for cytoplasmic plectin-vimentin network junctions. *J Cell Biol*. 134:1455-67.
- Nobes, C.D., and A. Hall. 1995. Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans*. 23:456-9.
- Noren, N.K., B.P. Liu, K. Burrige, and B. Kreft. 2000. p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *J Cell Biol*. 150:567-80.
- O'Keefe, E.J., and W.J. Pledger. 1983. A model of cell cycle control: sequential events regulated by growth factors. *Mol Cell Endocrinol*. 31:167-86.
- Okuda, T., S. Matsuda, S. Nakatsugawa, Y. Ichigotani, N. Iwahashi, M. Takahashi, T. Ishigaki, and M. Hamaguchi. 1999. Molecular cloning of macrophin, a human homologue of *Drosophila* kakapo with a close structural similarity to plectin and dystrophin. *Biochem Biophys Res Commun*. 264:568-74.
- Okumura, M., H. Yamakawa, O. Ohara, and K. Owaribe. 2002. Novel alternative splicings of BPAG1 (bullous pemphigoid antigen 1) including the domain structure closely related to MACF (microtubule actin cross-linking factor). *J Biol Chem*. 277:6682-7.
- O'Neill, S., L. Ekstrom, M. Lastowska, P. Roberts, G.M. Brodeur, U.R. Kees, M. Schwab, and N. Bown. 2001. MYCN amplification and 17q in neuroblastoma: evidence for structural association. *Genes Chromosomes Cancer*. 30:87-90.
- Otey, C.A., and O. Carpen. 2004. Alpha-actinin revisited: a fresh look at an old player. *Cell Motil Cytoskeleton*. 58:104-11.

- Ozeki, Y., T. Tomoda, J. Kleiderlein, A. Kamiya, L. Bord, K. Fujii, M. Okawa, N. Yamada, M.E. Hatten, S.H. Snyder, C.A. Ross, and A. Sawa. 2003. Disrupted-in-Schizophrenia-1 (DISC-1): mutant truncation prevents binding to NudE-like (NUDEL) and inhibits neurite outgrowth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:289-94.
- Padmakumar, V.C., T. Libotte, W. Lu, H. Zaim, S. Abraham, A.A. Noegel, J. Gotzmann, R. Foisner, and I. Karakesisoglou. 2005. The inner nuclear membrane protein Sun1 mediates the anchorage of Nesprin-2 to the nuclear envelope. *J Cell Sci.* 118:3419-30.
- Pagni, M., V. Ioannidis, L. Cerutti, M. Zahn-Zabal, C.V. Jongeneel, J. Hau, O. Martin, D. Kuznetsov, and L. Falquet. 2007. MyHits: improvements to an interactive resource for analyzing protein sequences. *Nucleic Acids Res.* 35:W433-7.
- Presnell, S.C., D.B. Stolz, W.M. Mars, M. Jo, G.K. Michalopoulos, and S.C. Strom. 1997. Modifications of the hepatocyte growth factor/c-met pathway by constitutive expression of transforming growth factor-alpha in rat liver epithelial cells. *Mol Carcinog.* 18:244-55.
- Prokop, A., J. Uhler, J. Roote, and M. Bate. 1998. The kakapo mutation affects terminal arborization and central dendritic sprouting of *Drosophila* motorneurons. *J Cell Biol.* 143:1283-94.
- Prout, M., Z. Damania, J. Soong, D. Fristrom, and J.W. Fristrom. 1997. Autosomal mutations affecting adhesion between wing surfaces in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 146:275-85.
- Rampazzo, A., A. Nava, S. Malacrida, G. Beffagna, B. Bauce, V. Rossi, R. Zimbello, B. Simionati, C. Basso, G. Thiene, J.A. Towbin, and G.A. Danieli. 2002. Mutation in human desmoplakin domain binding to plakoglobin causes a dominant form of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Hum Genet.* 71:1200-6.
- Read, C.M., P.D. Cary, C. Crane-Robinson, P.C. Driscoll, and D.G. Norman. 1993. Solution structure of a DNA-binding domain from HMG1. *Nucleic Acids Res.* 21:3427-36.
- Rezniczek, G.A., C. Abrahamsberg, P. Fuchs, D. Spazierer, and G. Wiche. 2003. Plectin 5'-transcript diversity: Shot alternative sequences determine stability of gene products, initiation of translation and subcellular localization of isoforms. *Hum Mol Genet.* 12:3181-94.
- Ridley, A.J., and A. Hall. 1992. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell.* 70:389-99.
- Roberts, A.B., and M.B. Sporn. 1993. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Growth Factors.* 8:1-9.
- Roberts, A.B., M.B. Sporn, R.K. Assoian, J.M. Smith, N.S. Roche, L.M. Wakefield, U.I. Heine, L.A. Liotta, V. Falanga, J.H. Kehrl, and et al. 1986. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:4167-71.
- Rogers, S.L., G.C. Rogers, D.J. Sharp, and R.D. Vale. 2002. *Drosophila* EB1 is important for proper assembly, dynamics, and positioning of the mitotic spindle. *J Cell Biol.* 158:873-84.
- Roper, K., and N.H. Brown. 2004. A spectraplakin is enriched on the fusome and organizes microtubules during oocyte specification in *Drosophila*. *Curr Biol.* 14:99-110.
- Roper, K., and N.H. Brown. 2003. Maintaining epithelial integrity: a function for gigantic spectraplakin isoforms in adherens junctions. *J Cell Biol.* 162:1305-15.
- Roper, K., S.L. Gregory, and N.H. Brown. 2002. The 'spectraplakins': cytoskeletal giants with characteristics of both spectrin and plakin families. *J Cell Sci.* 115:4215-25.
- Rosenberg-Hasson, Y., M. Renert-Pasca, and T. Volk. 1996. A *Drosophila* dystrophin-related protein, MSP-300, is required for embryonic muscle morphogenesis. *Mech Dev.* 60:83-94.
- Ruhrberg, C., and F.M. Watt. 1997. The plakin family: versatile organizers of cytoskeletal architecture. *Curr Opin Genet Dev.* 7:392-7.

- Sambrook J et al. 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition)*, One Bungtown Road Cold Spring Harbor, NY 11724 516-367-8800
- Scheving, L.A., M.C. Stevenson, J.M. Taylormoore, P. Traxler, and W.E. Russell. 2002. Integral role of the EGF receptor in HGF-mediated hepatocyte proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 290:197-203.
- Schindler, M., J.F. Holland, and M. Hogan. 1985. Lateral diffusion in nuclear membranes. *J Cell Biol.* 100:1408-14.
- Schleiermacher, G., F. Bourdeaut, V. Combaret, G. Picron, V. Raynal, A. Aurias, A. Ribeiro, I. Janoueix-Lerosey, and O. Delattre. 2005. Stepwise occurrence of a complex unbalanced translocation in neuroblastoma leading to insertion of a telomere sequence and late chromosome 17q gain. *Oncogene.* 24:3377-84.
- Schneider, C., R.M. King, and L. Philipson. 1988. Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell.* 54:787-93.
- Schneider, M., A.A. Noegel, and I. Karakesisoglou. 2008. KASH-domain proteins and the cytoskeletal landscapes of the nuclear envelope. *Biochem Soc Trans.* 36:1368-72.
- Schultz, J., F. Milpetz, P. Bork, and C.P. Ponting. 1998. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:5857-64.
- Sigrist, C.J., L. Cerutti, N. Hulo, A. Gattiker, L. Falquet, M. Pagni, A. Bairoch, and P. Bucher. 2002. PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Brief Bioinform.* 3:265-74.
- Sjoblom, T., S. Jones, L.D. Wood, D.W. Parsons, J. Lin, T.D. Barber, D. Mandelker, R.J. Leary, J. Ptak, N. Silliman, S. Szabo, P. Buckhaults, C. Farrell, P. Meeh, S.D. Markowitz, J. Willis, D. Dawson, J.K. Willson, A.F. Gazdar, J. Hartigan, L. Wu, C. Liu, G. Parmigiani, B.H. Park, K.E. Bachman, N. Papadopoulos, B. Vogelstein, K.W. Kinzler, and V.E. Velculescu. 2006. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science.* 314:268-74.
- Sonnenberg, A., and R.K. Liem. 2007. Plakins in development and disease. *Exp Cell Res.* 313:2189-203.
- Spazierer, D., J. Raberger, K. Gross, P. Fuchs, and G. Wiche. 2008. Stress-induced recruitment of epiplakin to keratin networks increases their resistance to hyperphosphorylation-induced disruption. *J Cell Sci.* 121:825-33.
- Spector, I., N.R. Shochet, D. Blasberger, and Y. Kashman. 1989. Latrunculins--novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. *Cell Motil Cytoskeleton.* 13:127-44.
- Speicher, D.W., and V.T. Marchesi. 1984. Erythrocyte spectrin is comprised of many homologous triple helical segments. *Nature.* 311:177-80.
- Sridharan, D., M. Brown, W.C. Lambert, L.W. McMahon, and M.W. Lambert. 2003. Nonerythroid alphaII spectrin is required for recruitment of FANCA and XPF to nuclear foci induced by DNA interstrand cross-links. *J Cell Sci.* 116:823-35.
- Sridharan, D.M., L.W. McMahon, and M.W. Lambert. 2006. alphaII-Spectrin interacts with five groups of functionally important proteins in the nucleus. *Cell Biol Int.* 30:866-78.
- Stappenbeck, T.S., E.A. Bornslaeger, C.M. Corcoran, H.H. Luu, M.L. Virata, and K.J. Green. 1993. Functional analysis of desmoplakin domains: specification of the interaction with keratin versus vimentin intermediate filament networks. *J Cell Biol.* 123:691-705.
- Stappenbeck, T.S., J.A. Lamb, C.M. Corcoran, and K.J. Green. 1994. Phosphorylation of the desmoplakin COOH terminus negatively regulates its interaction with keratin intermediate filament networks. *J Biol Chem.* 269:29351-4.
- Starr, D.A. 2007. Communication between the cytoskeleton and the nuclear envelope to position the nucleus. *Mol Biosyst.* 3:583-9.
- Starr, D.A., and J.A. Fischer. 2005. KASH 'n Karry: the KASH domain family of cargo-specific cytoskeletal adaptor proteins. *Bioessays.* 27:1136-46.
- Stradal, T., W. Kranewitter, S.J. Winder, and M. Gimona. 1998. CH domains revisited. *FEBS Lett.* 431:134-7.
- Strumpf, D., and T. Volk. 1998. Kakapo, a novel cytoskeletal-associated protein is essential for the restricted localization of the neuregulin-like factor, vein, at the muscle-tendon junction site. *J Cell Biol.* 143:1259-70.

- Stuurman, N., S. Heins, and U. Aebi. 1998. Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J Struct Biol.* 122:42-66.
- Sun, D., C.L. Leung, and R.K. Liem. 2001. Characterization of the microtubule binding domain of microtubule actin crosslinking factor (MACF): identification of a novel group of microtubule associated proteins. *J Cell Sci.* 114:161-172.
- Sun, Y., J. Zhang, S.K. Kraeft, D. Auclair, M.S. Chang, Y. Liu, R. Sutherland, R. Salgia, J.D. Griffin, L.H. Ferland, and L.B. Chen. 1999. Molecular cloning and characterization of human trabeculin-alpha, a giant protein defining a new family of actin-binding proteins. *J Biol Chem.* 274:33522-30.
- Svitkina, T.M., A.B. Verkhovsky, and G.G. Borisy. 1996. Plectin sidearms mediate interaction of intermediate filaments with microtubules and other components of the cytoskeleton. *J Cell Biol.* 135:991-1007.
- Technau, M., and S. Roth. 2008. The *Drosophila* KASH domain proteins Msp-300 and Klarsicht and the SUN domain protein klaroid have no essential function during oogenesis. *Fly (Austin).* 2.
- Tomiya, T., I. Ogata, M. Yamaoka, M. Yanase, Y. Inoue, and K. Fujiwara. 2000. The mitogenic activity of hepatocyte growth factor on rat hepatocytes is dependent upon endogenous transforming growth factor-alpha. *Am J Pathol.* 157:1693-701.
- Trave, G., P.J. Lacombe, M. Pfuhl, M. Saraste, and A. Pastore. 1995. Molecular mechanism of the calcium-induced conformational change in the spectrin EF-hands. *Embo J.* 14:4922-31.
- Tzur, Y.B., K.L. Wilson, and Y. Gruenbaum. 2006. SUN-domain proteins: 'Velcro' that links the nucleoskeleton to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:782-8.
- Uitto, J., L. Pulkkinen, F.J. Smith, and W.H. McLean. 1996. Plectin and human genetic disorders of the skin and muscle. The paradigm of epidermolysis bullosa with muscular dystrophy. *Exp Dermatol.* 5:237-46.
- Uitto, J., L. Pulkkinen, F.J. Smith, and W.H. McLean. 1996. Plectin and human genetic disorders of the skin and muscle. The paradigm of epidermolysis bullosa with muscular dystrophy. *Exp Dermatol.* 5:237-46.
- van den Heuvel, A.P., A.M. de Vries-Smits, P.C. van Weeren, P.F. Dijkers, K.M. de Bruyn, J.A. Riedl, and B.M. Burgering. 2002. Binding of protein kinase B to the plakin family member periplakin. *J Cell Sci.* 115:3957-66.
- Van Horck, F.P., and C.E. Holt. 2008. A cytoskeletal platform for local translation in axons. *Sci Signal.* 1:pe11.
- Vaughan, A., M. Alvarez-Reyes, J.M. Bridger, J.L. Broers, F.C. Ramaekers, M. Wehnert, G.E. Morris, W.G.F. Whitfield, and C.J. Hutchison. 2001. Both emerin and lamin C depend on lamin A for localization at the nuclear envelope. *J Cell Sci.* 114:2577-90.
- Virata, M.L., R.M. Wagner, D.A. Parry, and K.J. Green. 1992. Molecular structure of the human desmoplakin I and II amino terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:544-8.
- Walsh, E.P., and N.H. Brown. 1998. A screen to identify *Drosophila* genes required for integrin-mediated adhesion. *Genetics.* 150:791-805.
- Warren, D.T., Q. Zhang, P.L. Weissberg, and C.M. Shanahan. 2005. Nesprins: intracellular scaffolds that maintain cell architecture and coordinate cell function? *Expert Rev Mol Med.* 7:1-15.
- Way, M., B. Pope, and A.G. Weeds. 1992. Evidence for functional homology in the F-actin binding domains of gelsolin and alpha-actinin: implications for the requirements of severing and capping. *J Cell Biol.* 119:835-42.
- Wenner, C.E., and S. Yan. 2003. Biphasic role of TGF-beta1 in signal transduction and crosstalk. *J Cell Physiol.* 196:42-50.
- Wiche, G. 1998. Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. *J Cell Sci.* 111 (Pt 17):2477-86.
- Wiche, G. 1989. Plectin: general overview and appraisal of its potential role as a subunit protein of the cytomatrix. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 24:41-67.

- Wilcox, C., J.S. Hu, and E.N. Olson. 1987. Acylation of proteins with myristic acid occurs cotranslationally. *Science*. 238:1275-8.
- Wilhelmsen, K., M. Ketema, H. Truong, and A. Sonnenberg. 2006. KASH-domain proteins in nuclear migration, anchorage and other processes. *J Cell Sci*. 119:5021-9.
- Wilhelmsen, K., S.H. Litjens, I. Kuikman, N. Tshimbalanga, H. Janssen, I. van den Bout, K. Raymond, and A. Sonnenberg. 2005. Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin. *J Cell Biol*. 171:799-810.
- Winder, S.J., L. Hemmings, S.K. Maciver, S.J. Bolton, J.M. Tinsley, K.E. Davies, D.R. Critchley, and J. Kendrick-Jones. 1995. Utrophin actin binding domain: analysis of actin binding and cellular targeting. *J Cell Sci*. 108 (Pt 1):63-71.
- Witke, W., A. Hofmann, B. Koppel, M. Schleicher, and A.A. Noegel. 1993. The Ca(2+)-binding domains in non-muscle type alpha-actinin: biochemical and genetic analysis. *J Cell Biol*. 121:599-606.
- Wu, X., A. Kodama, and E. Fuchs. 2008. ACF7 regulates cytoskeletal-focal adhesion dynamics and migration and has ATPase activity. *Cell*. 135:137-48.
- Xiong, H., F. Rivero, U. Euteneuer, S. Mondal, S. Mana-Capelli, D. Larochelle, A. Vogel, B. Gassen, and A.A. Noegel. 2008. Dictyostelium Sun-1 connects the centrosome to chromatin and ensures genome stability. *Traffic*. 9:708-24.
- Yang, Y., C. Bauer, G. Strasser, R. Wollman, J.P. Julien, and E. Fuchs. 1999. Integrators of the cytoskeleton that stabilize microtubules. *Cell*. 98:229-38.
- Young, K.G., and R. Kothary. 2008. Dystonin/Bpag1 is a necessary endoplasmic reticulum/nuclear envelope protein in sensory neurons. *Exp Cell Res*. 314:2750-61.
- Young, K.G., and R. Kothary. 2007. Dystonin/Bpag1--a link to what? *Cell Motil Cytoskeleton*. 64:897-905.
- Young, K.G., M. Pool, and R. Kothary. 2003. Bpag1 localization to actin filaments and to the nucleus is regulated by its N-terminus. *J Cell Sci*. 116:4543-55.
- Zaim, Hafida Analyse von Nesprin-2 defizienten Mäuse, 2006 Disertation Universität zu Köln
- Zhang, Q., C.D. Ragnauth, J.N. Skepper, N.F. Worth, D.T. Warren, R.G. Roberts, P.L. Weissberg, J.A. Ellis, and C.M. Shanahan. 2005. Nesprin-2 is a multi-isomeric protein that binds lamin and emerin at the nuclear envelope and forms a subcellular network in skeletal muscle. *J Cell Sci*. 118:673-87.
- Zhen, Y.Y., T. Libotte, M. Munck, A.A. Noegel, and E. Korenbaum. 2002. NUANCE, a giant protein connecting the nucleus and actin cytoskeleton. *J Cell Sci*. 115:3207-22.

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 Februar 2009

Teilpublikationen:

- 1) M. Schelhaas and S. Hoppe, **V. Jaeger**, T. Liebig, and D. Knebel-Moersdorf
Rac1/Cdc42 signalling interferes with herpes simplex virus type 1 infection into epithelial cells. *J Gen Virol*. 2006 Dec;87(Pt 12):3483-94
- 2) S. Kandert, Y. Lüke, T. Kleinhenz, S. Neumann, W. Lu, **V.M. Jaeger**, M. Munck, M. Wehnert, C.R. Müller, Z. Zhou, A.A. Noegel, M-C. Dabauvalle, and I. Karakesisoglou
Nesprin-2 giant safeguards nuclear envelope architecture in *LMNA* S143F progeria cells *Hum Mol Genet*. 2007 Dec 1;16(23):2944-59. Epub 2007 Sep 19.
- 3) I. Karakesisoglou and H. Zaim and Y. Lüke, **V.M. Jaeger**, L. Sellin, W. Lu, M. Schneider, V.C. Padmakumar, S. Neumann, A. Beijer, M. Munck, J. Gloy, G. Walz, A.A. Noegel
Nesprin-2 Giant / NUANCE maintains nuclear envelope architecture and composition in skin. *J Cell Sci*. 2008 Jun 1;121(Pt 11):1887-98. Epub 2008 May 13.
- 4) Lu W, Gotzmann J, Sironi L, **Jaeger V.M**, Schneider M, Lüke Y, Uhlén M, Szigyarto CA, Brachner A, Ellenberg J, Foisner R, Noegel AA, Karakesisoglou I.
Sun1 forms immobile macromolecular assemblies at the nuclear envelope. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Dec;1783(12):2415-26. Epub 2008 Sep 19.

Kongressbeiträge:

- 1) S. Hoppe, and **V. Jaeger**, M. Schelhaas, and D. Knebel-Moersdorf HSV-1 infection of epithelial cells: Role of Rac1, Cdc42 and VASP during entry pathway
(Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie 2006)
- 2) **V.M. Jaeger**, K. Young, R. Kothary, A.A. Noegel and I. Karakesisoglou MACF1 isoform-3 displays dual functions in the cytoplasm and the nucleus
(Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie 2007)
- 3) **V.M. Jaeger**, K. Young, R. Kothary, A.A. Noegel and I. Karakesisoglou MACF1 isoform-3 displays dual functions in the cytoplasm and the nucleus
(Jahrestagung der Amerikanischen Gesellschaft für Zellbiologie 2007)

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name Verena Maren Jaeger
Geburtsdatum 06. November 1979
Geburtsort Flensburg
Nationalität Deutsch

Schulische Ausbildung

1986 - 1990 Grundschole in Krefeld Fischen
1990 - 1999 Maria-Sybilla-Merian Gymnasium, Krefeld
Abschluss: Abitur

Studium

Okt. 1999 - Okt. 2004 Studiengang: Diplom Biologie
Studienschwerpunkt: Genetik, Biochemie, Pharmakologie
Universität zu Köln

Aug. 2005 Diplomarbeit am Max-Planck Institut für Neurologische Forschung, Köln,
Prof. Dr. D.Moersdorf

Seit Jan. 2006 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 The-
ma: „**Analyse der MACF1 Isoform-3 Funktionen, einem Spektrapla-
kin Protein mit dualen Rollen im Zytoplasma und dem Nukleus**“

Mai – Okt. 2008 Forschungsaufenthalt in Durham, Uk *School of Biomedical and Biologi-
cal Science*, Arbeitsgruppe Dr. I. Karakesisoglou

Danksagung

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

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

Besonderer Dank gilt meinem engagierten Betreuer Dr. I. (Akis) Karakesisoglou, der mich immer mit seinem herausragenden Wissen und Kollegialität unterstützt und mir mit Rat und Tat zur Seite stand.

Herzlichen Dank der Abteilung „Biochemie I“, die mir eine sehr schöne Zeit mit ihrer hilfsbereiten und humorvollen Arbeitsatmosphäre bereitet hat.

Besonders möchte ich mich bei meinen Kollegen Ria (Maria) Schneider, Yvonne Lüke, Wenshu Lu, Maria (Mary) Shina und Gerogia Vlahou für die tolle Zusammenarbeit und Unterstützung, auch außerhalb des Labors, bedanken. In diesem Zusammenhang möchte ich besonders Ria und Akis danken, die mir die Zeit in Durham, UK soviel Unterstützung entgegen gebracht haben und mir eine tolle Zeit auch außerhalb des Labors ermöglicht haben.

Ein liebevoller Dank an meine Eltern und Christoph, die mich in allen Lebenslagen vorbehaltlos unterstützen haben.

Wege entstehen dadurch,

daß man sie geht...

Franz Kafka