

Nesprine:
Makromolekulare Bindeglieder zwischen
Kernhülle und Zytoskelett

Inaugural-Dissertation

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



vorgelegt von

Maria Schneider

aus Kreuzau-Obermaubach

Köln 2009

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2005 bis Dezember 2008 unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. Angelika A. Noegel am Institut für Biochemie I der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln angefertigt.

Berichterstatter: Frau Prof. Dr. Angelika A. Noegel

Herr Prof. Dr. Siegfried Roth

Vorsitz: Herr Prof. Dr. Jürgen Dohmen

Tag der mündlichen Prüfung: 05.02.2009

DANKSAGUNG:

Frau Prof. Dr. Angelika A. Noegel danke ich für die Möglichkeit, an ihrem renommierten Institut meine Doktorarbeit anfertigen zu dürfen. Zudem bedanke ich mich ganz besonders für die kritische Durchsicht dieser Arbeit, ihre vielen Hilfestellungen und ihre Unterstützung in dieser Zeit.

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

Ganz besonders bedanke ich mich bei Herrn Dr. Iakowos Karakesisoglou für die Betreuung und kritischen Anmerkungen zu dieser Arbeit sowie die zahlreichen Vorschläge und Anregungen. Weiterhin möchte ich mich für seine ständige Diskussionsbereitschaft bei allen anfallenden Sorgen und Problemen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner gesamten Arbeitsgruppe, vor allem Verena, Yvonne, Wenshu, Sascha, Hafi und Martina für die vielen Hilfestellungen und die herzliche Zusammenarbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe von Franzisco Riviero bedanken, bei Jessi, Eva, Marion und Carola, vor allem aber bei Georgia, die mir in dieser Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ausdrücklich danke ich auch Berthold, Rosi, Mary, Dörthe, Maria, Anne, Tanja, Christoph, Raphael, Karl-Heinz, Christian, Charles, Surayya, Vivek, Rashmi, Budi, Rolf, Brigitte, Sonja, Bärbel, Grudun, Oli und Christina für die vielen praktischen Ratschläge, das nette Arbeitsklima und die tatkräftige Unterstützung.

An dieser Stelle sei allen anderen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für das Beantworten zahlreicher Fragen und das angenehme Arbeitsklima gedankt.

Ein sehr herzlicher Dank gilt Daniela Lowis für ihre Freundschaft und die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Der größte Dank gilt meinen Eltern und vor allem meiner Schwester, für ihre Unterstützung, das jederzeit „offene Ohr“ und die unermüdliche Geduld.

VIELEN DANK

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Die Kernhülle	1
1.2	Die Kernlamina	1
1.3	Integrale Proteine der inneren Kernmembran	2
1.3.1	SUN-Domänen Proteine	3
1.4	Integrale Proteine der äußeren Kernmembran	4
1.4.1	KASH-Domänen Proteine	4
1.4.2	Nesprine und ihre Isoformen	5
1.5	Das Zytoskelett	8
1.5.1	Das Mikrotubulizytoskelett	8
1.6	Motorproteine des Mikrotubuli-Zytoskeletts	9
1.6.1	Kinesin	9
1.6.2	Dynein und Dynactin	11
1.7	Das Zentrosom	13
1.8	Nukleäre Migration und Positionierung	16
1.9	Zielsetzung	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Material	18
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	18
2.1.2	Kits	18
2.1.3	Antikörper	18
2.1.4	Oligonukleotide	20
2.1.4.1	DNA-Oligonukleotide	20
2.1.4.2	RNA-Oligonukleotide	21
2.1.5	Vektoren	21
2.1.6	Plasmide	22
2.1.6.1	Plasmide für das Hefe-Zwei-Hybrid System	22
2.1.6.2	Plasmide für die Überexpression in Säugerzellen	23
2.1.6.3	Plasmide für die Bakterienexpression	25
2.2	Methoden	26
2.2.1	Hefe-Zwei-Hybrid System	26
2.2.2	shRNA knock down Strategie	26
2.2.3	Kultivierung und Transfektion von Säugerzellen	27
2.2.4	Fixierung und Permeabilisierung von Säugerzellen	27
2.2.5	Immunfluoreszenzmikroskopie	28
2.2.6	Mikroskopie	28
2.2.7	Proteinlysate aus Säugerzellen	28
2.2.8	Gewebelysate des murinen Gehirns	29
2.2.9	Induktion und Reinigung rekombinanter Proteine	29
2.2.10	GST-(Glutathion-S-Transferase) Bindungsanalyse	30
2.2.11	Immunpräzipitation	30
2.2.12	Färbung von Polyacrylamidgelen	31
2.2.12.1	Färbung mit Coomassie-Blau	31
2.2.12.2	Silberfärbung	31

2.2.13	Immunmarkierung und Detektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	31
2.2.14	Datenbearbeitung	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Identifizierung neuer Nesprin-2 assoziierender Proteine	33
3.1.1	KLC1, ein neuer Partner von Nesprin-2	35
3.1.1.1	Eingrenzung der Interaktionsdomänen in vivo	35
3.1.1.2	Einengung und Verifizierung der Bindungsdomänen in vitro	36
3.1.2	Ektopische Koexpression und Kolo-kalisation der KLC1 und Nesprin-2 SR Fusionsproteine in COS7-Zellen	38
3.1.3	Ektopische Expression von Nesprin-2 SR beeinflusst die Lokalisation von KLC1 TPR-Fusionsproteinen.....	40
3.1.4	KLC1 ein neues Kernhüllen-assoziiertes Protein.....	41
3.1.4.1	Ektopisch exprimiertes Nesprin-2 SR führt zu keiner Umverteilung des endogenen KLC1 entlang der Kernmembran	41
3.1.5	Nesprin-2 assoziiert via Kinesin 1 mit dem Mikrotubulizytoskelett.....	44
3.1.6	Mikrotubuli-unabhängige Verteilung des GFP-KLC1 entlang der Kernmembran.....	48
3.1.7	Nesprin-2 beeinflusst die Lokalisation und Expression von KLC1	49
3.1.7.1	Nesprin-KASH Proteine rekrutieren KLC1 an die Kernmembran	50
3.1.7.2	Nesprin-2 Giant Silencing in humanen Keratinozyten und murinen Fibroblasten beeinflusst die Lokalisation und Expression des KLC1.....	53
3.1.7.3	Lamin A/C abhängige Lokalisation des Nesprin-2 und KLC1 in humanen Keratinozyten-Zelllinien	56
3.1.8	Nesprin-2 sowie KLC1 abhängige Lokalisation der Mikrotubuli entlang der Kernhülle	57
3.1.9	Nesprin-2 und KLC1 akkumulieren am Zentrosom	59
3.1.9.1	KLC1 lokalisiert am Zentrosom	59
3.1.9.2	Kolo-kalisation von Nesprin-2 und KLC1 am MTOC	60
3.1.9.3	C-terminale Nesprin-2 Isoformen assoziieren mit dem Zentrosom.....	62
3.1.10	Akkumulation der SUN-Proteine am Zentrosom	64
3.1.11	Rootletin, eine Komponente des Zentrosoms, beeinflusst die Lokalisation von Nesprin-2 und KLC1	66
3.1.11.1	Ektopisch exprimiertes Rootletin rekrutiert KLC1, während die Verteilung des Nesprin-2 Giant unverändert bleibt	66
3.1.11.2	Umlagerung des KLC1 und der C-terminalen Nesprin-2 Isoformen entlang der überexprimierten Rootletinfilamente	67
3.1.11.3	Ektopisch exprimiertes Rootletin und Nesprin-2 überlagern partiell mit dem Mikrotubulizytoskelett.....	69
3.1.12	Nesprin-2 SR wird durch Komponenten des perizentriolären Materials rekrutiert	71
3.1.13	Nesprin-2 und KLC1 beeinflussen die Lage der Zentrosomen	71
3.1.13.1	Die Nesprin-2 SR Expression hebt die Verbindung zwischen Zentrosom und Kernmembran auf	72
3.1.13.2	KASH-Domänen haltige Nesprine verknüpfen das Zentrosom mit der Kernmembran.....	73

3.1.13.3	Nesprin-2 und KLC1 Silencing verändert die Zentrosomenlokalisation	75
3.1.14	KLC1 beeinflusst die Polarisation von HaCaT-Zellen	79
3.1.15	Die Effekte der dominant negativen Interferenz von KASH-Domänen umfassenden Nesprinen auf den TGF- β -Signalweg	80
3.1.16	Nesprine beeinflussen die zelluläre Verteilung von Mitochondrien.....	82
3.2	Identifizierung neuer Proteininteraktionen für Nesprin-1	84
3.2.1	p150 Glued, ein neuer Partner von Nesprin-1-165	84
3.2.2	Eingrenzung und Verifizierung der p150 Glued Bindungsdomäne	85
3.2.3	Kolokalisation des GFP-Nesprin-1-165 Fusionsproteins und p150 Glued in COS7-Zellen	86
4	Diskussion	88
4.1	KLC1 ein neuer Interaktionspartner von Nesprin-2.....	88
4.2	Nesprin-2 assoziiert mit dem Kinesin 1 Motorproteinkomplex an der äußeren Kernmembran	89
4.3	Nesprin-2 und KLC1 verankern das Zentrosom an der Kernmembran	92
4.3.1	Zentrosomale Positionierung.....	96
4.3.2	Zentrosomale Kohäsion	97
4.4	Nesprin-2 und KLC1 bestimmen die Zellpolarität.....	97
4.5	Weitere Funktionen der Nesprine.....	98
4.5.1	Nesprine kontrollieren die TGF- β Signaltransduktion	98
4.5.2	KASH-Domänen Proteine beeinflussen die mitochondriale Positionierung.....	99
4.6	Neue Mechanismen in der Pathologie von Laminopathien.....	101
4.7	Dynactin (p150 Glued) ein neuer Interaktionspartner für Nesprin-1	103
5	Zusammenfassung.....	105
6	Abstract.....	107
7	Literatur	108
8	Anhang	122
8.1	Abkürzungsverzeichnis	122
8.2	Abbildungsverzeichnis.....	124
8.3	Tabellenverzeichnis.....	126
	Erklärung.....	127
	Lebenslauf.....	128

1 Einleitung

1.1 Die Kernhülle

Der Zellkern, das größte Organell der eukaryotischen Zelle, umfasst ca. 10 % des gesamten Zellvolumens. Das im Zellkern eingelagerte Chromatin wird von zwei konzentrischen Membranen, der inneren und äußeren Kernmembran, die sich an den Kernporenkomplexen vereinen, umschlossen. Innere und äußere Zellkernmembran bilden zusammen mit der darunter positionierten nukleären Lamina die Kernhülle (Gerace und Burke, 1988; Stuurman et al., 1998; Gruenbaum et al., 2005). Die Kernlamina, ein dicht verzweigtes Netzwerk aus den Intermediärfilamentproteinen Lamin A/C und B sowie Lamin assoziierenden Proteinen, wird über integrale Membranproteine mit der inneren Kernmembran verknüpft und verleiht der Kernhülle mechanische Stabilität (Newport et al., 1990; Stuurman et al., 1998). Die äußere Kernmembran geht in das mit Ribosomen besetzte, raue endoplasmatische Retikulum (ER) über (Schindler et al., 1985). Als ein besonderes Merkmal der eukaryotischen Zelle separiert somit die Kernhülle die nukleoplasmatischen und zytoplasmatischen Kompartimente. Obwohl die Kernhülle eine selektive subzelluläre Barriere darstellt, ist sie dennoch mit den verschiedenen nukleo- sowie zytoplasmatischen Bestandteilen verknüpft und demzufolge in die zelluläre Gesamtheit eingebunden. Allerdings bleibt die Zellkernhülle, vor allem aber die äußere Kernmembran, eine der bis jetzt am wenigsten charakterisierten subzellulären Strukturen.

1.2 Die Kernlamina

Die Kernlamina besteht aus einem Geflecht von Typ V Intermediärfilamenten, den Laminen, die jeweils ein Molekulargewicht von 60 bis 80 kDa aufweisen. Lamine weisen eine dreigeteilte Domänen Organisation auf, die für alle Intermediärfilamente charakteristisch ist. Eine zentrale α -helikale Stabdomäne, die „Coiled coil“ Strukturen ausbilden kann, wird von einer kurzen globulären aminoterminalen Kopf- sowie einer großen carboxylterminalen Schwanzdomäne flankiert. Lamin Proteine formen durch eine parallele, nicht versetzte Anlagerung zweier α -helikaler Stabdomänen „Coiled coil“ Strukturen, so dass ein Homodimer entsteht. Demzufolge beginnt die Zusammenlagerung der Lamine mit der Formation von Dimeren. In einem zweiten Schritt entstehen aus den Homodimeren durch eine antiparallele „head-to-tail“-Anlagerung apolare

Protofilamente, die sich aufgrund von lateraler Aggregation zu dicken Filament Bündeln und somit zu einer parakristallinen Matrix formen (Herrmann und Aebi, 2004). Lamine werden basierend auf ihrer Domänenstruktur in A-Typ und B-Typ Lamine klassifiziert. A-Typ Lamine (Lamin A, Lam A Δ 10, Lamin C und C2) repräsentieren alternative Spleiß-Produkte des *LMNA* Gens (Chromosom 1q21.1-21.3). B-Typ Lamine werden in Vertebraten hingegen von zwei unterschiedlichen Genen synthetisiert. Das *LMNB1* Gen (Chromosom 5q23.3-31.1) kodiert für das Lamin B1 (Lin und Worman, 1995), Lamin B2 und B3 sind alternative Spleiß-Varianten des *LMNB2* Gens (Chromosom 19p13.3) (Biamonti et al., 1992; Furukawa und Hotta, 1993). Während Lamin A/C nur in differenzierten Zellen exprimiert wird (Röber et al., 1989; Machiels et al., 1996; Goldman et al., 2002), lassen sich die B-Typ Lamine sowohl in embryonalen als auch in differenzierten Zellen nachweisen. Die Lamin B Proteine sind fest mit der Kernmembran verknüpft und ihre Expression ist essentiell für die strukturelle Integrität des Zellkerns und somit von entscheidender Bedeutung für das Überleben sowie die Entwicklung der Zelle (Lenz-Böhme et al., 1997; Liu et al., 2000; Harborth et al., 2001; Vergnes et al., 2004).

Die nukleäre Lamina repräsentiert in Metazoen eine elementare Kernhüllen-spezifische Komponente (Harborth et al., 2001), die nicht nur zur mechanischen Stabilität des Zellkerns beiträgt, sondern auch für die Verankerung der Kernporenkomplexe, die Organisation und Strukturierung des Chromatins, die DNA Replikation und Transkription sowie die Zelldifferenzierung als auch für die Apoptose von Bedeutung ist (Moir et al., 2000; Zastrow et al., 2004; Broers et al., 2006; Gruenbaum et al., 2003; Mattout et al., 2006). Die Wichtigkeit der Kernlamina konnte in genetischen Studien und RNAi Analysen durch eine gezielte Störung der Lamine hervorgehoben werden. Zusätzlich führen eine Vielzahl von unterschiedlichen Mutationen im *LMNA* Gen zu multilateralen Erberkrankungen, den sogenannten Laminopathien (Broers et al., 2006; Gruenbaum et al., 2003; Mattout et al., 2006).

1.3 Integrale Proteine der inneren Kernmembran

Integrale Proteine der inneren Kernmembran werden an den Ribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums (ER) synthetisiert und erreichen durch laterale Diffusion entlang der ER- bzw. Kernhüllen-Membran ihre nukleäre Lokalisation. Aufgrund von Assoziationen mit nukleären Liganden wie z.B. den Laminen und dem Chromatin werden diese Proteine an der inneren Kernmembran verankert und tragen wesentlich zur Organisation, Struktur und somit zur Funktion der Kernhülle, Kernmatrix und des

Chromatins bei (Holmer und Worman, 2001). Zu den detailliert analysierten integralen Membranproteinen gehören der Lamin B Rezeptor (LBR), die Lamin-assoziierten Proteine 1 und 2 (LAP1 und LAP2), Emerin sowie MAN1 (Holmer und Worman, 2001).

Neben diesen integralen Proteinen der inneren Kernmembran konnten auch Nurim, LUMA, SUN- sowie spezifische KASH-Domänen Proteine als Komponenten der inneren Kernhülle bestimmt werden (Rolls et al., 1999; Bengtsson und Otto, 2008; Hagan et al., 1995; Malone et al., 1999; Dreger et al., 2001; Hodzic et al., 2004; Mislow et al., 2002; Libotte et al., 2005). Durch eine multifunktionale Protein-Identifikations-Technologie (MudPIT; Washburn et al., 2001; Wolters et al., 2001) konnten Schirmer et al. (2003) mittels des Subtraktiv-Verfahrens insgesamt 67 weitere potentielle Proteine der inneren Kernmembran isolieren und teilweise charakterisieren.

1.3.1 SUN-Domänen Proteine

UNC- („uncoordinated“) 84, ein Protein der inneren Kernmembran, das für die nukleäre Migration und Verankerung während der Entwicklung von *C. elegans* erforderlich ist, besitzt mehrere putative Transmembrandomänen, die dieses Protein in der inneren Kernmembran verankern. Der carboxylterminale Bereich (~120 Aminosäuren) des UNC-84 weist eine signifikante Homologie zu einer Region des in *S. pombe* identifizierten Spindelpolkörper Proteins Sad1 auf (Malone et al., 1999). Orthologe in höheren Eukaryoten, die diesen evolutionär konservierten Bereich besitzen, werden als SUN- (Sad1-, UNC-84) Domänen Proteine bezeichnet (Malone et al., 2003). Neben UNC-84 und Sad1 konnten bis jetzt Mps3 in *S. cerevisiae*, Dd-SUN1 in *D. discoideum*, matefin in *C. elegans*, Giacomo und Klaroid in *D. melanogaster* sowie das humane SUN1, SUN2, SUN3 und SPAG4 (SUN4) als SUN-Domänen Proteine charakterisiert werden (Jaspersen et al., 2006; Xiong et al., 2008; Fridkin et al., 2004; Dreger et al., 2001; Hodzic et al., 2004; Crisp et al., 2006; Kennedy et al., 2004; Kracklauer et al., 2007; Technau und Roth, 2008). In Metazoen weisen fast alle SUN-Proteine in indirekten Immunfluoreszenzanalysen eine Überlagerung mit der Kernlamina auf (Padmakumar et al., 2005; Lee et al., 2002; Fridkin et al., 2004; Hodzic et al., 2004). Ausnahmen sind die nur wenig erforschten SUN3 und SPAG4, die als einzige SUN-Proteine an der ER- und äußeren Kernmembran lokalisieren (Crisp et al., 2006). Einige der SUN-Proteine assoziieren direkt mit der nukleären Lamina in vitro wie z.B. das humane SUN1 und SUN2 (Haque et al., 2006; Crisp et al., 2006), wohingegen für andere SUN-Domänen Proteine wie das UNC-84 keine Bindung nachgewiesen werden konnte (Lee et al., 2002).

Nahezu alle SUN-Domänen Proteine weisen mindestens ein bis drei Transmembrandomänen auf, während andere mit bis zu neun hydrophoben Regionen die innere Kernmembran durchdringen (Tzur et al., 2006). Zwischen den Transmembrandomänen und der C-terminalen SUN-Domäne ist eine „Coiled coil“ Domäne lokalisiert, die zudem eine Dimerisierung bzw. Oligomerisierung der humanen SUN1 und SUN2 Proteine vermittelt (s. Abb. 1.4.2; Lu et al., 2008). Die hoch konservierte SUN-Domäne assoziiert mit KASH-Domänen im perinukleären Raum (PNS; „perinuclear space“) und verankert demzufolge die ins Zytoplasma ragenden KASH-Proteine an der äußeren Kernmembran (s. Abb. 1.4.1; Abb. 1.4.2; Padmakumar et al., 2005; Malone et al., 2003). Somit repräsentieren die SUN-Proteine einen Kernhüllen-spezifischen Linker, der das Nukleoplasma indirekt mit dem Zytoplasma verknüpft (Tzur et al., 2006; Worman und Gundersen, 2006).

1.4 Integrale Proteine der äußeren Kernmembran

1.4.1 KASH-Domänen Proteine

Die äußere Kernmembran ist der inneren Kernmembran in Bezug auf die hydrophile und hydrophobe Lipid-Zusammensetzung sehr ähnlich (Schindler et al., 1985). Jedoch unterscheiden sich die Kernmembranen in ihren biochemischen Eigenschaften und in ihrer Funktion. Eine neue Proteinfamilie, die als KASH-Domänen Proteine bezeichnet werden, sind primär an der äußeren Kernmembran lokalisiert und verknüpfen den Kern mit den verschiedenen Elementen des Zytoskeletts (s. Abb. 1.4.1). Die bislang beschriebenen KASH-Domänen Proteine besitzen eine hochkonservierte carboxylterminale Region, die Klarsicht/ANC-1/Syne-1 Homologie (KASH)-Domäne, die eine einzelne Transmembrandomäne und eine evolutionär konservierte perinukleäre Sequenz (9-32 Aminosäuren) umfasst. Während die KASH-Domäne für die Kernhüllen-spezifische Verankerung dieser Proteine erforderlich ist, vermittelt der in seiner Domänenstruktur variable N-Terminus die Assoziation mit den unterschiedlichen Zytoskelettkomponenten (Starr und Fischer, 2005).

ANC-1 in *C. elegans* (Hedgecock und Thomson, 1982; Starr und Han, 2002), MSP-300 in *D. melanogaster* (Rosenberg-Hasson et al., 1996; Volk, 1992; Zhang et al., 2002) sowie das in höheren Vertebraten identifizierte Nesprin-1 und 2 (Apel et al., 2000; Padmakumar et al., 2004; Zhang et al., 2001; Zhen et al., 2002) repräsentieren die mit dem Aktinzytoskelett interagierenden KASH-Domänen Proteine, während Kms1 in *S. pombe* (Shimanuki et al., 1997), ZYG-12 (Malone et al., 2003) sowie UNC-83 in *C.*

elegans (Malone et al., 1999; Reinsch und Gönczy, 1998) und Klarsicht in *D. melanogaster* (Patterson et al., 2004) den Zellkern indirekt über Dynein mit den Mikrotubuli bzw. dem Zentrosom verknüpfen. Das in Vertebraten beschriebene Nesprin-3 ermöglicht hingegen über Plectin eine Bindung der Intermediärfilamente an die Kernhülle (Wilhelmsen et al., 2005).

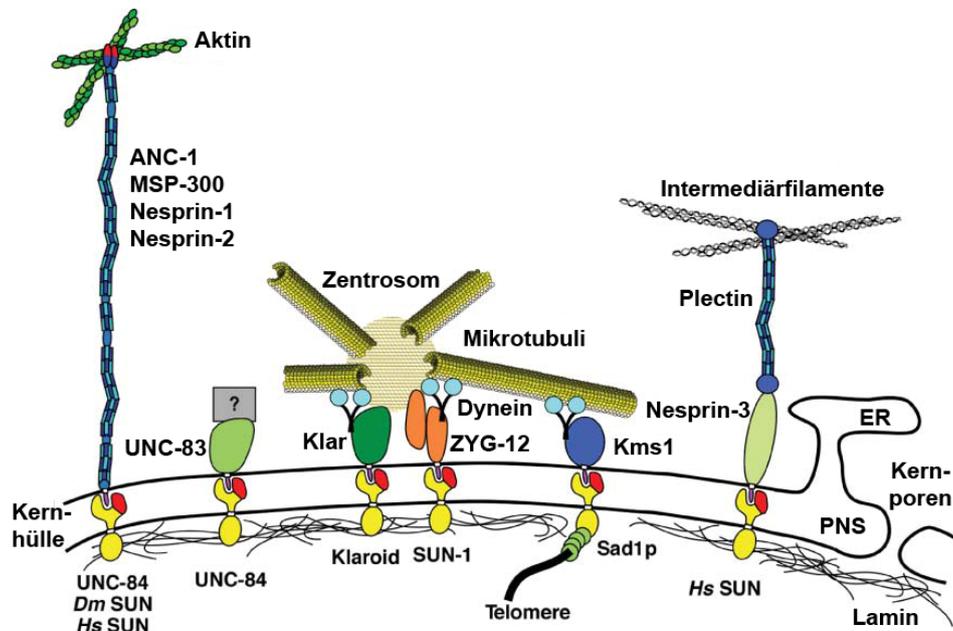


Abb. 1.4.1: KASH-Domänen Proteine verknüpfen das Zytoskelett mit der Kernhülle. Das Modell illustriert verschiedene KASH/SUN-Interaktionen unterschiedlicher Organismen sowie deren Verknüpfung mit dem Zytoskelett. Proteine, die eine SUN-Domäne (rot) umfassen, lokalisieren an der inneren Kernmembran, während Proteine mit einer KASH-Domäne (violett) an der äußeren Membran der Kernhülle positioniert sind (adaptiert und modifiziert nach Starr, 2007).

1.4.2 Nesprine und ihre Isoformen

Nesprine („nuclear envelope spectrin repeat containing protein“), die auch als Syne, Myne, NUANCE sowie Enaptin bezeichnet werden, gehören zur Familie der Spektrine. Die größten Nesprin Isoformen sowie deren orthologe Proteine ANC-1 und MSP-300 sind multifunktionale Aktin-bindende Proteine des α -Aktinin-Typs (Hedgecock und Thomson, 1982; Starr und Han, 2002; Rosenberg-Hasson et al., 1996; Volk, 1992; Zhang et al., 2002; Zhen, 2001; Braune, 2001). Sie sind aus einer N-terminalen, Aktin-bindenden Domäne (ABD), einer langen Stabdomäne mit einer Vielzahl von Tripelhelikalen Spektrindomänen und der C-terminalen KASH-Domäne aufgebaut. Die ABD der Nesprine, die mit filamentärem Aktin assoziiert, besteht aus zwei Calponin-Homologie (CH) Domänen, die durch eine 30 Aminosäuren lange Serin-reiche Linkerregion separiert werden. Aufgrund dieses Linkers, dessen funktionelle Bedeutung noch nicht erforscht ist, unterscheiden sich die Nesprine (mit Ausnahme des Proteins

Calmin) von den herkömmlichen Aktin-bindenden Proteinen des α -Aktinin Typs (Zhen et al., 2002; Zhang et al., 2002; Padmakumar et al., 2004; Libotte et al., 2005). Die großen Nesprin Isoformen Nesprin-1 sowie Nesprin-2 Giant umfassen 47 bis 56 Spektrindomänen, wobei diese Domänen den Nesprinen eine hochgradige Flexibilität verschaffen. Diese Domänen agieren möglicherweise als eine Plattform für viele Bindepartner und könnten so für eine Vielzahl von zellulären Prozessen oder die subzelluläre Strukturierung von Bedeutung sein (De Matteis und Morrow, 2000; Zhang et al., 2001; Warren et al., 2005; Simpson und Roberts, 2008). Zusätzlich existieren Hinweise, dass Nesprine aufgrund ihrer Spektrindomänen dimerisieren (Mislow et al., 2002).

Das humane Gen für Nesprin-1 lokalisiert auf dem Chromosom 6q25, das für Nesprin-2 auf dem Chromosom 14q22.1-23.3. Diese Gene sind sehr komplex und kodieren für mehrere Isoformen, die sich in ihrer Länge, Domänenstruktur und ihrer subzellulären Lokalisation unterscheiden (Zhen et al., 2002; Padmakumar et al., 2004; Zhang et al., 2001 und 2002). Bislang sind für Nesprin-1 und Nesprin-2 jeweils acht verschiedene Isoformen bekannt.

Die größte Nesprin-1 Spleiß-Variante (Nesprin-1 Giant; Enaptin) enthält 8.749 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 1.014 kDa (Padmakumar et al., 2004), während das Nesprin-2 Giant (NUANCE) mit 6.883 Aminosäuren, ein 796 kDa Protein repräsentiert (Zhen et al., 2002). Für Nesprin-1 konnten zudem sechs carboxyterminale Isoformen (Nesprin-1 α_1 , Nesprin-1 α_2 , Nesprin-1 β_1 , Nesprin-1 β_2 und Nesprin-1 γ), die die KASH-Domäne besitzen, sowie zwei aminoternale Spleiß-Produkte (CPG2 und Enaptin-165 (Nesprin-1-165)) identifiziert werden. Neben Nesprin-2 Giant sind fünf KASH-umfassende Isoformen (Nesprin-2 α_1 , Nesprin-2 α_2 , Nesprin-2 β_1 , Nesprin-2 β_2 und Nesprin-2 γ) als auch Nesprin-2 $\alpha_2\Delta$ TM und Nesprin-2 Δ TM1, denen die Transmembrandomäne fehlt, bekannt (Zhang et al., 2001, 2002 und 2005; Zhen et al., 2002; Padmakumar et al., 2004; Cottrell et al., 2004; Warren et al., 2005). Aufgrund ihrer hohen Diversität und Gewebespezifität konnten Nesprine neben ihrer primären Lokalisierung an der Kernmembran auch an den Aktin-Stressfasern, den Lamellipodien und Filopodien, der Plasmamembran, dem Golgi-Apparat, den Muskel-Sakromeren, den Mitochondrien sowie auch im Nukleoplasma nachgewiesen werden (Padmakumar et al., 2004; Zhen et al., 2002; Zhang et al., 2002 und 2005; Apel et al., 2000).

Die Kernhüllen-spezifische Lokalisation des Nesprin-1 und Nesprin-2 ist jedoch nicht alleine auf die äußere Kernmembran begrenzt. Mislow et al. (2002) wie auch Libotte et al. (2005) zeigten, dass Nesprine an der inneren Kernmembran direkt mit Emerin und

Lamin A/C assoziieren können, wobei die Lokalisierung der Nesprine von den A-Typ Laminen abhängig ist (Muchir et al., 2003; Libotte et al., 2005).

Nesprin-3 und Nesprin-4 wurden erst kürzlich beschrieben. Für Nesprin-3 sind 2 Spleiß-Varianten bekannt, Nesprin-3 α (~108 kDa) und Nesprin-3 β (~99 kDa), die über eine C-terminale KASH-Domäne in der äußeren Kernmembran verankert sind. Wegen der fehlenden N-terminalen ABD kann Nesprin-3 im Gegensatz zu Nesprin-1 und Nesprin-2 keine direkte Assoziation mit F-Aktin eingehen. Nesprin-3 α bindet stattdessen an die ABD (des α -Aktinin Typs) von Plectin, einem Mitglied der Plakin-Familie, das neben F-Aktin auch mit Intermediärfilamenten (IFs) interagieren kann (Wilhelmsen et al., 2005). Ketema et al. (2007) zeigten zusätzlich, dass sowohl Nesprin-3 α als auch Plectin Dimere bilden (s. Abb. 1.4.2). Nesprin-4 ist ein Epithel-spezifisches KASH-Domänen Protein, dessen subzelluläre Bindepartner und Funktion bislang noch unerforscht sind (Crisp und Burke, 2008).

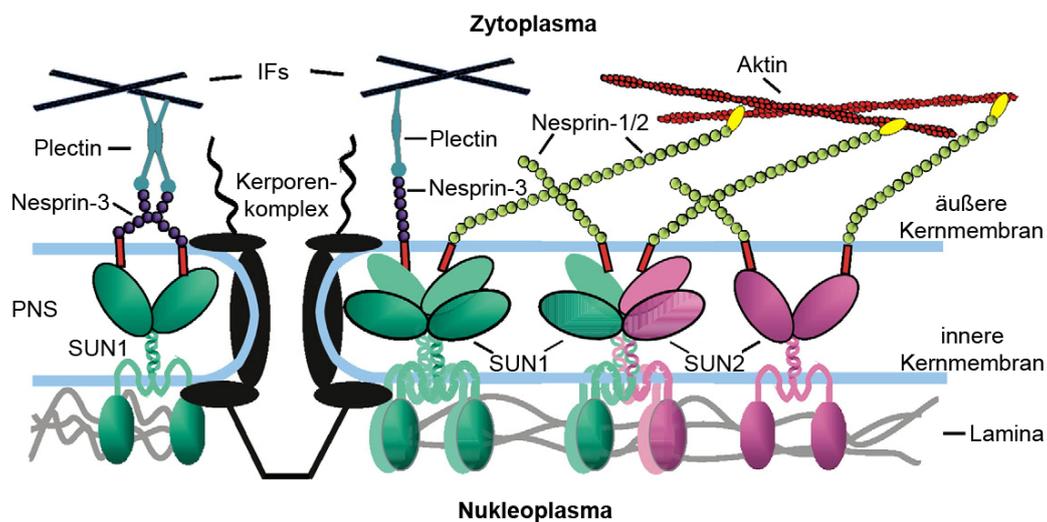


Abb. 1.4.2: Die Oligomerisierung von SUN-Domänen sowie Nesprin Proteinen ermöglicht die Bildung von höher geordneten und multifunktionalen Komplexen an der äußeren Kernmembran (bearbeitet nach Lu et al., 2008).

1.5 Das Zytoskelett

Das Zytoskelett ist ein hoch dynamisches Filamentsystem, das sich in drei Proteintypen gliedert. Es wird zwischen Intermediärfilamenten, Aktinfilamenten und Mikrotubuli unterschieden. Diese Proteine erlauben mittels Polymerisation der Proteinuntereinheiten die Bildung dünner Filamente. Jeder Filamenttyp hat charakteristische mechanische Eigenschaften und zusammen bilden sie ein komplexes Netzwerk in der Zelle (Lodish et al., 1999). Die Intermediärfilamente tragen bedeutend zur zytoplasmatischen Organisation, Strukturierung und mechanischen Festigkeit der Zelle bei (Herrmann und Aebi, 1998). Während das Aktinzytoskelett aufgrund seiner hohen Flexibilität und Formenvielfalt neben der Zytokinese (Fishkind und Wang, 1995) und dem Myosin abhängigen vesikulären Transport (Langford, 1995) primär die Fortbewegung der Zelle (die Motilität), die Kontraktion sowie die Formgebung der Zelloberfläche kontrolliert.

1.5.1 Das Mikrotubulizytoskelett

Mikrotubuli (MT), die sich durch longitudinale sowie laterale Anlagerung von 13 Protofilamenten zu einer hohlzylindrischen Konstruktion organisieren, verkörpern mit einem Durchmesser von 25 nm, die voluminösesten Filamente des Zytoskeletts (Nogales et al., 1999; Downing, 2000; Oakley, 2000). Jedes Protofilament wird wiederum durch die Polymerisation von α - und β -Tubulin Heterodimeren gebildet. Die α - und β -Tubulin Monomere repräsentieren hoch konservierte globuläre Proteine von 55 kDa (Murphy, 1991), die jeweils ein Molekül GTP binden können. Das an α -Tubulin irreversibel gebundene GTP ist nicht hydrolysierbar, während das mit β -Tubulin assoziierte GTP durch Hydrolyse zu GDP die Polymerisation der Dimere erlaubt. Demzufolge orientieren sich die β -Tubuline ausschließlich in Richtung der Polymerisationsfront, zum Plus-Ende des Mikrotubulus, während sich die α -Tubuline zum Minus-Ende der polaren Strukturen anordnen. In vitro und in vivo weisen die Mikrotubuli eine hohe Dynamik auf, die sich durch einen stetigen Auf- und Abbau des Filamentsystems bemerkbar macht (Desai und Mitchison, 1997). Diese dynamische Instabilität wird beim Eintritt der Zellteilung ersichtlich, da die Interphasemikrotubuli vollständig depolymerisieren und sich zur Ausbildung der Mitosespindeln neu formieren. In der Interphase sind die Minus-Enden der Mikrotubuli am perinukleären Mikrotubuliorganisierenden Zentrum (MTOC), dem Zentrosom, gebündelt, während sich die Plus-Enden sternförmig in Richtung Zellperipherie erstrecken (Lodish et al., 1999). Die dadurch definierte Zellpolarität ist essentiell für den Transport sowie die Positionierung von Zellorganellen und Proteinen. Neben α - und β -Tubulinen konnten zudem weitere

Mitglieder der Tubulin-Familie identifiziert werden. Während die grundlegende Rolle des γ -Tubulin bei der Initiation bzw. der Anlagerung von α - und β -Tubulin am Zentrosom unumstritten ist (Moritz et al., 2000), sind die Funktionen des δ -, ϵ -, ζ - und η -Tubulin noch weitgehend ungeklärt (Schiebel, 2000; Dutcher, 2001).

Bislang konnte eine Vielzahl von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) identifiziert werden, die für die Bildung und Aufrechterhaltung der Mikrotubuli, für die Positionierung der Zellorganellen sowie für den intrazellulären Transport von großer Bedeutung sind. Hierbei werden zwei Hauptgruppen von MAPs unterschieden. Die strukturellen MAPs, wie z.B. MAP1, MAP2 und Tau, die zur Polymerisation als auch zur Bündelung bzw. Stabilisierung der Mikrotubuli beitragen (Garcia und Cleveland, 2001) sowie die zytoplasmatischen Linkerproteine (CLIPs) wie z.B. CLIP-170, die als stabile Bindeglieder zwischen den Organellen und Mikrotubuli fungieren (Pierre et al., 1992; Rickard und Kreis, 1996). Neben den strukturellen MAPs, die sich wesentlich an der dreidimensionalen Organisation des Zytoskeletts beteiligen, existieren zusätzlich die dynamischen MAPs, die die Motorproteine umfassen (Mandelkow und Mandelkow, 1995; Hirokawa, 1998; Vallee und Shpetner, 1990).

1.6 Motorproteine des Mikrotubuli-Zytoskeletts

Kinesine und Dynein sind Mikrotubuli-assoziierte Motorproteine, die die aus wiederholten Zyklen der ATP-Hydrolyse gewonnene Energie nutzen, um im Zytoplasma auf den Mikrotubuli entlang zu gleiten. In der Zelle besitzen sie zwei sehr bedeutende Funktionen. Zum einen sind sie für den anterograden und retrograden zytoplasmatischen Transport von Vesikeln (z.B. Golgi-Vesikel), membranumschlossenen Organellen (Lysosomen, Peroxisomen, Mitochondrien), zytoplasmatischen Komponenten (z.B. Proteine, mRNAs) und membrangebundenen Komplexen verantwortlich. Andererseits können diese Proteine das komplexe Mikrotubulinetzwerk organisieren, um eine zytoplasmatische Strukturierung und subzelluläre Beweglichkeit in allen Phasen des Zellzyklus zu gewährleisten (Mandelkow und Mandelkow, 2002; Hirokawa, 1998; Schroer, 2004; Zhu et al., 2005).

1.6.1 Kinesin

Bislang konnten 45 humane Kinesine nachgewiesen werden, die sich in 14 Kinesin-Familien differenzieren (Lawrence et al., 2004; Miki et al., 2001). Das konventionelle Kinesin (Kinesin 1) besitzt eine molekulare Masse von 360 kDa. Es setzt sich aus zwei schweren und zwei leichten Ketten (110 kDa und 60/70 kDa) zusammen (s. Abb. 1.6.1).

Die schweren Ketten des Kinesin 1 (KHC; „kinesin heavy chain“) assoziieren aufgrund von „Coiled coil“ Domänen, die sich zu einem langen Stiel formieren, der am N-Terminus des Proteins einen Kopf mit zwei globulären Motordomänen trägt. Diese Motordomänen bewegen sich Schritt für Schritt („hand-over-hand“) entlang der Mikrotubuli, indem sie nacheinander eine Domäne vor die andere setzen (Howard, 1996; Schief und Howard, 2001; Yildiz et al., 2004). Durch dieses Fortbewegungsmuster wandert das Kinesin 1 zum Plus-Ende des Mikrotubulus, d.h. in Richtung der Zellperipherie. Jede schwere Kette ermöglicht am C-Terminus die Bindung einer leichten Kette (KLC; „kinesin light chain“), die die Assoziation zu den zu transportierenden Zellbestandteilen vermittelt (Mandelkow und Mandelkow, 2002). In Vertebraten wurden jeweils drei verschiedene KHC- (KIF „kinesin family member“ 5A, B und C) sowie KLC- (KLC1, 2 und 3) Gene gefunden. KIF5B, KLC1 und KLC2 werden ubiquitär exprimiert, wohingegen KIF5A sowie KIF5C primär im neuronalen Gewebe nachgewiesen werden konnten (Miki et al., 2001; Vale, 2003). KLC3 weist eine Testis-spezifische Expression auf (Junco et al., 2001).

Sequenzanalysen der leichten Kette des Kinesins zeigen sowohl mehrere hoch konservierte als auch divergente Motive unter den Mitgliedern der KLC-Familie. Die N- sowie C-terminalen Regionen des KLC sind variabel, während der dazwischen liegende Bereich eine hoch konservierte „Coiled coil“ Domäne und TPR- („tetratricopeptid repeat“) Region aufweist. Die α -helikale „Coiled coil“ Domäne, die auch als HR- („heptade repeat“) Region bezeichnet wird, ermöglicht die Assoziation zu den schweren Ketten des Kinesin (Fan und Amos, 1994; Diefenbach et al., 1998). Die höchst konservierte TPR-Region besteht aus sechs hintereinander angeordneten TPR-Wiederholungen (Gindhart und Goldstein, 1996). Dieses Motiv moduliert amphipathische α -Helices, die eine Vielzahl von Protein-Protein-Interaktionen vermitteln (Lamb et al., 1995). Aufgrund der TPR-Domänen kann KLC Membran-umschlossene Organellen bzw. Proteine binden und mittels der schweren Ketten entlang den Polymerschienen der Mikrotubuli transportieren (Yu et al., 1992; Stenoi und Brady, 1997). Dabei sind die verschiedenen Spleiß-Varianten des KLC vermutlich für die Bindungen zu den unterschiedlichen molekularen Cargos wie z.B. dem Golgi-Apparat und den Mitochondrien verantwortlich (Gyoeva et al., 2000; Khodjakov et al., 1998). Neben dem Transport von Membran-umschlossenen Organellen ist Kinesin 1 zusätzlich in bedeutende Signalwege involviert. So ist es z.B. für den Transport der regulatorischen Smad-Proteine im TGF- β -Signalweg verantwortlich (Batut et al., 2007). Vor kurzem zeigten mehrere Gruppen, dass Kinesin 1 in einem aktiven sowie nicht aktiven Konformationszustand vorliegen kann (Woźniak und Allan,

2006, Blasius et al., 2007 und Cai et al., 2007). Kinesin 1 besitzt nur eine aktive Konformation, wenn die KHC über die KLC mit dem Cargo assoziieren. Fehlt einer dieser Bestandteile, so faltet sich der Motorkomplex zusammen und blockiert die für die Fortbewegung benötigte ATP-Bindungsstelle (Coy et al., 1999).

Neben dem konventionellen Kinesin sind eine Vielzahl von weiteren Kinesin-Familien bekannt, die von der Domänen- sowie Proteinstruktur des Kinesin 1 abweichen. Als Beispiel sei das heterotrimere Kinesin 2 erwähnt, das wie auch das Eg5 (Kinesin 5) in die Zytokinese involviert ist (Haraguchi et al., 2006; Fan und Beck, 2004; Kwok et al., 2004)

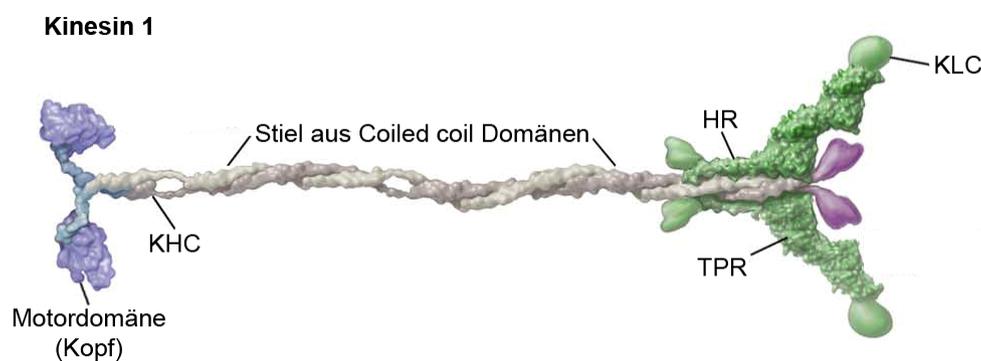


Abb. 1.6.1: Domänenarchitektur des konventionellen Kinesin (Kinesin 1) Motorkomplexes. Die schweren Ketten des Kinesin 1 (KHC) formen einen langen Stiel aus „Coiled coil“ Domänen, der am N-Terminus zwei globuläre, MT-assoziierende Motordomänen trägt. Der C-Terminus vermittelt hingegen die Bindung mit den leichten Ketten des Kinesin 1 (KLC), die je eine hoch konservierte α -helikale HR- („heptade repeat“) und TPR- („tetratricopeptid repeat“) Region aufweisen (modifiziert nach Vale et al., 2003).

1.6.2 Dynein und Dynactin

Dynein stellt eine Art Antagonist zu Kinesin dar, weil es auf den Mikrotubuli in die entgegengesetzte Richtung wandert. Somit gleitet es zum Minus-Ende der Mikrotubuli in Richtung des Zentrosoms (King, 2000). Dynein ist ein multimerer Proteinkomplex (~1,2 MDa), der aus zwei schweren (HC; „heavy chain“), zwei intermediären (IC; „intermediate chain“), zwei leicht intermediären (LIC; „light intermediate chain“) und sechs leichten Ketten (LC; „light chains“) besteht (s. Abb. 1.6.2 A). Während die schweren Ketten für die Motoraktivität sowie für die MT-Bindung verantwortlich sind, vermitteln die intermediären Ketten des Dyneins eine Interaktion zu Dynactin (Dynein Aktivator). Die Motordomäne umfasst sieben AAA-ATPase-Domänen, die in einer ringförmigen Symmetrie zueinander angeordnet sind (Koonce und Samsó, 2004). Dieses AAA-Wiederholungsmotiv reguliert durch Nukleotid Bindung bzw. Hydrolyse die Affinität des Motors zu den Mikrotubuli (Koonce und Samsó, 2004). Obwohl Dynein in der Lage ist, vollkommen selbstständig

Zellbestandteile entlang den Polymerschienen der MT zu transportieren, führt die Assoziation zwischen Dynein und Dynactin zu einer Stabilisation bzw. Aktivierung des Dynein Komplexes und erlaubt den Transport von Vesikeln entlang der Mikrotubuli über sehr lange Distanzen (Schroer und Sheetz, 1991; Schroer, 2004).

Dynactin ist ein multifunktionelles Adapterprotein, das sowohl die Mikrotubuli als auch den molekularen Motor bei der Interaktion mit den verschiedenen zellulären Komponenten unterstützt. Es ist ein Multi-Proteinkomplex von 1,2 MDa (Gill et al., 1991). Jeder Dynactin Komplex besteht aus 11 verschiedenen Polypeptiduntereinheiten (s. Abb. 1.6.2 B). Die größte Untereinheit, das p150 Glued, ermöglicht die Assoziation zu Dynein und erlaubt somit die Aktivierung des Motors (Vaughan und Vallee, 1995; King und Schroer, 2000). Neben Dynein besitzt auch p150 Glued eine Mikrotubuli-Bindungsdomäne, die vermutlich zu einer Stabilisierung des Motors führt (Schroer, 2004). Dynactin umfasst zwei funktionelle Bereiche, einen hervorstehenden Arm sowie einen hoch konservierten Arp1-Stab. Der hervorstehende Arm aus p150 Glued, Dynamitin und p24/22 ist für die Mikrotubuli- sowie Motor-Assoziation verantwortlich, wohingegen der Arp1 Stab, der sich aus Arp1, Arp11, CapZ, p62, p27 und p52 zusammensetzt, für die Bindung der verschiedenen Zellbestandteile wie z.B. Vesikel erforderlich ist. Das Aktin-verwandte Arp1 bildet kurze Filamente, die aus acht Untereinheiten bestehen und durch CapZ und Arp11 terminiert werden, und bindet an β III Spektrin, eine Golgi-spezifische Spektrin Isoform (Holleran et al., 2001). Die Interaktion des Arp1 mit Proteinen der Spektrin-Familie repräsentiert vermutlich einen generellen Bindemechanismus des Dynactin mit einer Vielzahl von subzellulären Komponenten (Schroer, 2004). Dynein und Dynactin sind jedoch nicht nur in den retrograden Vesikel-Transport involviert. Der aktivierte Motorkomplex lokalisiert in mitotischen Zellen entlang der Kernhülle und bewirkt aufgrund von mechanischen Kräften den Zerfall der nukleären Membran. Demzufolge leiten diese Proteine die Bildung der mitotischen Spindel ein (Salina et al., 2002). Der Dynein und Dynactin Komplex ist zudem an der Kernwanderung und an der Zellpolarisation in Oozyten beteiligt (Yamamoto und Hiraoka, 2003; Duncan und Warrior, 2002; Januschke et al., 2002). In kultivierten Zellen konnte Dynactin während der Interphase außerdem am Zentrosom nachgewiesen werden (Quintyne und Schroer, 2002).

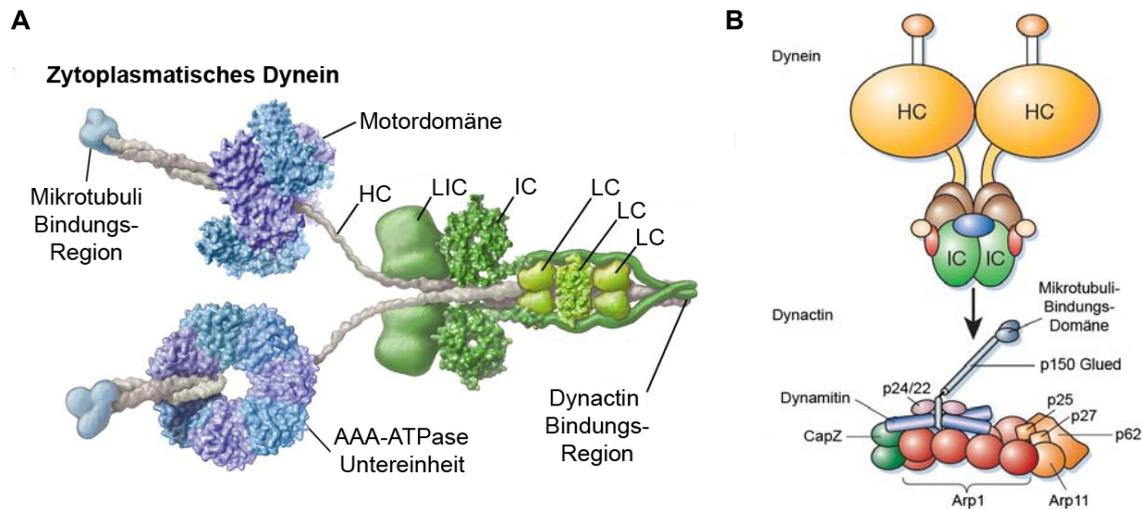


Abb. 1.6.2: Aufbau des Dyneins und Dynactins. (A) Dreidimensionale Struktur des zytoplasmatischen Dyneins. Der multimere Dynein Komplex umfasst zwei schwere Ketten (HC), die für die Motoraktivität, die Assoziation zu den Mikrotubuli sowie für die Bindung der verschiedenen leichten Ketten (LC), intermediären Ketten (IC) und leicht intermediären Ketten (LIC) verantwortlich ist. Die intermediären Untereinheiten erlauben eine Bindung des Dynein Aktivators Dynactin (bearbeitet nach Vale et al., 2003). (B) Schematische Darstellung der Dynein sowie Dynactin Untereinheiten (modifiziert nach Schliwa und Woehlke, 2003).

1.7 Das Zentrosom

Das Zentrosom der Vertebraten, das sich evolutionär aus dem Basalkörperchen/Axonem entwickelt hat (Azimzadeh und Bornens, 2004), besitzt eine essentielle Rolle in der dynamischen Organisation des Mikrotubulizytoskeletts. Während der Interphase beteiligt sich das Zentrosom mittels der Astral-Mikrotubuli an einer Vielzahl von fundamentalen zellulären Prozessen wie z.B. dem intrazellulären Transport, der Zellmotilität, Adhäsion und Polarität. In Vertebraten besteht das Zentrosom aus einem Paar rechtwinklig zueinander angeordneten Zentriolen, die in der perizentriolären Matrix („Coiled coil“ Proteine der Pericentrin-Familie) eingebettet sind (s. Abb. 1.7.1). Jede der zylinderförmigen Zentriolen besteht aus neun Tripel-Mikrotubuli, die sich in einer radialen Symmetrie ordnen (Azimzadeh und Bornens, 2007). In post-mitotischen Zellen umfasst das Zentrosom eine voll entwickelte Mutter-Zentriole sowie eine unreife Tochter-Zentriole, die sich während des vorherigen Zellzyklus an der Mutter-Zentriole bildet (Chretien et al., 1997). Die Mutter-Zentriole, die im Vergleich zur Tochter-Zentriole mit bis zu 20 % voluminöser ist, zeichnet sich durch zwei Anlagerungen von je neun Fortsätzen aus („distal und sub-distal appendages“; Paintrand et al., 1992), die vermutlich für die Verankerung der MT sowie für das Andocken an der Plasmamembran während der Ziliogenese verantwortlich sind (Azimzadeh und Bornens, 2007).

Bis jetzt wurden verschiedene Verankerungsmechanismen der Mikrotubuli am Zentrosom postuliert. Primär ermöglicht die Mutter-Zentriole eine feste Verankerung der Tubulinfilamente an ihren assoziierten Fortsätzen durch das Protein Ninein (Piel et al., 2000; Mogensen et al., 2000). Zusätzlich bindet Ninein im perizentriolären Material an γ -Tubulin Ring-Komplexe (γ -TuRC), die neben der MT-Befestigung auch für den Beginn der Polymerisation von Bedeutung sind (Delgehyr et al., 2005). Darüber hinaus bilden die p150Glued/Dynactin Komplexe unter Mitwirkung des MT-assoziiierenden Proteins EB1 („end-binding protein 1“) einen weiteren perizentriolären MT-Anker (Askham et al., 2002; Azimzadeh und Bornens, 2007). Ein vor kurzem von Yan et al. (2006) beschriebener Komplex aus CAP350, FOP und EB1 besitzt vermutlich ebenfalls eine bedeutende Rolle in diesem Verankerungs-Mechanismus. Zudem erfolgte die Identifizierung von nicht Membran-umschlossenen granulären Satelliten (70-100 nm), die aus einem PCM1 („pericentriolar material 1“) Protein aufgebaut sind und mit den zentrosomalen Proteinen Centrin, Ninein sowie Pericentrin assoziieren. Dabei ist die perizentrosomale Lokalisation dieser Satelliten von den MT sowie dem Dynein/Dynactin Komplex abhängig (Kubo et al., 1999; Dammermann und Merdes, 2002).

Die Zentrosomenduplikation und somit die „de novo“ Synthese der Tochter-Zentriolen ist Voraussetzung für eine funktionelle Zellteilung. In der frühen S-Phase sind Proteinkinasen wie Plk4/SAK als auch die Proteine Centrin, SAS-6 und Centrobin an der Verdopplung der Zentriolen beteiligt (Habedanck et al., 2005; Bettencourt-Dias et al., 2005; Azimzadeh und Bornens, 2007; Leidel et al., 2005; Rodrigues-Martins et al., 2007). Des Weiteren zeigten Hinchcliffe et al. (1999) und Meraldi et al. (1999), dass die Zellzyklus-Kinase CDK2 im Verbund mit Cyclin E und Cyclin A für die Initiation der Zentrosomenduplikation verantwortlich sind. Die Synthese bzw. die Elongation der Zentriolen während der späten S-Phase ist bislang jedoch weitgehend ungeklärt. Nur zwei Proteine, das BLD-10 („basal body-defective“) und BLD-2 (ϵ -Tubulin) aus *C. reinhardtii*, die den Aufbau der Tochter-Zentriolen beeinflussen, konnten identifiziert werden (Dutcher, 2003).

Während des Zellzyklus nehmen die γ -Tubulin Mengen im perizentriolären Material massiv zu. Durch die Ansammlung von MT-assoziiierenden Proteinen trägt γ -Tubulin entscheidend zur Bildung der mitotischen Spindel bei. Dieser Prozess der zentrosomalen Reifung wird durch die Polo-ähnliche sowie die Aurora A Kinase vermittelt (Blagden und Glover, 2003). Für die Ausbildung der bipolaren Spindeln ist die Zentrosomendissoziation in der späten G2 Phase entscheidend. C-Nap1 lokalisiert an den benachbarten Enden der parentalen Zentriolen und assoziiert mit Rootletin, einer konservierten Komponente

der zilliären Rootlets (Yang et al., 2005). Aufgrund dieser Interaktion werden die benachbarten Zentriolen miteinander verbunden. Die Trennung der parentalen Zentriolen wird durch die Phosphorylierung des C-Nap1 und Rootletin initiiert, wobei dieser Mechanismus von den Aktivitäten der NIMA-verwandten Kinase (Nek2) sowie der Protein Phosphatase 1 (PP1) abhängig ist (Fry et al., 1998; Helps et al., 2000; Yang et al., 2006). C-Nap1 und Rootletin bilden jedoch keinen kontinuierlichen Linker zwischen den benachbarten Zentriolen. Demzufolge wird vermutet, dass weitere, bislang noch nicht bekannte Proteine, an der Kohäsion der Zentrosomen beteiligt sind (Bahe et al., 2005).

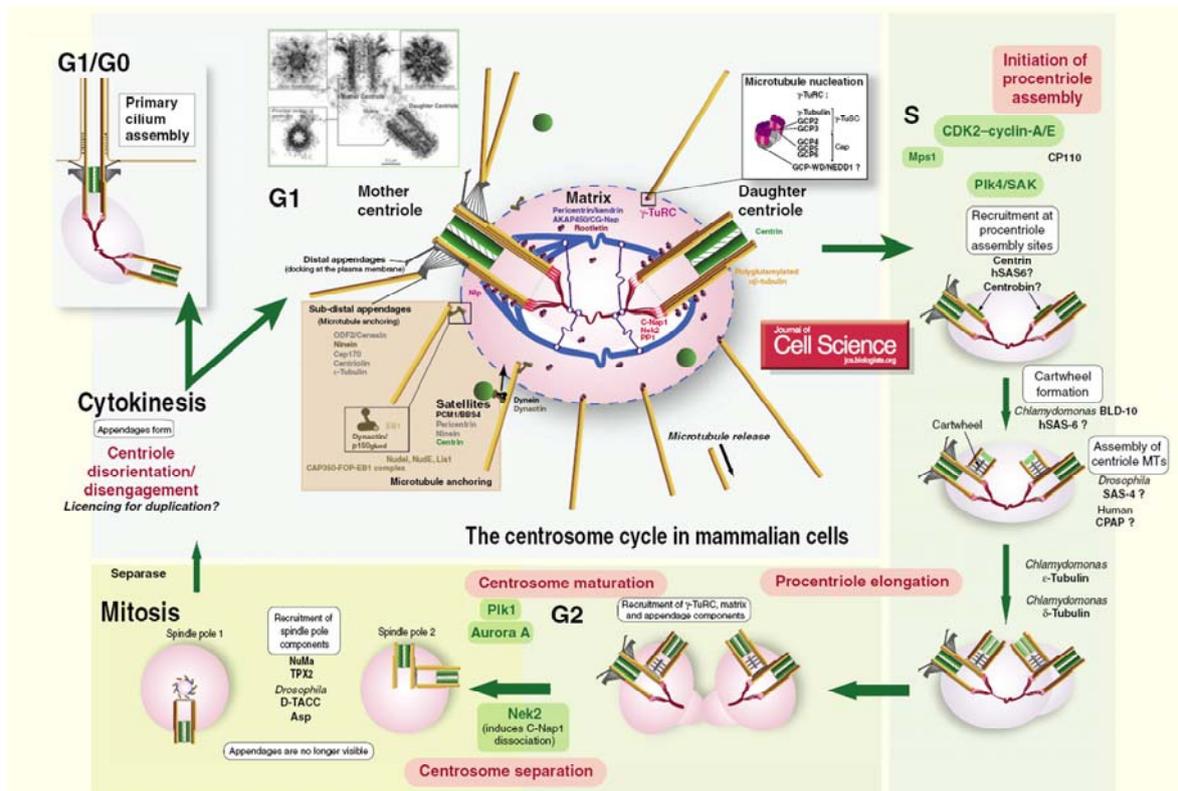


Abb. 1.7.1: Schematische Repräsentation der Bildung, Duplikation und Dissoziation des Zentrosoms während des Zellzyklus. In post-mitotischen Zellen enthält das Zentrosom zwei parentale Zentriole, die in der perizentriolären Matrix eingebettet sind. Während des Eintritts in die S-Phase beginnt die Synthese der Tochter-Zentriolen, die sogenannte Zentrosomenduplikation. In der G2-Phase erfolgt daraufhin die Dissoziation der parentalen Zentriolen zur Bildung der mitotischen Spindel (adaptiert und modifiziert nach Azimzadeh und Bornens, 2007).

1.8 Nukleäre Migration und Positionierung

Die nukleäre Migration und Positionierung repräsentiert einen essentiellen, zellbiologischen Mechanismus, der für die zelluläre Migration, Zellpolarisation und Teilung sowie für die Formation der Zygote von entscheidender Bedeutung ist. Folglich reguliert dieser Mechanismus eine Vielzahl von subzellulären Prozessen und bestimmt somit die Architektur einer Zelle sowie die Morphologie als auch die Entwicklung eines Gewebes. Bis jetzt sind drei verschiedene Proteinfamilien bekannt, die in die Bewegung des Zellkerns impliziert sind: das Zytoskelett, die Motorproteine und die KASH-Domänen Proteine. Die Mikrotubuli-abhängige Kernmobilität sowie der Einfluss von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen und den MT-Motorproteinen konnten in diversen Organismen mittels genetischer Studien nachgewiesen werden. Dynein und der aktivierende Dynactin Komplex kontrollieren z.B. die nukleäre Migration in *D. melanogaster*, in den Knospen von *S. cerevisiae* und in Hyphomyzeten (Morris, 2000; Yamamoto und Hiraoka, 2003). Der Verlust des humanen LIS1, einem Dynein- und MT-bindendem Protein, beeinflusst die neuronale Migration während der Entwicklung der Kleinhirnrinde und führt zu einer Fehlbildung des Gehirns, der sogenannten Lissenzephalie (Vallee und Tsai, 2006). Zudem ist auch NudF, ein LIS1 Ortholog in *Aspergillus*, in die nukleäre Positionierung involviert (Morris et al., 1998).

Jedoch ist nicht nur das Mikrotubulizytoskelett, sondern auch das Aktinzytoskelett an diesen zellulären Prozessen beteiligt. In einigen Organismen ist die nukleäre Mobilität sowohl vom Aktin- als auch vom Mikrotubuli-Filamentsystem abhängig, während in anderen Spezies jedes dieser Zytoskelettelemente individuell agiert (Morris, 2000; Reinsch und Gönczy, 1998). In *Xenopus* ermöglicht z.B. das mit MT- und Aktin-assoziierte Myosin 10 (Myo10) eine Verankerung des Zellkerns und die Anordnung der mitotischen Spindeln (Weber et al., 2004). Weiterhin führt das koordinierte Zusammenspiel von Forminen, Myosin, Aktin und dem Aktin-bindenden Protein Bud6 zu einer Ansammlung des Kar9 Proteins an den Knospen von *S. cerevisiae* (zusammengefasst in: Fuchs und Karakesisoglou, 2001). Daraufhin interagiert Kar9 mit Bim1b, einem an den Plus-Enden der MT lokalisierten Protein, um die Translokation des Tochter-Zellkerns in die Knospen der Hefen zu gewährleisten. In den Wurzelhaaren von *Arabidopsis* wurde hingegen nur ein Aktin-abhängiger Prozess der nukleären Migration nachgewiesen (Ketelaar et al., 2002).

Bisherige Studien in *C. elegans* zeigen, dass Mutationen im ANC-1 Gen die Migration und Verankerung des Zellkerns beeinflussen (Starr und Han, 2002). Die Funktion des MSP-300 Proteins während der Oogenese in *D. melanogaster* ist jedoch in Bezug auf

die Kernbewegung widersprüchlich (Technau und Roth, 2008; Yu et al., 2006). Zudem konnte kürzlich von Grady et al. (2005) mit Hilfe eines dominant negativen Nesprin-Ansatzes gezeigt werden, dass auch Nesprin-1/syne-1 von entscheidender Bedeutung für die Positionierung der synaptischen Nuklei ist. Murine Nesprin-1 knock out Studien belegen diesen nukleären Phänotyp (Zhang et al., 2007). Außerdem weisen Nesprin-2 Giant knock out Fibroblasten der Maus neben einer defekten Zellmigration auch eine gestörte Zellpolarität auf, wobei diese zellulären Prozesse die Kernbewegung mit einbeziehen (Lüke et al., 2008).

1.9 Zielsetzung

Derzeit ist nur wenig über die strukturelle Organisation der Kernhülle sowie das komplexe Netzwerk der Proteininteraktionen entlang der Kernmembran bekannt. Ein erster Schritt bei der Entwirrung dieses komplexen Systems ist die Identifikation und funktionelle Charakterisierung der assoziierten Proteine der Kernmembran. Mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid Systems wurde deshalb nach neuen Bindungspartnern der integralen Kernmembranproteine Nesprin-1 und Nesprin-2 gesucht. In dieser Interaktionsstudie konnten eine Vielzahl von neuen potentiellen Interaktionspartnern selektioniert und identifiziert werden, wobei sich sowohl für Nesprin-1 als auch für Nesprin-2 jeweils eine spezifische Untereinheit der Mikrotubuli-assoziiierenden Motorproteine Dynactin und Kinesin 1 als Bindepartner nachweisen ließ.

Ziel dieser Arbeit ist die Interaktion der molekularen Motoren zu validieren und weiterführend zu analysieren. Primär soll der Nesprin-2/Kinesin 1 Assoziations-Komplex anhand verschiedener molekularbiologischer und biochemischer Ansätze verifiziert sowie der Interaktionsbereich kartiert werden. Um die potentielle Funktion dieser Interaktion aufzuklären, soll durch zellbiologische und proteinbiochemische Methoden die Abhängigkeit dieser Bindepartner voneinander sowie deren subzelluläre Phänotypen untersucht werden. Zusätzlich soll auch die Nesprin-1/Dynactin Interaktion spezifiziert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien der Qualität pro analysis (p.a.) und Enzyme wurden von den Firmen Biozym, Difco, Fluka bzw. Sigma, Gibco, Invitrogen, Life Technologies, Merck, National Diagnostics, New England Biolabs (NEB), VWR, Riedel-de Haan, Roche oder Roth bezogen. Falls von weiteren Firmen Chemikalien, Enzyme oder andere Verbrauchsmaterialien genutzt wurden, sind diese an entsprechender Stelle aufgeführt. Standardlaborgeräte wurden von den Firmen Beckmann, Biorad, Eppendorf, Hofer, Leica, Liebherr, NUNC, Samsung, Sorvall, VWR oder Zeiss bezogen. Die in dieser Arbeit nicht beschriebenen verwendeten Puffer und Lösungen wurden aus Sambrook et al. (2001) übernommen oder in Anlehnung daran modifiziert.

2.1.2 Kits

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

Cell Line Nucleofector Kit V	Amaxa
High Pure PCR Purification Kit	Roche
Nucleobond AX 100	Macherey-Nagel
NucleoSpin Extract 2 in 1	Macherey-Nagel
Pure Yield™ Plasmid Midiprep System	Promega
pGem-Teasy-Vektor System I	Promega

2.1.3 Antikörper

Die Antikörper wurden gemäß den Angaben der Hersteller in PBG (für die Immunfluoreszenz) bzw. Block-Puffer (für den Westernblot) verdünnt. Hybridoma-Überstände wurden 1:2 verdünnt oder unverdünnt eingesetzt.

Primäre Antikörper:

anti-Nesprin-2 Antikörper (mAb K56-386)	Lüke et al., 2008
anti-Nesprin-2 Antikörper (mAb K20-478)	Zhen et al., 2002
anti-Nesprin-2 Antikörper (pAb K1)	Libotte et al., 2005
anti-GFP Antikörper (mAb K3-184-2)	Schreiner, 2000
anti-GST Antikörper (pAb GST)	Xiong et al., 2008
anti-Myc Antikörper (mAb 9E10)	nicht veröffentlicht
anti-Tubulin Antikörper (mAb WA3)	U. Euteneuer
anti- β -Aktin Antikörper (mAb AC-74)	Sigma
anti-KLC1 Antikörper (pAb KLC1 H-75)	Santa Cruz
anti-KLC Antikörper (mAb 63-90)	Stenoien und Brady, 1997
anti-KHC Antikörper (mAb KHC H2)	Chemicon
anti-Dynactin p150 Antikörper (mAb p150 Glued)	BD Transduction Lab.
anti-Pericentrin Antikörper (pAb Pc-4448)	Abcam
anti- γ -Tubulin Antikörper (mAb GTU-88)	Sigma
anti-Synaptophysin Antikörper (mAb SY 38)	Millipore
anti-Lamin A/C Antikörper (mAb Jol2)	Chemicon
anti-V5 Antikörper (mAb V5)	Invitrogen
anti-SUN1 Antikörper (pAb SUN1b)	Lu et al., 2008
anti-SUN2 Antikörper (pAb SUN2)	Lu et al., 2008
anti-Smad2/3 Antikörper (mAb Smad 2/3)	BD Transduction Lab.

Sekundäre Antikörper:

Esel-anti-Maus-IgG, Alexa 488-Konjugat	Sigma
Huhn-anti-Kaninchen-IgG, Alexa 488-Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Maus-IgG, Alexa 568-Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Alexa 568-Konjugat	Sigma
Esel-anti-Kaninchen-IgG, Alexa 647-Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Maus-IgG, Alexa 647-Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Maus-IgG, FITC-Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Maus-IgG, Cy3-Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Cy3-Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Maus-IgG, Peroxidase-Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Peroxidase-Konjugat	Sigma

2.1.4 Oligonukleotide

2.1.4.1 DNA-Oligonukleotide

Die Synthese aller in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide erfolgte durch die Firma Sigma-Ark. Tabelle 2.1 gibt einen Überblick über die synthetisch hergestellten Oligonukleotide.

Tabelle 2.1: Oligonukleotide mit zugehöriger Sequenz und Verwendungszweck.

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
KLC1-F	5' gaattcatgtatgacaacatgtccaca 3'	Klonierung
KLC1-R	5' ggatccgtcagttaaccagcccgag 3'	Klonierung
KLC1-2-F	5' cggtcgacatgacaacatgtccacaatggtg 3'	Klonierung
KLC1-2-R	5' tagcggccgctcagttaaccagcccgagcttc 3'	Klonierung
KLC1-N-term-R	5' tagcggccgcctaccgcgcggggatctcgtag 3'	Klonierung
KLC1 TPR4-R	5' tagcggccgcctatgttctgtagatctcgaggg 3'	Klonierung
KLC1-TPR1-F	5' cggtcgaccctgcggacgctccacaacct 3'	Klonierung
KLC1-TPR6-R	5' tagcggccgcctaaccctgtttacgagacctcatag 3'	Klonierung
SR-2-F	5' cggtcgaccgctttgaggactggctcaagtc 3'	Klonierung
SR-2-R	5' tagcggccgctcacttgagaggaaggagcgctgtg 3'	Klonierung
SR 1+2-F	5' gaattccgctttgaggactggctcaag 3'	Klonierung
SR 1+2-R	5' ggatccaggtgagccgccggtggaa 3'	Klonierung
SR 2+3-F	5' gaattcgaagaatttgagggcaccagg 3'	Klonierung
SR 2+3-R	5' ggatccctgtcgaagccccctctc 3'	Klonierung
SR 3+4-F	5' gaattccaacagctgaactctgatatc 3'	Klonierung
SR 3+4-R	5' ggatcccctgcaaggccattaaatc 3'	Klonierung
Nesp2 SR2-F	5' ccgaattcgaagaatttgagggcaccaggg 3'	Klonierung
Nesp2 SR2-R	5' gggtcgacgctaggtgagccgccggtggaac 3'	Klonierung
Nesp2 SR zw 2-3-F	5' ccgaattctcctgcactccgggcttgaa 3'	Klonierung
Nesp2 SR zw 2-3-R	5' gggtcgacgctacaaatttgtttattttgagcttattgt 3'	Klonierung
KIF5B-F	5' ccgaattcggatggcggacctggccgagtg 3'	Klonierung
KIF5B-R	5' gggtcgacttacactgtttgcctcctccacc 3'	Klonierung
pGAD-Rec a	5' ctattcgatgatgaagatacc 3'	Sequenzierung
pGAD-Rec b	5' gtgaactgcgggggttttca 3'	Sequenzierung
pCMV	5' gatccggtactagaggaactg 3'	Sequenzierung
EGFP-C	5' catggtcctgctggagttcgtg 3'	Sequenzierung
KLC1-486	5' cggaaagtcactggagatggtgg 3'	Sequenzierung
KLC1-708	5' catctggagttatgaatcagc 3'	Sequenzierung

KLC1-1198	5' gaggaagtacaaagaagcagag 3'	Sequenzierung
KLC1-1410	5' gctaagacgaaaaataacctgg 3'	Sequenzierung
KLC1-1632	5' gcctgcaaagttgatagtccaac 3'	Sequenzierung
KIF5B 488	5' gagcaagtgataatgactgtgc 3'	Sequenzierung
KIF5B 908	5' gaacatagctctaggagtccacag 3'	Sequenzierung
KIF5B 1222	5' ctccatcatcatacaatgagtctg 3'	Sequenzierung
KIF5B 1721	5' atgcaagctgagctgaatcgcc 3'	Sequenzierung
KIF5B 2200	5' cagcatgtcagcttcgtatctc 3'	Sequenzierung
KIF5B 2757	5' ctgagattgattctgatgacacc 3'	Sequenzierung
KIF5B 2908	5' gcgacttcgagctacagctga 3'	Sequenzierung
SR-19626	5' gacaggaatgttccacctgttc 3'	Sequenzierung

Nicht aufgeführte Sequenzierungsprimer wurden vom ZMMK-ServiceLabor bezogen.

2.1.4.2 RNA-Oligonukleotide

shRNA Oligonukleotide für Nesprin-2 Giant (Lüke et al., 2008):

Nesprin-2 Giant shRNA: 5' aaccagaagatgtggatgttgaagcttgaacatccacatcttct 3'

shRNA Oligonukleotide für KLC1:

KLC1 shRNA: 5' cagggtcttgacaatgttcacgaagcttgggaacattgtcaagacctgtttttt 3'

siRNA für Lamin A/C (Quiagen; Elbashir et al., 2001):

5' aactggacttcagaagaaca 3'

2.1.5 Vektoren

pCMV-Myc	Clontech
pEGFP-C2	Clontech
pGADT-7 (GAL4 AD)	Clontech
pGADT-7-Rec (GAL4 AD)	Clontech
pGBKT-7 (GAL4 DNA-BD)	Clontech
pGem-Teasy [®]	Promega
pGEX-4T-1	Amersham
pShag-1	Paddison et al. (2002)

2.1.6 Plasmide

Die in Tabelle 2.2 bis Tabelle 2.4 aufgeführten Konstrukte wurden für die vorliegende Arbeit hergestellt bzw. verwendet. Es sind die Vektoren, die klonierten DNA-Fragmente, die kodierten Aminosäuren sowie die Klonierungsstrategien bzw. die Herkunft der Plasmide angegeben.

2.1.6.1 Plasmide für das Hefe-Zwei-Hybrid System

Tabelle 2.2: Verwendete und klonierte Konstrukte für das Hefe-Zwei-Hybrid System.

Vektor	Insert	Aminosäuren	Anmerkung
pGADT-Rec	KLC1 ¹⁻⁵⁶⁰	1-560	Isolierung mittels der cDNA-Bank Durchmusterung.
pGADT-Rec	KLC1 ¹⁻³⁸⁴	1-384	Isolierung mittels der cDNA-Bank Durchmusterung.
pGADT-Rec	KLC1 ¹³⁸⁻⁵⁶⁰	138-560	Isolierung mittels der cDNA-Bank Durchmusterung.
pGADT-Rec	KLC1 ²¹⁵⁻⁵⁶⁰	215-560	Isolierung mittels der cDNA-Bank Durchmusterung.
pGADT-Rec	p150 Glued ^{638-1.278}	638-1.278	Isolierung mittels der cDNA-Bank Durchmusterung.
pGADT-Rec	p150 Glued ^{902-1.278}	902-1.278	Isolierung mittels der cDNA-Bank Durchmusterung.
pGADT-Rec	p150 Glued ^{917-1.278}	917-1.278	Isolierung mittels der cDNA-Bank Durchmusterung.
pGADT-Rec	p150 Glued ^{1.076-1.278}	1.076-1.278	Restriktionsverdau von pGADT-Rec-p150 Glued ⁶³⁸⁻¹²⁷⁸ mit BglII.
pGADT-Rec	p150 Glued ^{638-1.051}	638-1.051	Restriktionsverdau von pGADT-Rec-p150 Glued ⁶³⁸⁻¹²⁷⁸ mit ApaI und ClaI.
pGADT-Rec	p150 Glued ^{638-1.278Δ}	638-1278Δ 1051-1139	Restriktionsverdau von pGADT-Rec-p150 Glued ⁶³⁸⁻¹²⁷⁸ mit ApaI.
pGBKT-7	Nesprin-2 SR	6.146-6.799	Libotte (2004)
pGBKT-7	Nesprin-2 SR 1+2	6.146-6.347	PCR-Produkt der Primer SR 1+2-F und SR 1+2-R wurde in pGem-Teasy [®] ligiert und nach Restriktionsverdau (EcoRI und BamHI) in

			pGBKT-7 kloniert.
pGBKT-7	Nesprin-2 SR 2+3	6.247-6.656	PCR-Produkt der Primer SR 2+3-F und SR 2+3-R wurde in pGem-Teasy [®] ligiert und nach Restriktionsverdau (EcoRI und BamHI) in pGBKT-7 kloniert.
pGBKT-7	Nesprin-2 SR 3+4	6.553-6.799	PCR-Produkt der Primer SR 3+4-F und SR 3+4-R wurde in pGem-Teasy [®] ligiert und nach Restriktionsverdau (EcoRI und BamHI) in pGBKT-7 kloniert.
pGBKT-7	Nesprin-1-165	1-1.431	Padmakumar (2004)
pGBKT-7	Nesprin-1-165 ¹⁻⁴⁶⁴	1-464	Restriktionsverdau von pGBKT-7 Nesprin-1-165 mit EcoRI und BamHI.
pGBKT-7	Nesprin-1-165 ⁴⁶⁵⁻¹⁴³¹	465-1.431	Restriktionsverdau von pGBKT-7 Nesprin-1-165 mit BamHI und Sall.

2.1.6.2 Plasmide für die Überexpression in Säugerzellen

Tabelle 2.3: Verwendete und klonierte Konstrukte für die Überexpression in Säugerzellen.

Vektor	Insert	Aminosäuren	Anmerkung
pEGFP-C2	KLC1	1-560	PCR-Produkt der Primer KLC1-F und KLC1-R (Template: pOBT-KLC1) wurde in pGem-Teasy [®] ligiert und nach Restriktionsverdau (EcoRI und BamHI) in pEGFP-C2 kloniert.
pEGFP-C2	Nesprin-2 SR	6.146-6.799	Libotte (2004)
pEGFP-C2	Nesprin-2 SR 2+3	6.247-6.656	Restriktionsfragment von pGBKT-7 Nesprin-2 SR 2+3 (mit EcoRI und BamHI) wurde in pEGFP-C2 ligiert.
pEGFP-C2	Nesprin-2 SR 2-3	6.348-6.552	PCR-Produkt der Primer Nesp2 SR zw 2-3-F und Nesp2 SR zw 2-3-R (Template: pGBKT-7 Nesprin-2 SR) wurde nach Restriktionsverdau (mit EcoRI und Sall) in

			pEGFP-C2 ligiert.
pEGFP-C2	Nesprin-1-165	1-1.431	Padmakumar (2004)
pEGFP-C2	SP		Lu (2007)
pEGFP-C2	SP-SUN1-CT		Lu (2007)
pEGFP-C2	SUN1	1-913	Padmakumar (2004)
pEGFP-C2	Rootletin	1-2009	Yang et al. (2002)
pCMV-Myc	KLC1	1-560	PCR-Produkt der Primer KLC1-2-F und KLC1-2-R (Template: pEGFP-C2 KLC1) wurde nach Restriktionsverdau (mit Sall und NotI) in pCMV-Myc ligiert.
pCMV-Myc	KLC1 CT	213-560	PCR-Produkt der Primer KLC1 TPR1-F und KLC1-2-R (Template: pEGFP-C2 KLC1) wurde nach Restriktionsverdau (mit Sall und NotI) in pCMV-Myc ligiert.
pCMV-Myc	KLC1 T1-6	213-497	PCR-Produkt der Primer KLC1 TPR1-F und KLC1 TPR6-R (Template: pEGFP-C2 KLC1) wurde nach Restriktionsverdau (mit Sall und NotI) in pCMV-Myc ligiert.
pCMV-Myc	KIF5B	1-963	PCR-Produkt der Primer KIF5B-F und KIF5B-R (Template: pXPE-KIF5B) wurde nach Restriktionsverdau (mit EcoRI und Sall) in pCMV-Myc ligiert.
pCMV-Myc	Nesprin-2 SR	6.146-6.799	PCR-Produkt der Primer SR-2-F und SR-2-R (Template: pGBKT-7 Nesprin-2 SR) wurde nach Restriktionsverdau (mit Sall und NotI) in pCMV-Myc ligiert.
pDsRed (RFP)	Pericentrin	1-3336	Gillingham und Munro (2000)
pTracer	SUN2-V5	1-742	Lu et al. (2008)

2.1.6.3 Plasmide für die Bakterienexpression

Tabelle 2.4: Verwendete und klonierte Konstrukte für die Bakterienexpression.

Vektor	Insert	Aminosäuren	Anmerkung
pGEX-4T-1	KLC1	1-560	PCR-Produkt der Primer KLC1-2-F und KLC1-2-R (Template: pEGFP-C2 KLC1) wurde nach Restriktionsverdau (mit Sall und NotI) in pGEX-4T-1 ligiert
pGEX-4T-1	KLC1 NT	1-212	PCR-Produkt der Primer KLC1-2-F und KLC1-N-term-R (Template: pEGFP-C2 KLC1) wurde nach Restriktionsverdau (mit Sall und NotI) in pGEX-4T-1 ligiert.
pGEX-4T-1	KLC1 T1-4	213-372	PCR-Produkt der Primer KLC1 TPR1-F und KLC1 TPR4-R (Template: pEGFP-C2 KLC1) wurde nach Restriktionsverdau (mit Sall und NotI) in pGEX-4T-1 ligiert.
pGEX-4T-1	KLC1 T1-6	213-497	PCR-Produkt der Primer KLC1 TPR1-F und KLC1 TPR6-R (Template: pEGFP-C2 KLC1) wurde nach Restriktionsverdau (mit Sall und NotI) in pGEX-4T-1 ligiert.
pGEX-4T-1	KLC1 CT	213-560	PCR-Produkt der Primer KLC1 TPR1-F und KLC1-2-R (Template: pEGFP-C2 KLC1) wurde nach Restriktionsverdau (mit Sall und NotI) in pGEX-4T-1 ligiert.
pGEX-4T-1	Nesprin-2 SR	6.146-6.799	Libotte et al. (2005)
pGEX-4T-1	Nesprin-2 SR 1+2	6.146-6.347	PCR-Produkt der Primer SR 1+2-F und SR 1+2-R wurde in pGem-Teasy [®] ligiert und nach Restriktionsverdau (mit EcoRI) in pGEX-4T-1 kloniert.
pGEX-4T-1	Nesprin-2 SR 2+3	6.247-6.656	PCR-Produkt der Primer SR 2+3-F und SR 2+3-R wurde in pGem-Teasy [®] ligiert und nach Restriktionsverdau (mit EcoRI) in pGEX-4T-1 kloniert.

pGEX-4T-1	Nesprin-2 SR 3+4 (pGEX-4T-1-K1)	6.553-6.799	Libotte et al. (2005)
pGEX-4T-1	Nesprin-2 SR 1	6.146-6.241	S. Neumann
pGEX-4T-1	Nesprin-2 SR 2	6.247-6.347	S. Neumann
pGEX-4T-1	Nesprin-2 SR 2-3	6.348-6.552	S. Neumann

Darüber hinaus wurden die folgenden Konstrukte als Template verwendet:

pXPE-KIF5B

R. D. Vale

pOBT-KLC1 (Image Klon)

www.geneservice.co.uk

2.2 Methoden

Allgemeine Arbeitsanweisungen der Molekularbiologie und Proteinbiochemie, welche im Rahmen dieser Arbeit nicht näher beschrieben sind, wurden auf Grundlage von Standardprotokollen (Sambrook et al., 2001) durchgeführt und ggf. optimiert.

2.2.1 Hefe-Zwei-Hybrid System

Die für das Hefe-Zwei-Hybrid System verwendeten Puffer, Lösungen, Selektions-Medien/Platten und Methoden wurden nach den Angaben des „Yeast Potocols Handbook“ (<http://www.clontech.com/images/pt/PT3024-1.pdf>; PT3024-1, Clontech) hergestellt bzw. durchgeführt. Für die Transformation der AH109 Hefezellen (Holtz, nicht veröffentlicht) wurde 0,1 µg hoch reine Plasmid-DNA (s. Tabelle 2.2; Matchmarker-Systems 3, Clontech) eingesetzt.

2.2.2 shRNA knock down Strategie

Der RNA-Interferenz kompetente Vektor pShag-1 (mit einem humanen U6 Promotor; -265 bis +1) wurde in den pTOPO-ENTR/D Vektor (Invitrogen) inseriert (Paddison et al., 2002; http://kathadin.cshl.org:9331/RNAi_web/scripts/main2.pl). Die Oligonukleotide (s. 2.1.4.2) wurden nach dem Protokoll auf <http://kathadin.cshl.org:9331/homepage/portal/html/protocols/> erstellt. Nach der Hybridisierung wurden die Oligonukleotide in den mit BseRI/BamHI geschnittenen pShag-1 Vektor ligiert.

2.2.3 Kultivierung und Transfektion von Säugerzellen

Adhärenz wachsende Säugerzellen wurden unter Wasser-gesättigter Atmosphäre und 5 % CO₂ bei 37°C kultiviert. Für die Weiterführung der Zellkulturlinien HaCaT (Boukamp et al., 1988), COS7 (Gluzman, 1981), NIH-3T3 (Todaro und Green, 1963) und von primären Fibroblasten (Zaim, 2005) wurde Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; D5796, Sigma) mit einem hohen Anteil an Glukose (4,5 g/l), 10 % FBS (Sigma), 2 mM Glutamin (Sigma), 2 mM Penicillin und 2 mM Streptomycin (Sigma) verwendet. Zur Kultivierung der stabil transfizierten GFP-SP-SUN1-CT HaCaT-Zellen (Lu, 2007) wurde dem Kulturmedium 0.5 mg/ml G 418 Disulfat (Gentamycin; Sigma) zugesetzt.

COS7-Zellen (5×10^6) wurden mit 5-10 µg hoch reiner Plasmid-DNA (s. Tabelle 2.3) bei 170 V, 950 µF mittels des Gene-Pulser®II (Bio-Rad) elektroporiert. HaCaT-Zellen und NIH-3T3-Fibroblasten wurden mit der Amaxa Nucleofector Technologie entsprechend der Angaben des Herstellers (Amaxa Biosystems) transfiziert.

Für die Zerstörung des Mikrotubulizytoskeletts wurde dem Kulturmedium 12,5 µM Colchicin zugegeben. Nach einer Zelltyp-spezifischen Inkubation von 2-4 h (HaCaT-Zellen 4 h, COS7-Zellen 4 h und NIH-3T3-Zellen 2 h) bei 37 °C erfolgte die Fixierung und Permeabilisierung der auf Deckgläschen wachsenden Zellen.

Für den „scratch-Assay“ wurden die auf Deckgläschen ausgesäten HaCaT-Zellen in serumhaltigem Medium kultiviert und nach Erreichen der Konfluenz ü.N. in serumfreiem Medium gehalten. Mit einer gelben Pipettenspitze wurde eine Wunde durch den Zellrasen gezogen, serumhaltiges Medium zugegeben und die Zellen 6 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen fixiert und der indirekten Immunfluoreszenz unterzogen.

Für die Anschaltung des Smad/TGF-β-Signalwegs wurde dem Kulturmedium der HaCaT-Zellen TGF-β (0,2 ng/ml Endkonzentration; PeproTech) zugesetzt. Die HaCaT-Zellen wurden daraufhin zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0, 2, 5, 10, 20 und 30 min) fixiert und permeabilisiert.

2.2.4 Fixierung und Permeabilisierung von Säugerzellen

Auf Deckgläschen ausgesäte Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, mit 4 % Paraformaldehyd in PBS (15 min, RT) fixiert und mit 0,5 % Triton-X-100 in PBS (4 min, RT) permeabilisiert. Anschließend wurden die Deckgläschen dreimal mit PBS gewaschen und konnten für die Fluoreszenzmikroskopie verwendet werden. Für die Dokumentation des Mikrotubulizytoskeletts wurden die Zellen entweder mit Methanol (10

min, -20°C) oder mit 4 % Paraformaldehyd in BRB 80 Puffer (80 mM Pipes, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, pH 6.8) fixiert (15 min, RT).

Zur Reduktion des zytoplasmatischen Hintergrundes wurden die auf Deckgläschen ausgesäten Zellen zuerst mit 0,1 % Triton-X-100 (Merck) in PBS permeabilisiert (10 s, RT), einmal mit PBS gewaschen und danach mit 4 % Paraformaldehyd in PBS bzw. BRB 80 Puffer fixiert (15 min, RT).

2.2.5 Immunfluoreszenzmikroskopie

Nach der Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen mit PBG abgesättigt (30 min, RT), danach mit einem primären Antikörper inkubiert (s. 2.1.3; 1 h, RT oder 4°C über ü.N.) und anschließend mit PBS (3 x 5 min) gewaschen. Diese Zellen wurden im Anschluss mit einem sekundären Antikörper inkubiert (s. 2.1.3; 1 h, RT), erneut mit PBS (3 x 5 min) gewaschen und in Gelvatol eingebettet (Aushärten ü.N. bei RT).

Für die Färbung der Mitochondrien wurden die auf Deckgläschen ausgesäten Zellen 30 min vor der Fixierung mit 200 µM MitoTracker[®]Red CMXRos (Moleculare Probes) behandelt.

2.2.6 Mikroskopie

Für die Epifluoreszenzmikroskopie (s. Abb. 3.1.10, Abb. 3.1.14 und Abb. 3.1.16) wurde das Fluoreszenzlichtmikroskop DMR mit der Kamera DC 350 FX der Firma Leica benutzt und das Programm irfanview für Aufnahmen verwendet. Für die konfokale Lasermikroskopie wurde das Leica CLSM-SP, das Leica TCS SP5 und das Zeiss 200M Axiovert Mikroskop benutzt, die optische Schnittebenen durch die Präparate erlauben. Alle in dieser Arbeit dargestellten Aufnahmen mit Ausnahme der oben aufgeführten, wurden mittels der konfokalen Lasermikroskopie dokumentiert. Die Daten wurden mit den begleitenden Leica- sowie Zeiss Bildverarbeitungssystemen wie dem LAS AF (Leica Application Suite; Advanced Fluorescence Lite), dem Zeiss LSM Image Browser sowie der Bildbearbeitungssoftware ImageJ 1.41 und Adobe Photoshop CS2 weiterverarbeitet.

2.2.7 Proteinlysate aus Säugerzellen

Zellen einer bis zu 90 % konfluent bewachsenen Schale wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 5 ml PBS mit Inhibitoren (0,5 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM Benzamidin, 1 mM PMSF) auf Eis abgeschabt. Die Zellen wurden 5 min bei 3.000 Upm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in Lysispuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet-P40, 5 % Natriumdesoxycholat, 1 x Proteinase Inhibitor Cocktail, 1 mM Benzamidin, 1 mM DTT, 1 mM EGTA und 0,5 mM

PMSF) gelöst. Zur Homogenisierung wurde das Lysat achtmal durch eine 0,4 mm Kanüle gezogen. Nach einer viertelstündigen Inkubation auf Eis wurde das Lysat ultrabeschallt (50 % konstanter Schall, 15 s). Die Proben wurden in 5 x SDS-Probenpuffer (2,5 ml 1 M Tris/HCl pH 6,5, 4,0 ml 10 % Natriumdodecylsulfat, 2,0 ml Glycin, 1,0 ml β -Mercaptoethanol, 200 μ l 10 % Bromphenolblau) für 5 min aufgekocht und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

2.2.8 Gewebelysate des murinen Gehirns

Aus 5/6 Tage alten Mäusen (C57 Bl6) wurde das Gehirn-Gewebe frisch isoliert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Gewebeproben wurden gewogen und pro 100 mg Gewebe 400 μ l Lysispuffer (s. 2.2.7) bzw. IP-Puffer (75 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM N-ethylmaleimide, 10 mM Chaps, 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM Benzamidin, 1 mM DTT, 1 mM EGTA und 0,5 mM PMSF; Konecna et al., 2006) zugegeben. Daraufhin wurden die Proben mit einem ULTRA TURRAX homogenisiert, 10 bis 20 min auf Eis inkubiert und bei 3000 Upm abzentrifugiert. Die Überstände wurden durch eine 0,4 mm Kanüle gezogen bzw. sonifiziert (50 % konstanter Schall, 3 x 15 s) und danach bei 12.000 Upm erneut zentrifugiert. Die Überstände wurden sowohl für die GST-Bindungsanalyse als auch für die Immunpräzipitation verwendet.

2.2.9 Induktion und Reinigung rekombinanter Proteine

Für die Expression rekombinanter Proteine (s. Tabelle 2.4) wurde der *E. coli*-Stamm XL 2 blue (Stratagen) verwendet. Übernachtskulturen der entsprechenden Transformanten wurden 1:50 in LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin (Sigma) verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 unter Schütteln (250 Upm) inkubiert. Die Expression rekombinanter Proteine erfolgte durch Zugabe von IPTG (1 mM; Loewe Biochemica). Die Zellen wurden daraufhin weitere 4 h bei 37°C geschüttelt und nach der Ernte abzentrifugiert (6.000 Upm, 20 min). Das Zell-Pellet einer 500 ml Bakterienkultur wurde in 7 ml STE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) mit Inhibitoren (0,5 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM Benzamidin, 1 mM PMSF) resuspendiert. Die Zellen wurden mittels Lysozym (100 μ g/ml; Sigma) und eines Glaspotters lysiert. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Zugabe von Sarcosyl (1,4 % Endkonzentration; Sigma). Anschließend wurde das Bakterienlysate für 1 min mit Ultraschall behandelt und 30 min bei 16.000 Upm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit Triton-X-100 (2 % Endkonzentration) versetzt. Danach wurde dieser Überstand zu 150 μ l mit PBS äquilibrierter Glutathion-Agarose-Matrix gegeben und ü.N. bei 4°C moderat geschüttelt.

Nach einminütiger Zentrifugation bei 1.000 Upm wurde mehrmals mit STE-Puffer gewaschen. Die an die Glutathion-Agarose-Matrix gekoppelten GST-Fusionsproteine wurden daraufhin für die in vitro GST-Bindungsanalyse verwendet.

2.2.10 GST-(Glutathion-S-Transferase) Bindungsanalyse

Die spezifischen Protein- sowie Gewebelysate (Input) wurden über Nacht mit den aufgereinigten und an die Glutathione Sepharose™ 4B (Amersham) gebundenen GST-Fusionsproteinen auf einem Roller bei 4°C inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurde die Glutathion-Agarose-Matrix in 80-120 µl 1 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und bei 99°C erhitzt. Der Input und die Überstände wurden separat mit SDS-Probenpuffer behandelt. Glutathion-Agarose-Matrix, Input und Überstände wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) und einem darauf folgenden Westernblot (Towbin et al., 1979) analysiert.

2.2.11 Immunpräzipitation

Die in IP-Puffer (s. 2.2.8) aufgenommenen murinen Gehirn-Gewebelysate wurden zuerst mit 100 µl Protein-A-Sepharose CL-4B (Pharmacia Biotech) für 2 h auf einem Roller bei 4°C behandelt, um unspezifische Hintergrundsignale zu reduzieren. Nach dieser Vorreinigung erfolgte eine einminütige Zentrifugation bei 1.000 Upm und 4°C. Die Protein-A-Sepharose Beads wurden verworfen, wobei die Überstände (Input) für die Antigen/Antikörper Bindung verwendet wurden. Zu den Überständen wurden 6 µg aufgereinigter Antikörper gegeben und für 3-4 h moderat bei 4°C geschüttelt. Diese Ansätze wurden daraufhin mit 100 µl Protein-A-Sepharose Beads versetzt und ü.N. unter moderatem Schütteln bei 4 °C inkubiert. Die Protein-A-Sepharose Beads bzw. die daran gebundenen Immunkomplexe wurden durch eine einminütige Zentrifugation pelletiert bzw. präzipitiert. Die Beads wurden dreimal mit PBS und Inhibitoren (0,5 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM Benzamidin, 1 mM PMSF) gewaschen und danach mit 70-100 µl SDS-Probenpuffer aufgekocht. Die Immunkomplexe sowie der Input wurden nach einer SDS-PAGE (Laemmli, 1970), einer Silberfärbung (s. 2.2.12.2) und einer Westernblotanalyse (Towbin et al., 1979) unterzogen.

2.2.12 Färbung von Polyacrylamidgelen

2.2.12.1 Färbung mit Coomassie-Blau

Zur Färbung der in Polyacrylamidgelen getrennten Proteine wurden die SDS-Gele 20-30 min in Färbelösung (0,1 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blau R 250, 50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure) leicht geschüttelt. Die nicht an Proteine gebundenen Farbstoffpartikel wurden durch Schütteln in Entfärberlösung (10 % (v/v) Ethanol, 7 % (v/v) Essigsäure) aus der Gelmatrix entfernt.

2.2.12.2 Silberfärbung

Für eine Färbung der aufgetrennten Proteine mit einer sensitiveren Methode, wie unter 2.2.12.1 beschrieben, wurde die Silberfärbung (Blum et al., 1987) benutzt. Dazu wurden SDS-Gele 5 min in Fixierungs-Lösung (60 ml 50 % ige Azeton-Lösung, 1,5 ml 50 % ige Trichloressigsäure und 25 µl 37 % ige Formaldehyd-Lösung) geschüttelt. Nach mehrmaligem Waschen in Wasser (3 x 5 s, 1 x 5 min, 3 x 5 s) 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 s) und für 8 min in Imprägnier-Lösung (0,8 ml 20 % ige Silbernitrat-Lösung, 0,6 ml 37 % ige Formaldehyd-Lösung, in 60 ml Wasser) geschüttelt. Danach wurde das Gel nochmals gewaschen (2 x 5 s) und mit Entwickler-Lösung (1,2 g Na₂CO₃, 25 µl 37 % ige Formaldehyd-Lösung, 25 µl 10 % ige Natriumthiosulfat-5-hydrat (Na₂S₂O₃ x 5 H₂O) in 60 ml Wasser) behandelt. Die Reaktion wurde nach 20-30 s mit 1 % iger Essigsäure abgestoppt und das Gel mit Wasser abgespült.

2.2.13 Immunmarkierung und Detektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Der Nachweis transferierter Proteine auf einer Trägermembran erfolgte mit Hilfe spezifischer Antikörper. Die Membran (NitrozelluloseTransfermembran, Schleicher und Schuell bzw. Immobilon™-P Transfermembran, Millipore) wurde für 1 h mit Block-Puffer (5 % Milchpulver, 0,05 % Tween in PBS) abgesättigt. Daraufhin wurde die Membran mit Hybridomaüberständen oder aufgereinigten Antikörpern (s. 2.1.3) inkubiert (1 h bei RT oder ü.N. bei 4°C). Nach dem Waschen der Membran mit PBS (dreimal für 5 min) erfolgte die Inkubation mit einem sekundären Antikörper (1 h bei RT), der an eine Peroxidase gekoppelt ist (s. 2.1.3). Nicht gebundene Antikörper wurden durch dreifaches Waschen (je 5 min) mit PBS entfernt. Die Visualisierung der Immunmarkierung erfolgte durch Chemilumineszenz (ECL). Dafür wurde die Nitrozellulosemembran für 1 min in der

Luminollösung (1 ml Tris/HCl pH 6,8, 100 µl Luminol (0,25 M in DMSO), 47 µl Cumarinsäure (0,09 M in DMSO), 10 ml Wasser und 6 µl H₂O₂) inkubiert, kurz abgetupft und anschließend ein Röntgenfilm (HyperfilmTMECL; Amersham) in unterschiedlichen Zeitintervallen (5 s bis 30 min) exponiert. Die densitometrische Analyse der Chemilumineszenzsignale erfolgte mit Hilfe der Image Gauge Software (Version 4.23).

2.2.14 Datenbearbeitung

Die in dieser Arbeit dargestellten Graphen wurden mit Excel (Microsoft Office 2007) erstellt. Für die statistischen Analysen wurde ein zweiseitiger ungepaarter Student t-Test durchgeführt und als signifikant gewertet, wenn mindestens $P \leq 0,05$ war. Ein Durchschnittsfehler der Standardabweichung („standard error of the mean“, SEM) wurde wie folgt berechnet: $SEM = \text{Standardabweichung (SD)} / (\text{Wurzel aus } n)$, mit $n = \text{Pobenzahl, Anzahl unabhängiger Versuche}$.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung neuer Nesprin-2 assoziierender Proteine

Eine wichtige Voraussetzung zum Verständnis der Funktion eines Proteins ist die Ermittlung sowie Charakterisierung seiner Bindungspartner. Nesprin-2 Giant repräsentiert aufgrund seiner funktionellen Domänenstruktur und seiner enormen Größe (796 kDa) eine Plattform für eine Vielzahl von Proteininteraktionen (s. Abb. 3.1.1).

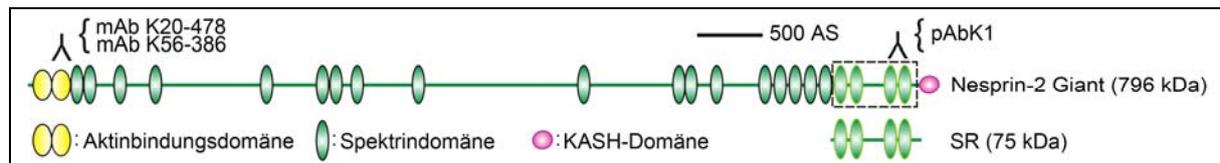


Abb. 3.1.1: Domänenstruktur von Nesprin-2 Giant und Nesprin-2 SR. Schematische Darstellung der größten Nesprin-2 Isoform (Nesprin-2 Giant, 796 kDa) und Nesprin-2 SR (SR, 75 kDa). SR umfasst die letzten vier Spektrindomänen des Nesprin-2 Giant. Darüber hinaus sind die Epitope der im Rahmen dieser Studie verwendeten Nesprin-2 spezifischen Antikörper, mAb K20-478, mAb K56-386 und pAb K1 (als invertierte Y) gezeigt.

Ein charakteristisches Merkmal der Nesprine ist die subzelluläre Lokalisierung entlang der Zellkernmembran, wobei die hoch konservierte KASH-Domäne, die als nukleärer Anker fungiert, diese zelluläre Positionierung vermittelt (Starr und Fischer, 2005). Um die Auswirkung des Verlusts der KASH-Domäne auf die Lokalisation des Nesprin-2 zu bestimmen, wurde ein 75 kDa großes, C-terminales Nesprin-2 Fragment (SR; AS 6.146-6.799; 75 kDa), als Myc-Fusionsprotein in COS7-Zellen exprimiert. SR umfasst die letzten vier Spektrindomänen von Nesprin-2 Giant (s. Abb. 3.1.1). Trotz fehlender KASH-Domäne weist das Myc-SR Fusionsprotein eine gleichmäßige Verteilung entlang der Kernmembran auf (Abb. 3.1.2; Pfeilspitzen in A und A'). Zudem wurde eine zytoplasmatische Anreicherung des SR-Fusionsproteins nahe der Kernmembran beobachtet (Abb. 3.1.2; Stern in A und A'). Außerdem konnte in einer indirekten Immunfluoreszenz von Myc-SR exprimierenden COS7-Zellen mit einem Pericentrin (Pc) spezifischen polyklonalen Antikörper (pAb Pc-4448) und einem monoklonalen Myc Antikörper (mAb 9E19) gezeigt werden, dass Myc-SR an beiden Zentriolen des MTOCs/Zentrosoms lokalisiert (Abb. 3.1.2; Pfeilspitzen in B-B'').

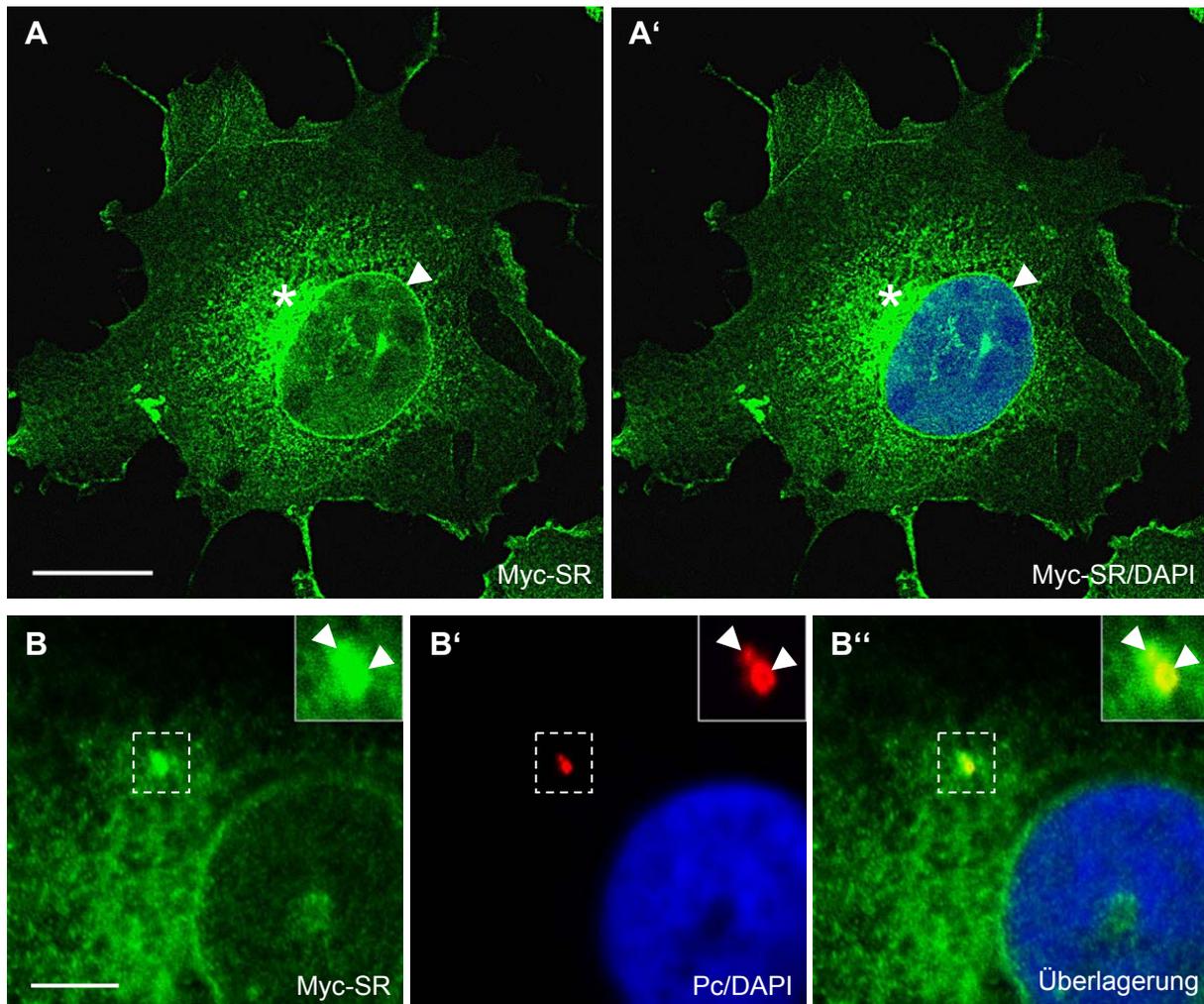


Abb. 3.1.2: Lokalisierung des KASH-Domänen defizienten Nesprin-2 SR in COS7-Zellen. (A, A') Indirekte Immunfluoreszenzanalyse mit einem Myc spezifischen monoklonalen Antikörper (mAb 9E10), von Myc-SR transfizierten COS7-Zellen (die Permeabilisierung erfolgte nach der Fixierung; sekundärer Antikörper anti-Maus Alexa 488 Konjugat). Nuklei wurden mit DAPI gefärbt. Die Pfeilspitze kennzeichnet die Lokalisation von Myc-SR entlang der nukleären Membran, während der Stern die zytoplasmatische Anreicherung des Fusionsproteins nahe der Kernhülle markiert. Balken: 20 μm . (B-B'') Myc-SR transfizierte COS7-Zellen wurden vor der Fixierung permeabilisiert, um den zytoplasmatischen Hintergrund zu reduzieren. Kofärbung mit mAb 9E10 und einem Pericentrin (Pc) spezifischen polyklonalem Antikörper (pAb Pc-4448). Als sekundäre Antikörper wurden anti-Kaninchen Alexa 568- sowie anti-Maus Alexa 488-Konjugate verwendet. Myc-SR kolokalisiert mit Pericentrin an den Zentriolen (Pfeilspitzen in B-B''). Balken: 5 μm .

Um potentielle Interaktionspartner von Nesprin-2 SR zu identifizieren, die das Protein an die Kernmembran und an das Zentrosom rekrutieren, wurde SR mit einer Gal4-DNA-Bindungsdomäne (Gal4-DNA-BD) fusioniert. Dieses SR-Fusionsprotein (BD-SR) wurde für eine humane Gehirn-spezifische Hefe-Zwei-Hybrid cDNA-Bank Durchmusterung als Köderprotein verwendet.

3.1.1 KLC1, ein neuer Partner von Nesprin-2

Mittels der Hefe-Zwei-Hybrid Durchmusterung (Schneider, 2005) konnten 18 unabhängige Klone, die für die leichten Ketten des Kinesin 1 (KLC1) kodieren, als Bindepartner für Nesprin-2 SR isoliert und identifiziert werden. Zur Überprüfung der KLC1/Nesprin-2-Assoziation erfolgte eine erneute Koexpression eines zu Beginn isolierten KLC1 Klons (AD-KLC1¹³⁸⁻⁵⁶⁰) mit BD-SR in Hefen (Abb. 3.1.3). Bei der wiederholt durchgeführten Hefe-Zwei-Hybrid Bindungsanalyse konnte eine Interaktion zwischen KLC1 und Nesprin-2 SR bestätigt werden.



Abb. 3.1.3: KLC1 interagiert mit Nesprin-2 SR. Wachstum der koexprimierenden BD-SR/AD bzw. BD-SR/AD-KLC1¹³⁸⁻⁵⁶⁰ AH109 Hefezellen auf SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade Selektionsplatten. BD-SR/AD-KLC1¹³⁸⁻⁵⁶⁰ exprimierende Hefezellen zeigen ein deutliches Wachstum, während die Negativ-Kontrolle (BD-SR/AD) aufgrund von Histidin- und Adenin-Mangel kein Wachstum aufweist (linkes Bild). X-Gal behandelte Filterabdruck (rechtes Bild). BD-SR/AD-KLC1¹³⁸⁻⁵⁶⁰ koexprimierende Hefen lassen nach 8 Stunden eine intensive Blaufärbung im β-Galaktosidasetest und somit eine Protein-Protein-Interaktion *in vivo* erkennen.

3.1.1.1 Eingrenzung der Interaktionsdomänen *in vivo*

Insgesamt konnten 4 unterschiedlich lange Klone identifiziert werden, die für KLC1 kodierten (Abb. 3.1.4 A). Einer der Klone enthält die gesamte kodierende Sequenz von KLC1, während ein anderer den Bereich von Aminosäure (AS) 1-384 umfasst. Die weiteren Klone kodieren für die AS 138-560 und für die AS 215-560. Diese Ergebnisse erlauben eine Eingrenzung des KLC1-Bereiches, der mit Nesprin-2 SR interagiert, auf eine Länge von 169 AS. Der mit Nesprin-2 SR interagierende Abschnitt der KLC1-Sequenz umfasst folglich einen großen Bereich der KLC1 TPR-Domäne von AS 215-384 (TPR1, AS 213-246; TPR2, AS 255-288; TPR3, AS 297-330; TPR4, AS 339-372; TPR5, AS 381-414; TPR6, AS 464-497). Darüber hinaus konnten zwei divergente KLC1 Isoformen, die sich in ihrer carboxyterminalen Aminosäuresequenz unterscheiden, identifiziert werden. Dabei handelt es sich um die KLC1, Isoform 1 (Kinesin 2 60/70 kDa) sowie das KLC1B. In den folgenden Analysen wurde jedoch nur die KLC1, Isoform 1 (NP_005543), die sich in 16 der 18 Klone nachweisen ließ, untersucht.

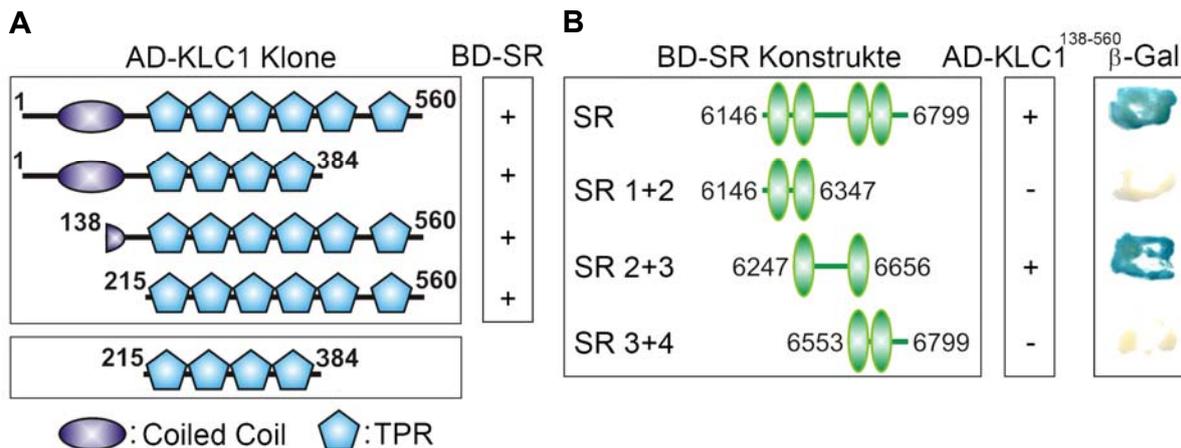


Abb. 3.1.4: Eingrenzung der KLC1/Nesprin-2 SR Interaktionsdomänen mittels des Hefe-Zwei-Hybrid Systems. (A) Schematische Darstellung der verschiedenen KLC1 Klone, die mittels des Köderproteins BD-SR im Rahmen der Hefe-Zwei-Hybrid Durchmusterung isoliert und identifiziert werden konnten. Jeder KLC1 Klon zeigt nach Koexpression mit BD-SR ein positives X-Gal-Signal (+) und somit eine Assoziation *in vivo*. Der mit BD-SR interkalierende Bereich des KLC1 konnte somit auf die Aminosäuren 215-384 der TPR-Region eingegrenzt werden. (B) Die Abbildung repräsentiert die Einengung der Nesprin-2 SR Bindungsdomäne mittels des Hefe-Zwei-Hybrid Systems *in vivo*. Kotransformierte Hefezellen die BD-SR 2+3/AD-KLC1¹³⁸⁻⁵⁶⁰ koexprimieren, lassen wie die Positiv-Kontrolle (BD-SR/AD-KLC1¹³⁸⁻⁵⁶⁰) eine Interaktion (+) mit Hilfe des β -Galaktosidasetest erkennen, wohingegen in Hefezellen, die BD-SR 1+2/AD-KLC1¹³⁸⁻⁵⁶⁰ bzw. BD-SR 3+4/AD-KLC1¹³⁸⁻⁵⁶⁰ koexprimieren, keine X-Gal spezifische Blaufärbung (-) dokumentiert werden konnte.

Für die Einengung des Nesprin-2 SR Interaktionsbereichs wurden drei weitere spezifische Hefekonstrukte hergestellt (BD-SR 1+2, BD-SR 2+3 und BD-SR 3+4), die unterschiedliche Teilfragmente von SR einschließen. Dabei erfolgte die Fusion der Gal4-DNA-BD mit AS 6.146-6.347 (SR 1+2), AS 6.247-6.656 (SR 2+3) und AS 6.553-6.799 (SR 3+4) des Nesprin-2 Giant. In einer Hefe-Zwei-Hybrid Interaktionsstudie wurden diese Nesprin-2 SR spezifischen Fusionsproteine mit dem AD-KLC1¹³⁸⁻⁵⁶⁰ Klon koexprimiert (Abb. 3.1.4 B). Anhand dieser Studie erfolgte eine Eingrenzung des Interaktionsbereiches auf die TPR-Domänen des KLC1 und Nesprin-2 SR 2+3.

3.1.1.2 Einengung und Verifizierung der Bindungsdomänen *in vitro*

Die Einengung und die Verifizierung des Nesprin-2 SR Interaktionsbereichs *in vitro* erfolgte mittels der GST-(Glutathion-S-Transferase) Bindungsanalyse. Für diesen Ansatz wurden die Bindungen verschiedener GST-SR Fusionsproteine (SR 1, 38 kDa; SR 2, 38 kDa; SR 2-3, 49 kDa; SR 1+2, 50 kDa; SR 2+3, 72 kDa und SR 3+4, 51 kDa; Abb. 3.1.5 A) mit dem Vollängen KLC1 (AS 1-560) als GFP-Fusion (GFP-KLC1, 91 kDa) überprüft (Abb. 3.1.5 B). Gluthation-Agarose (Beads) und GST (26 kDa) wurden in dieser Proteinbindungsanalyse als Negativ-Kontrolle verwendet. Die unterschiedlichen GST-SR Fusionsproteine wurden mit COS7-Zelllysaten, welche GFP-KLC1 transient exprimieren, inkubiert und präzipitiert. Anschließend wurde im Präzipitat mit einem GFP spezifischen

monoklonalen Antikörper (mAb K3-184-2) das GFP-KLC1 Fusionsprotein nachgewiesen (Abb. 3.1.5 B). Diese *in vitro* Interaktionsstudie zeigt eine schwache Assoziation von KLC1 mit SR 2 und SR 1+2. Ein starkes GFP-KLC1 Signal wurde jedoch für SR 2-3 und SR 2+3 detektiert (s. Abb. 3.1.5 B).

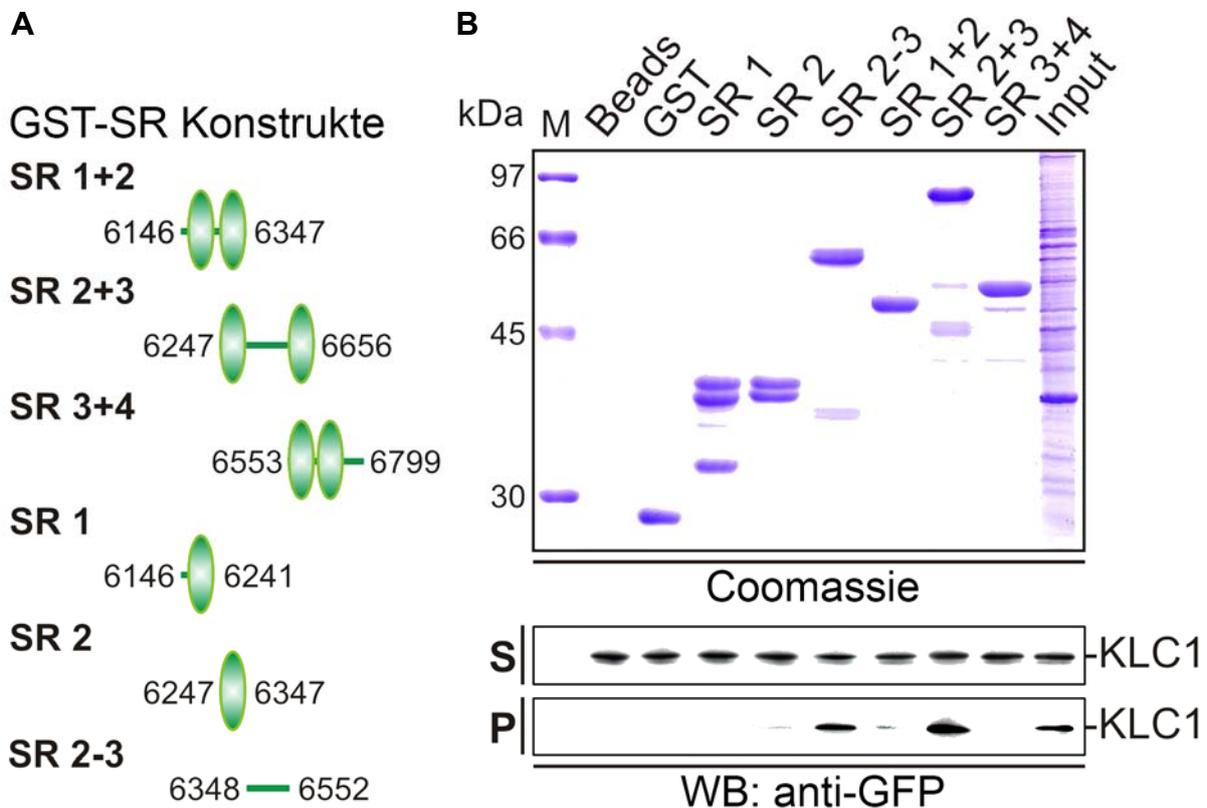


Abb. 3.1.5: Eingrenzung der Nesprin-2 SR Bindungsdomäne *in vitro*. (A) Schematische Illustration der GST-SR Konstrukte, die für die Eingrenzung des Nesprin-2/KLC1 Interaktionsbereiches eingesetzt wurden. (B) GST-Bindungsanalyse zur Untersuchung der Interaktion der verschiedenen GST-SR Fusionsproteine mit GFP-KLC1. Präzipitate (P) und Überstände (S) wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Westernblots, die mit einem GFP spezifischen monoklonalen Antikörper (mAb K3-184-2) inkubiert wurden, zeigen eine Präzipitation des GFP-KLC1 mittels der GST-Fusionen SR 2-3, SR 2+3 (starke GFP-Signale) sowie SR 2 und SR 1+2 (schwache GFP-Signale). Eine Westernblotanalyse der Überstände sowie eine Coomassie Färbung wurde als Kontrolle angefertigt und zeigen die Auftragung gleichwertiger Proteinmengen. Es erfolgte eine Eingrenzung des mit KLC1 interagierenden Bereiches auf SR 2 und SR 2-3.

Um die Bindungsdomäne des KLC1 weiterhin zu verifizieren wurden GST-KLC1 Fusionsproteine generiert. Mittels dieser GST-Fusionen (KLC1, 90 kDa; KLC1 NT, 50 kDa; KLC1 T1-4, 44 kDa; KLC1 T1-6, 58 kDa und KLC1 CT, 65 kDa; Abb. 3.1.6 A) erfolgte eine GST-Präzipitation (Abb. 3.1.6 B), des an GFP fusionierten Nesprin-2 SR (GFP-SR, 102 kDa). Transient transfizierte GFP-SR COS7-Zelllysate wurden mit den GST-KLC1 Fusionen inkubiert und pelletiert. Zum Nachweis des GFP-SR im GST-Komplex erfolgte die Detektion des GFP-Fusionsproteins mit einem mAb K3-184-2. SR konnte nur durch GST-KLC1 Fusionen, die die TPR-Region involvieren, präzipitiert

werden (Abb. 3.1.6 B). Gluthation-Agarose (Beads) und GST wurden als Negativ-Kontrollen verwendet. Aufgrund der übereinstimmenden *in vivo* und *in vitro* Bindungsanalysen konnte eine Assoziation von Nesprin-2 SR 2 bzw. SR 2-3 (AS 6.247-6.552 des Nesprin-2 Giant) mit den TPR-Domänen des KLC1 nachgewiesen werden.

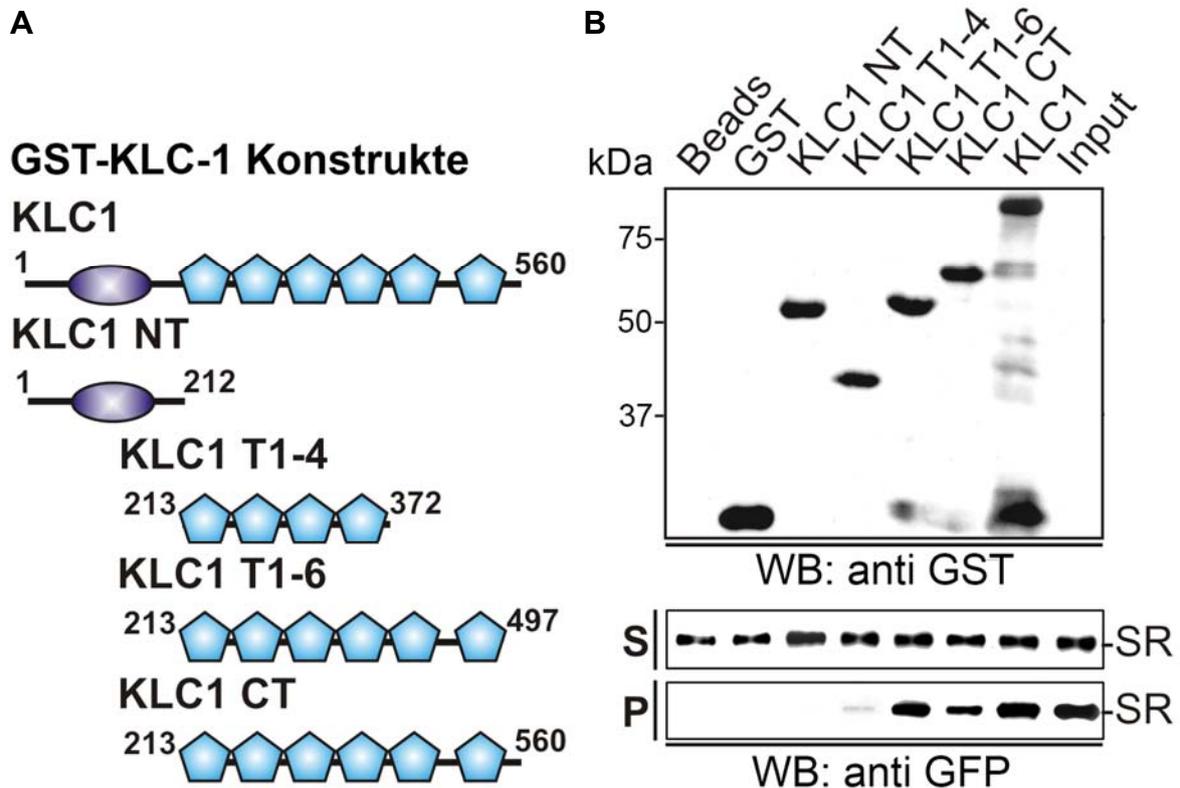


Abb. 3.1.6: Eingrenzung der KLC1 Bindungsdomäne *in vitro*. (A) Domänenstruktur der unterschiedlichen GST-KLC1 Fusionsproteine, die in der *in vitro* Bindungsanalyse verwendet wurden. (B) GST-Präzipitation, zur Verifizierung der Bindungsdomäne, der GST-KLC1 Konstrukte mit GFP-SR. GST-Komplexe (P; Präzipitat) und Überstände (S) wurden mittels SDS-PAGE getrennt und geblottet. Mit einem GST spezifischen polyklonalen Antikörper erfolgte die Detektion der GST-KLC1 Fusionen (gezeigt sind äquivalente Proteinmengen). Die Überstände der GST-Komplexe wurden als Kontrolle mit einem GFP spezifischen mAb K3-184-2 behandelt. Präzipitate, die mit mAb K3-184-2 behandelt wurden, lassen eine Assoziation des SRs mit KLC1 T1-4 (schwaches Signal), KLC1 T1-6 und CT (starke Signale) erkennen. Nesprin-2 bindet demzufolge an die TPR-Region des KLC1.

3.1.2 Ektopische Koexpression und Kolo-kalisation der KLC1 und Nesprin-2 SR Fusionsproteine in COS7-Zellen

Um eine potentielle Kolo-kalisation von KLC1 und Nesprin-2 SR Fusionsproteinen zu prüfen, erfolgte jeweils eine transiente Koexpression der GFP-SR und Myc-KLC1 sowie der GFP-KLC1 und Myc-SR Fusionen in COS7-Zellen (Abb. 3.1.7). Zur Detektion der Myc-markierten Fusionsproteine wurde in indirekten Immunfluoreszenzanalysen ein mAb 9E10 eingesetzt. Das Nesprin-2 SR markierte GFP-Fusionsprotein weist ein vergleichbares Expressionsmuster entlang der Kernmembran (Abb. 3.1.7; Pfeilspitze in A) und im Zytoplasma nahe dem Nukleus auf (Abb. 3.1.7; Stern in A), so wie es für das

Myc-SR Fusionprotein in Abb. 3.1.2 beschrieben wurde. Außerdem konnte eine Färbung an der Plasmamembran beobachtet werden (Abb. 3.1.7; Pfeil in A).

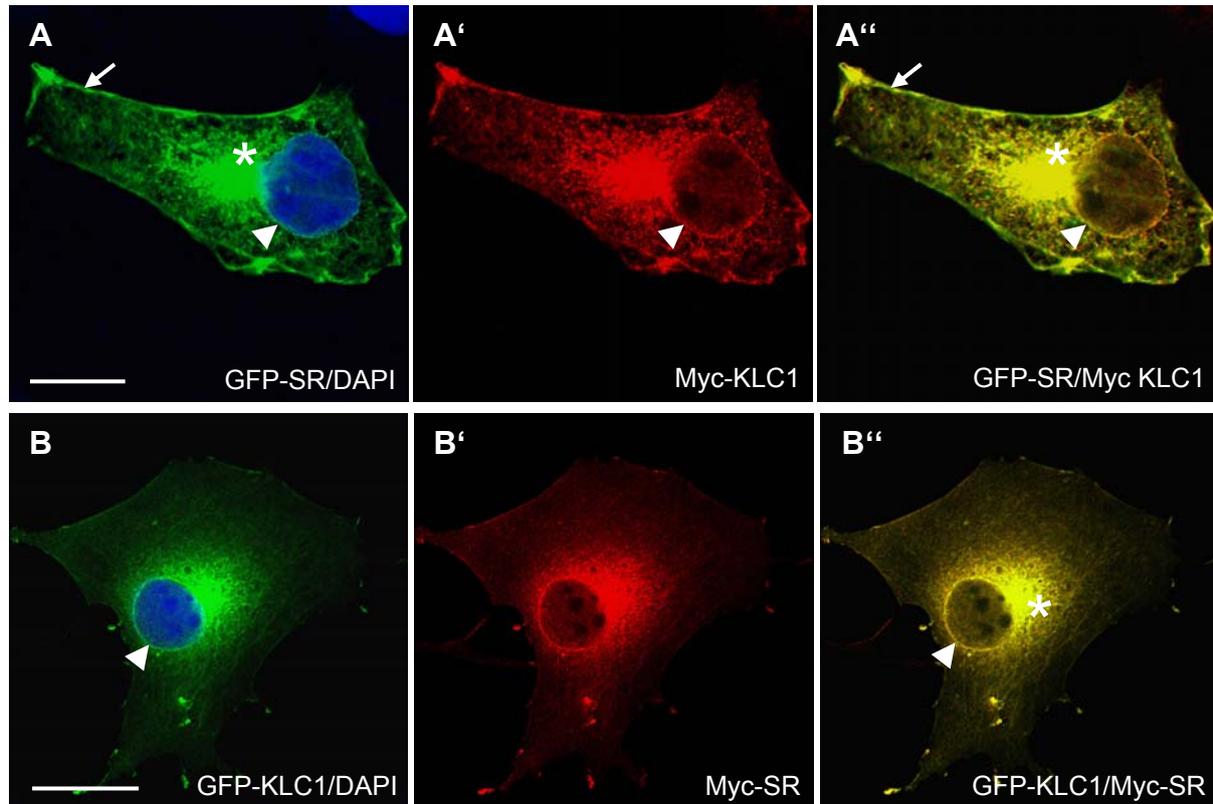


Abb. 3.1.7: Ektopisch exprimierte Nesprin-2/KLC1 Fusionsproteine kolokalisieren in COS7-Zellen. COS7-Zellen wurden transient mit GFP-SR und Myc-KLC1 (A-A'') sowie mit GFP-KLC1 und Myc-SR (B-B'') transfiziert. Indirekte Immunfluoreszenz der Myc-markierten Fusionen mit mAb 9E10 (A' und B'; sekundärer Antikörper anti-Maus Alexa 568-Konjugat). Färbung der Nuklei mit DAPI. GFP-SR konnte an der Kernhülle (Pfeilspitze in A), im Zytoplasma nahe dem Nukleus (Stern in A) und an der Plasmamembran (Pfeil in A) nachgewiesen werden. Myc- und GFP-markiertes KLC1 lokalisiert entlang der Kernmembran (Pfeilspitzen in A' und B). Korrespondierende Überlagerung der Nesprin-2 und KLC1 Fusionsproteine entlang der nukleären Membran (Pfeilspitze in A'' und B''), im Zytoplasma (überwiegend nahe dem Nukleus; Stern in A'' und B'') und an der Zellperipherie (Pfeil in A''). Balken: 20 µm.

Die bisherige Literatur behandelt KLC1 stets als ein zytoplasmatisches Protein (Stenoien und Brady, 1997). Die Transfektionsstudien in Abb. 3.1.7 lassen jedoch ein weitaus komplexeres Lokalisationsmuster für KLC1 in COS7-Zellen erkennen. KLC1 weist eine vollkommen neue, noch nicht beschriebene subzelluläre Lokalisierung entlang der Zellkernmembran auf (Abb. 3.1.7; Pfeilspitze in A' und B) und kolokalisiert dort mit Nesprin-2 SR (Abb. 3.1.7; Pfeilspitze in A'' und B''). Zusätzlich wurde eine Überlagerung der Nesprin-2 SR und KLC1 Fusionsproteine im Zytoplasma (sehr prominent nahe dem Zellkern; Abb. 3.1.7; Stern in A'' und B'') und an der Zellperipherie beobachtet (Abb. 3.1.7; Pfeil in A'').

Darüber hinaus konnte mittels der an GFP-fusionierten, Nesprin-2 Bindungsdomänen (GFP-SR 2+3 und GFP-SR 2-3), die mit KLC1 assoziieren, eine weitere Kolokalisationsstudie durchgeführt werden. Es erfolgte jeweils eine Kotransfektion von GFP-SR 2+3/Myc-KLC1 (Abb. 3.1.8 A) bzw. GFP-SR 2-3/Myc-KLC1 (Abb. 3.1.8 B) in COS7-Zellen. Sowohl das GFP-SR 2+3 als auch das GFP-SR 2-3 Fusionsprotein weisen eine schwache Anreicherung entlang der Kernhülle auf (Vergrößerung in Abb. 3.1.8 A und B; Pfeilspitze). Dabei zeigte sich ebenso eine Kolokalisation des eingegrenzten Nesprin-2 Bindungsbereiches mit KLC1 an der Kernmembran (Abb. 3.1.8; Pfeilspitzen), im Zytoplasma (Abb. 3.1.8; Stern) und an der Zellperipherie (Abb. 3.1.8; Pfeile). Diese Ergebnisse bestätigen die Daten der *in vivo* und *in vitro* Interaktionsanalysen.

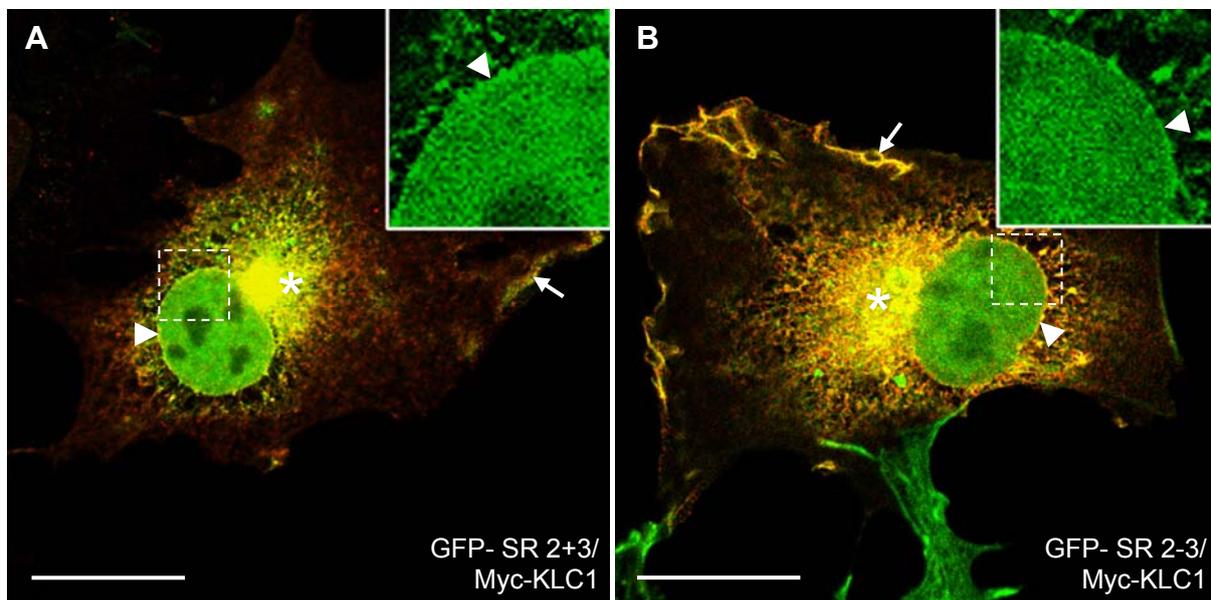


Abb. 3.1.8: Die Nesprin-2 SR 2+3 und SR 2-3 Peptide kolokalisieren mit KLC1 in kotransfizierten COS7-Zellen. Indirekte Immunfluoreszenz an (A) GFP-SR 2+3/Myc-KLC1 und (B) GFP-SR 2-3/Myc-KLC1 koexprimierenden COS7-Zellen. Myc-KLC1 wurde mit mAb 9E10 nachgewiesen, als sekundärer Antikörper wurde anti-Maus Alexa 568-Konjugat verwendet. GFP-SR 2+3 (A) und GFP-SR 2-3 (B) konnten im Zellkern und entlang der Kernhülle detektiert werden (Vergrößerung in A und B; Pfeilspitze) und überlappen mit Myc-KLC1 an der Kernhülle (Pfeilspitzen). Eine weitere Überlagerung wurde partiell im Zytoplasma (Sterne) und an der Zellperipherie (Pfeile) beobachtet. Balken: 20 μ m.

3.1.3 Ektopische Expression von Nesprin-2 SR beeinflusst die Lokalisation von KLC1 TPR-Fusionsproteinen

In den bisherigen Hefe-Zwei-Hybrid und biochemischen Interaktionsstudien konnte gezeigt werden, dass Nesprin-2 SR mit den TPR-Domänen des KLC1 assoziiert. Um die subzelluläre Lokalisation des interagierenden Bereichs von KLC1 zu ermitteln, wurden zwei Myc-markierte KLC1-Fusionsproteine (Myc-KLC1 CT und Myc-KLC1 T1-6; s. Abb. 3.1.6 A), die für den TPR-Bereich kodieren, in COS7-Zellen überexprimiert. In indirekten Immunfluoreszenzanalysen weist jedes dieser KLC1 TPR-Fusionsproteine eine

überwiegend nukleäre Lokalisation auf (s. Abb. 3.1.9; Pfeil in A und C). Zur weiteren Überprüfung der Interaktion wurden die KLC1 TPR-Konstrukte mit GFP-SR in COS7-Zellen kotransfiziert und ihre Kolokalisation überprüft. Die Koexpression des GFP-SR (Abb. 3.1.9 B' und D') führte zu einer Umlagerung der KLC1 TPR-Proteine aus dem Zellkern in das Zytosol und zu einer Anreicherung an der Kernhülle (Abb. 3.1.9; Pfeilspitzen in B und D), wo sie mit GFP-SR überlagern (Abb. 3.1.9 B'' und D'').

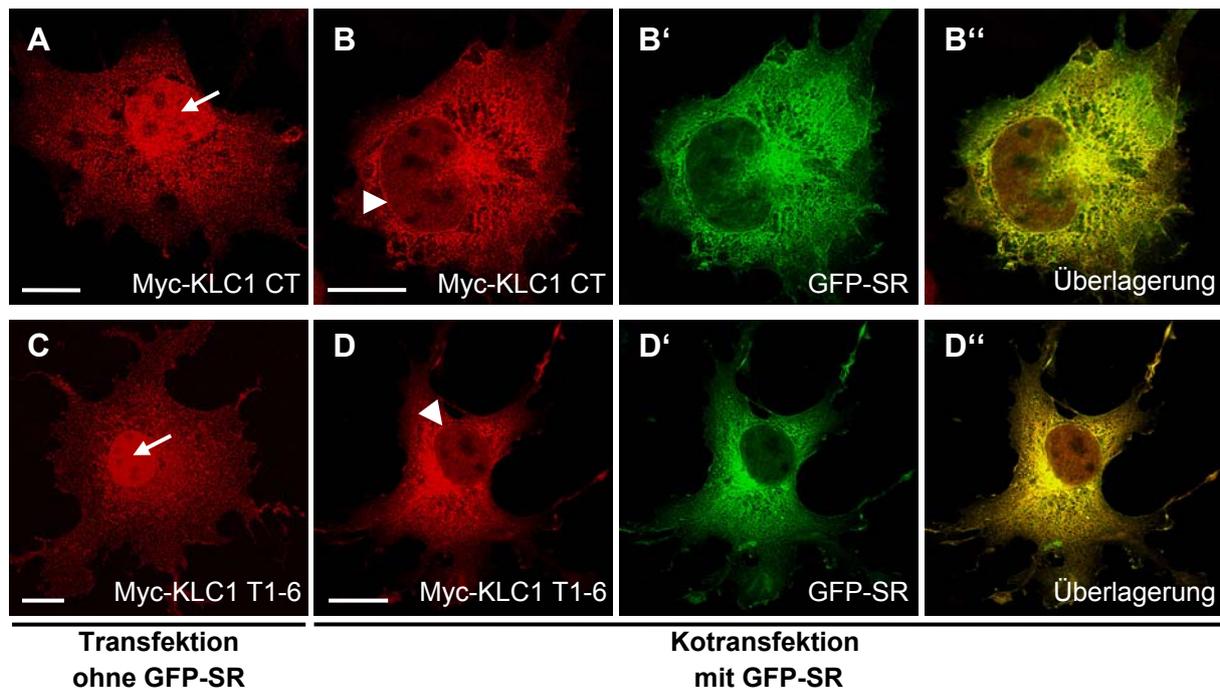


Abb. 3.1.9: Überexprimiertes Nesprin-2 SR beeinflusst die Lokalisation von KLC1 TPR-Fusionsproteinen. Ektopisch exprimierte Myc-KLC1 CT (A) und Myc-KLC1 T1-6 (C) Fusionen, die mit dem Myc-Epitop spezifischen mAb 9E10 nachgewiesen wurden (sekundärer Antikörper anti-Maus Alexa 568-Konjugat), zeigen in COS7-Zellen neben einer zytoplasmatischen Lokalisation eine Anreicherung im Zellkern (A und C; Pfeil). Die Koexpression mit GFP-SR (B' und D') bewirkt eine Relokalisation von Myc-KLC1 CT und Myc-KLC1 T1-6 aus dem Zellkern in das Zytosol und führt zu einer Anreicherung an der Kernmembran (B und D; Pfeilspitze), wo sie mit GFP-SR überlagern (B'' und D''). Balken: 20 μ m.

3.1.4 KLC1 ein neues Kernhüllen-assoziiertes Protein

3.1.4.1 Ektopisch exprimiertes Nesprin-2 SR führt zu keiner Umverteilung des endogenen KLC1 entlang der Kernmembran

Die Verteilung des endogenen KLC1 und ein möglicher Einfluss von Nesprin-2 SR auf die subzelluläre Lokalisation des KLC1 wurde in COS7-Zellen mit einem KLC1 spezifischen polyklonalen Antikörper untersucht (Abb. 3.1.10). COS7-Zellen zeigen eine gleichmäßige Verteilung des endogenen KLC1 an der Kernmembran (Abb. 3.1.10; Pfeilspitzen in B). Zusätzlich weist das endogene Protein eine zytoplasmatische Lokalisierung und eine Anreicherung nahe des Zellkerns auf (Abb. 3.1.10 B; Sterne). Es konnte somit für das endogene KLC1 wie auch für das ektopisch exprimierte Protein

(Abb. 3.1.7) eine identische subzelluläre Verteilung beobachtet werden. GFP-Nesprin-2 SR exprimierende Zellen zeigen eine vergleichbare Färbung für KLC1 und eine Kolokalisation an der Kernhülle (Abb. 3.1.10; Pfeilspitzen in C) sowie partiell im Zytosol (Abb. 3.1.10; Stern in C).

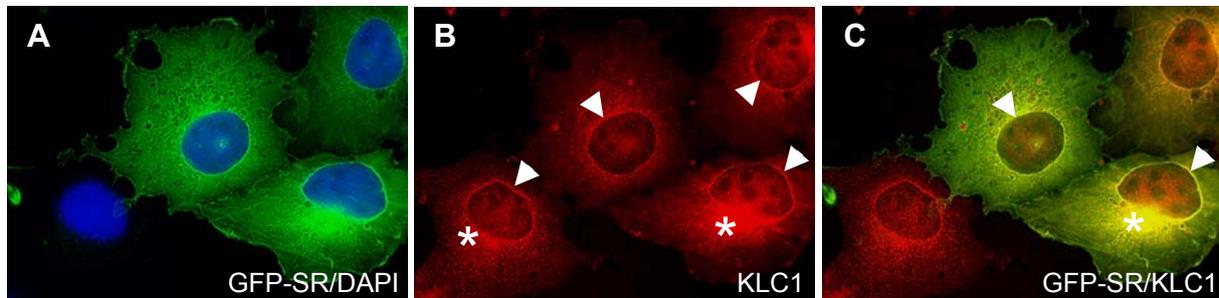


Abb. 3.1.10: Die Kernmembran-spezifische Lokalisation des endogenen KLC1 wird nicht durch die Überexpression von Nesprin-2 SR beeinträchtigt. Indirekte Epifluoreszenzmikroskopie von GFP-Nesprin-2 SR transfizierten COS7-Zellen (A) mit einem KLC1 spezifischen polyklonalen Antikörper pAb KLC1 (H-75) (B). Der Nachweis des primären Antikörpers erfolgte mit Hilfe eines sekundären anti-Kaninchen Alexa 568 Fluor-gekoppelten Antikörpers. Endogenes KLC1 lokalisiert sowohl in GFP-SR überexprimierenden als auch in nicht transfizierten COS7-Zellen an der Kernhülle (B; Pfeilspitzen) und im Zytoplasma nahe des Nukleus (B; Stern). Zusätzlich konnte eine Kolokalisation von GFP-SR und KLC1 an der Kernmembran (C; Pfeilspitzen) und partiell im Zytosol (C; Stern) nachgewiesen werden. Die Verteilung des endogenen KLC1 wird nicht durch die ektopische Expression von SR beeinflusst. Balken: 20 μ m.

Diese Daten beschreiben erstmalig für KLC1 eine Anreicherung an der Kernhülle. Um diese Lokalisation und eine *in vivo* Assoziation mit Nesprin-2 zu bestätigen, wurden verschiedene Zelllinien und Gewebe mittels der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. HaCaT-Zellen (humane Keratinozyten-Zelllinie), die große Mengen des Nesprin-2 Giant exprimieren, und NIH-3T3-Zellen (murine Fibroblasten-Zelllinie) wurden mit einem KLC1 spezifischen polyklonalen Antikörper und Nesprin-2 spezifischen monoklonalen Antikörpern (mAb K20-478 und mAb K56-386; s. Abb. 3.1.1) gefärbt. Sowohl in HaCaT-Zellen als auch in NIH-3T3-Zellen wurde das endogene KLC1 entlang der Kernmembran detektiert (Abb. 3.1.11; Pfeile in A' und B'). Die Überlagerung der Fluoreszenzsignale zeigt darüber hinaus die Kolokalisation von KLC1 mit Nesprin-2 entlang der Kernhülle (Abb. 3.1.11; Pfeile in A'' und B'').

Aufgrund der hohen Expression des KLC1 im Kleinhirn (*Cerebellum*) erfolgte zusätzlich eine immunhistochemische Analyse des murinen Kleinhirns mit mAb K56-386 und pAb KLC1 (H-75) Antikörpern. Auch im Gehirn konnten KLC1 und Nesprin-2 jeweils in der Körnerschicht (*Stratum granulosum*, Sg) sowie in der molekularen Schicht (*Stratum moleculare*, Sm) an der Kernmembran erfasst werden (Abb. 3.1.11; Pfeile in C-C'').

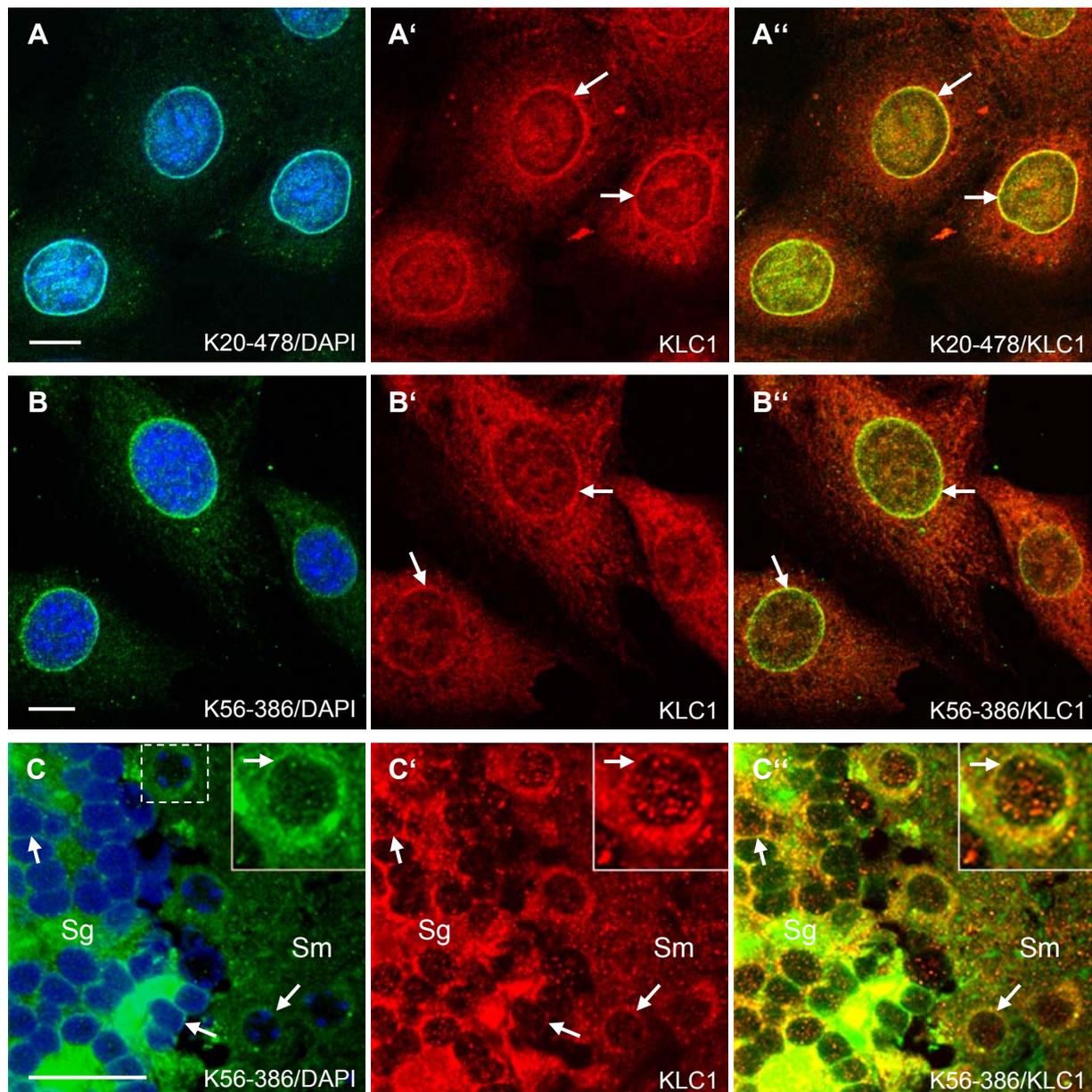


Abb. 3.1.11: Endogene Nesprin-2 und KLC1 Proteine kolokalisieren an der Zellkernmembran in HaCaT- und NIH-3T3-Zellen sowie im murinen Kleinhirn. (A-A'') Indirekte immunhistochemische Färbung von einer humanen Keratinozyten-Zelllinie (HaCaT) mit dem Nesprin-2 spezifischen mAb K20-478 und mit pAb KLC1 (H-75). Balken: 10 μ m. (B-B'') Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie an einer Maus Fibroblasten-Zelllinie (NIH-3T3) mit dem Nesprin-2 spezifischen mAb K56-386 und pAb KLC1 (H-75). Färbung der Nuklei mit DAPI. Balken: 10 μ m. (C-C'') Gefrierschnitte des Kleinhirns der Maus (mit freundlicher Unterstützung von Dr. Paul Shazot). Zum Nachweis der endogenen Proteine wurden die Antikörper mAb K56-386 und pAb KLC1 (H-75) verwendet. Sg, Körnerschicht (*Stratum granulosum*), Sm, die Molekularschicht (*Stratum moleculare*). Balken: 20 μ m. Als sekundäre Antikörper wurden anti-Kaninchen Alexa 568- sowie anti-Maus Alexa 488-Konjugate verwendet. Pfeile kennzeichnen die Kernhüllen-spezifische Lokalisation sowie die Überlagerung des KLC1 und Nesprin-2.

Ferner erfolgte eine indirekte Immunfluoreszenzanalyse an der murinen Muskelspindel, mit einem Synaptophysin spezifischen monoklonalen Antikörper (mAb SY 38) und pAb KLC1 (H-75) (mit freundlicher Unterstützung von Dr. Fiona Shenton). In Regionen der muskulären Spindel, an denen die afferenten sensiblen Nervenfasern den Muskel

berühren, kommt es zu einer Ansammlung von Zellkernen (Matthews, 1981). Entlang dieser Zellkerne konnte KLC1 an der Kernmembran detektiert werden (Abb. 3.1.12; Pfeilspitzen in B' und C'). Diese Daten weisen auf eine Zelltyp- sowie Gewebetyp-unabhängige Verteilung des endogenen KLC1 entlang der Kernmembran hin.

Synaptophysin, ein Protein, das die neuronalen Synapsen an den Muskelspindeln markiert, zeigt zudem in der Überlagerung der Fluoreszenzsignale eine Kollokalisierung mit KLC1 (Abb. 3.1.12; Pfeile in C und C').

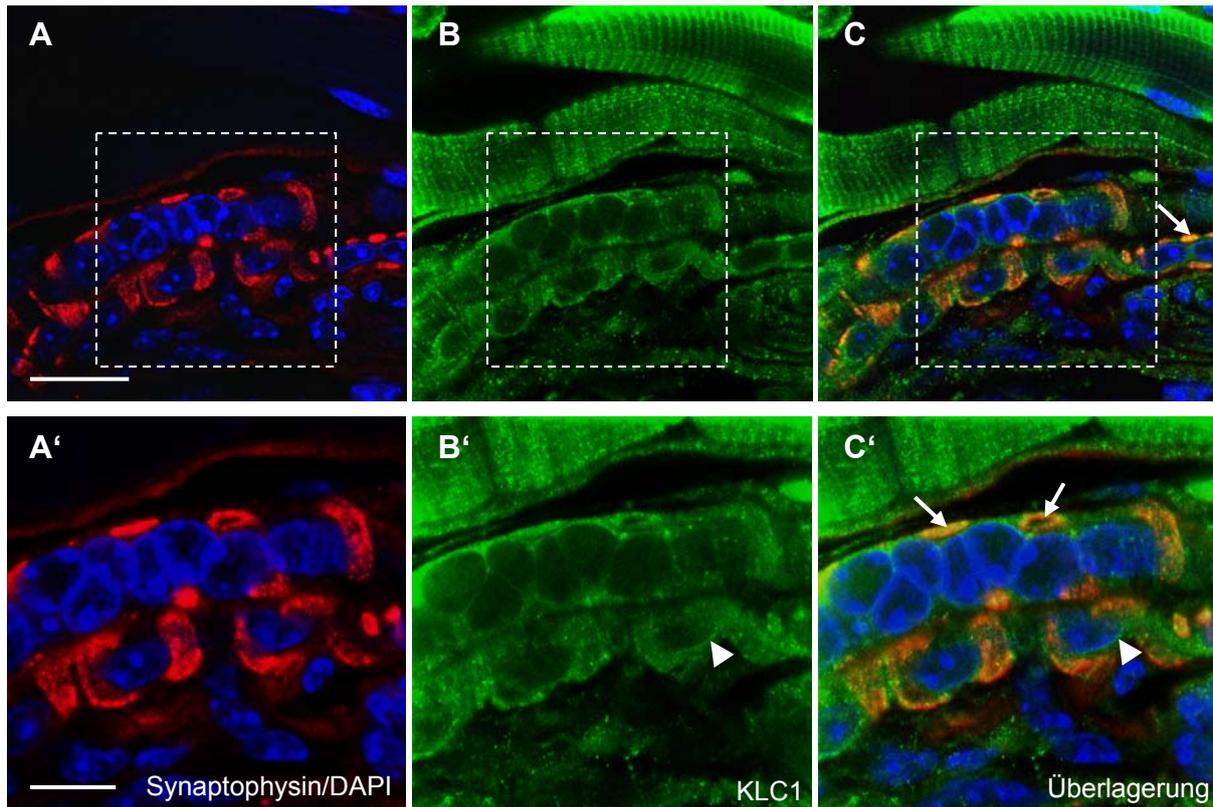


Abb. 3.1.12: Endogenes KLC1 lokalisiert entlang der Kernmembran in Muskelspindeln der Maus. (A-C) Indirekte immunhistologische Analyse von murinen Muskelspindeln mit dem Synaptophysin spezifischen mAb SY 38 (A, A') und pAb KLC1 (H-75) (B, B'). Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Balken: 20 μ m. Als sekundäre Antikörper wurden anti-Kaninchen Alexa 568- sowie anti-Maus Alexa 488-Konjugate verwendet. (A'-C') Vergrößerung der in A-C markierten Region. Balken: 10 μ m. Pfeilspitzen kennzeichnen das Kernhüllen gebundene KLC1 und Pfeile markieren die Kollokalisierung von KLC1 und Synaptophysin.

3.1.5 Nesprin-2 assoziiert via Kinesin 1 mit dem Mikrotubulizytoskelett

Bisherige Studien zeigen, dass die leichten Ketten des Kinesin 1 überwiegend zusammen mit den schweren Ketten einen funktionellen Kinesin 1 Motorkomplex formen. Um zu prüfen, ob die schweren Ketten des Kinesin 1 (KHC) eine vergleichbare Lokalisation wie KLC1 aufweisen und somit der vollständige Motorkomplex mit der Kernmembran assoziiert, wurden in COS7-Zellen GFP-KLC1 und ein Myc-markiertes KIF5B (KHC) Fusionsprotein koexprimiert und mit mAb 9E10 sowie mit dem polyklonalen

Nesprin-2 spezifischen Antikörper (pAb K1, s. Abb. 3.1.1) immunhistochemisch gefärbt (s. Abb. 3.1.13). Das ektopisch exprimierte KIF5B zeigte unabhängig von KLC1 (Daten nicht dargestellt) sowie in Koexpressionsstudien mit GFP-KLC1 eine Verteilung entlang der Kernhülle (Abb. 3.1.13; Pfeilspitze in B) und kolokalisiert mit GFP-KLC1 und Nesprin-2 an der Kernmembran (Abb. 3.1.13; Pfeilspitze in D und Vergrößerung). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Nesprin-2 über KLC1 mit den schweren Ketten des Kinesin 1 interagiert, somit den vollständigen Kinesin 1 Komplex entlang der Kernmembran bindet und dadurch mit dem Mikrotubulinnetzwerk assoziieren kann.

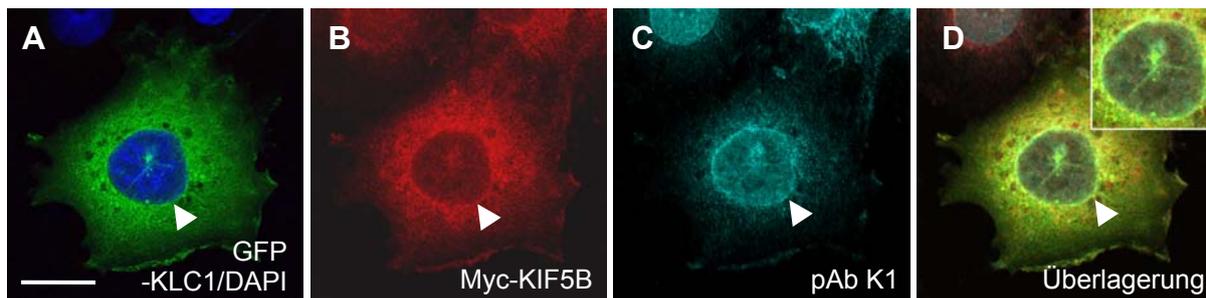


Abb. 3.1.13: Ektopisch exprimierte KLC1 und KHC (KIF5B) Fusionsproteine kolokalisieren mit Nesprin-2 an der Kernmembran. In COS7-Zellen wurden GFP-KLC1 (A) und Myc-KIF5B (schwere Kette des Kinesin 1) exprimiert und mit mAb 9E10 (B) sowie mit dem Nesprin-2 spezifischen pAb K1 (C) über die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Als sekundäre Antikörper wurden anti-Maus Alexa 568- und anti-Kaninchen Alexa 647-Konjugate verwendet. Die Pfeilspitzen in (A), (B) und (C) kennzeichnen die Lokalisation von GFP-KLC1, Myc-KIF5B und Nesprin-2 an der Kernhülle. Überexprimiertes KLC1 wie auch die schweren Ketten des Kinesin 1 zeigen eine Kolokalisation mit Nesprin-2 an der Kernmembran (Pfeilspitze in D und Vergrößerung). Färbung der Nuklei mit DAPI. Balken: 20 μ m.

Zur Bestätigung dieser Hypothese wurde in COS7-Zellen und primären Fibroblasten eine indirekte Immunlokalisationsstudie mit einem Tubulin spezifischen monoklonalen Antikörper (mAb WA3) und pAb KLC1 (H-75) durchgeführt (Abb. 3.1.14). Sowohl in COS7-Zellen als auch in primären Fibroblasten sind KLC1 und das Mikrotubulinnetzwerk rund um den Zellkern angereichert (Abb. 3.1.14; Pfeilspitzen in A, B und D, E). In Überlagerungen der KLC1 und Tubulin Fluoreszenzsignale lässt sich eine Kolokalisation entlang der Kernmembran beobachten (Abb. 3.1.14; Pfeilspitzen in C und F).

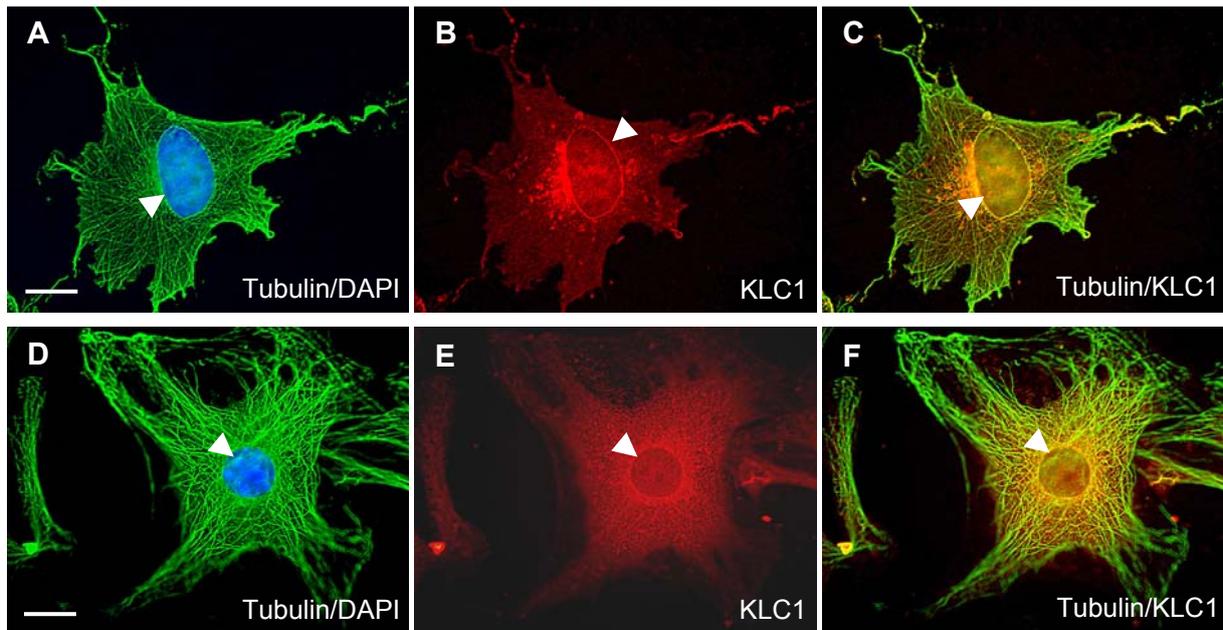


Abb. 3.1.14: Mikrotubuli und KLC1 in COS7-Zellen und primären Fibroblasten. Indirekte Epifluoreszenzmikroskopie von COS7-Zellen (A-C) und murinen primären Fibroblasten (D-F), die mit dem Tubulin spezifischen mAb WA3 (A und D; sekundärer Antikörper anti-Maus FITC-Konjugat) und pAb KLC1 (H-75) (B und E; sekundärer Antikörper anti-Kaninchen Cy3-Konjugat) gefärbt wurden. Färbung der Kerne mit DAPI. Die Pfeilspitzen in (A, B, D und E) markieren die Anreicherung von KLC1 und der Mikrotubuli am Zellkern. Die Überlagerung zeigt eine korrespondierende Verteilung von KLC1 und dem Mikrotubulinetzwerk an der Kernmembran (C und F; Pfeilspitzen). Balken 20 μm .

Um diese Hypothese zu unterstützen, erfolgte mittels verschiedener Nesprin-2 SR Fusionen (s. Abb. 3.1.5) eine GST-Bindungsanalyse der endogenen Kinesin 1 Proteine (Abb. 3.1.15 A). Aufgrund der hohen Expression des Kinesin 1 im Gehirn wurden im Rahmen dieser Interaktionsstudie murine Gewebelysate des Gehirns eingesetzt. Die Westernblotanalyse mit Gehirn-spezifischen monoklonalen KLC1 (63-90) und KHC (H2) Antikörpern zeigt eine Kopräzipitation der leichten als auch der schweren Ketten des Kinesin 1 mit Nesprin-2 SR und SR 2+3 (Abb. 3.1.15 A). Zusätzlich wurde Nesprin-2 in murinen Gewebelysaten des Gehirns mit pAb K1 immunpräzipitiert. Im Immunpräzipitat konnten C-terminale Nesprin-2 Isoformen, KLC1, KHC und Tubulin nachgewiesen werden (Abb. 3.1.15 B). Diese Ergebnisse weisen auf eine *in vitro* und *in vivo* Interaktion des Nesprin-2 mit dem gesamten Kinesin 1 Motorproteinkomplex im neuronalen Gewebe der Maus hin. Darüber hinaus konnte aufgrund des immunpräzipitierten Tubulin bewiesen werden, dass die Nesprin-2/Kinesin 1 Komplexe Tubulin enthalten.

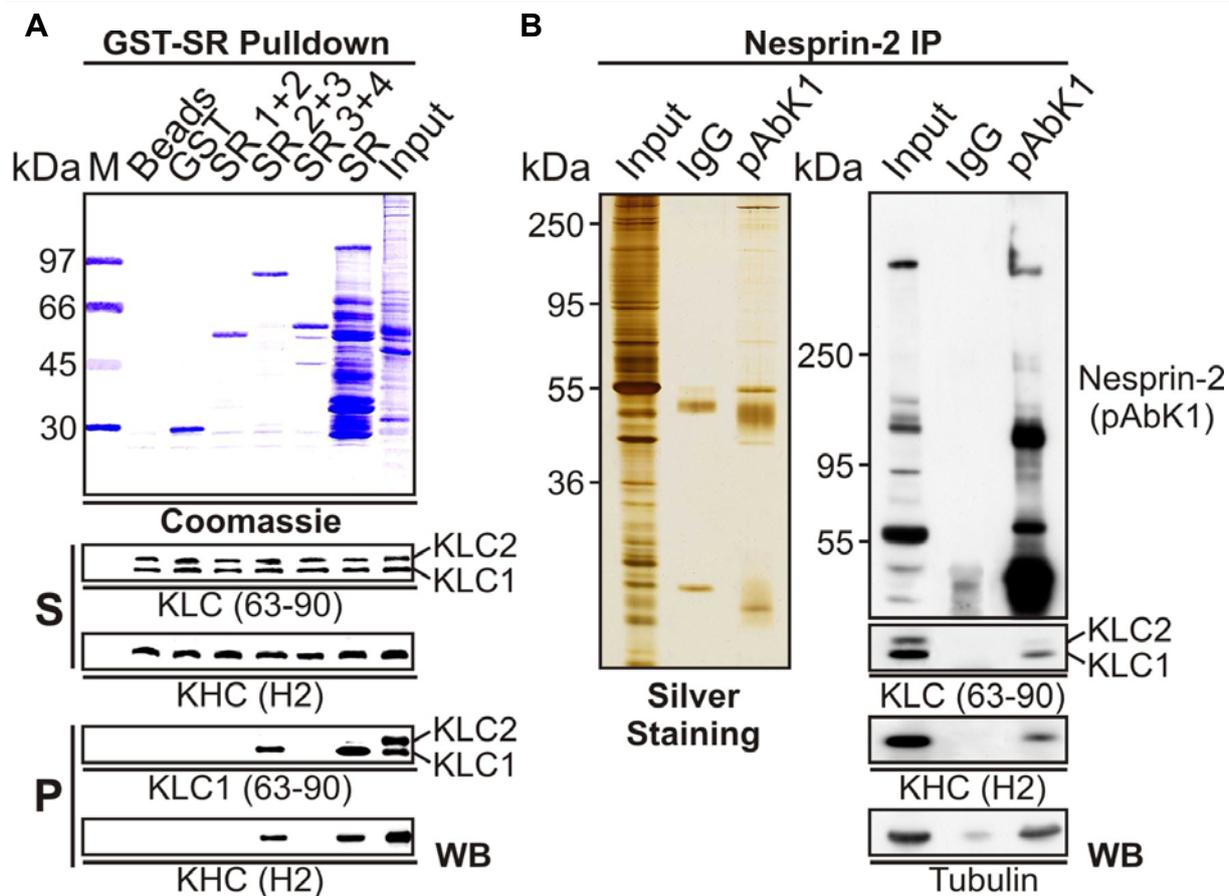


Abb. 3.1.15: Nesprin-2 assoziiert mit dem Kinesin 1 Komplex in vitro und in vivo. (A) GST-Bindungsanalyse: Verschiedene GST-Nesprin-2 SR Fusionen (s. Abb. 3.1.5 A) wurden mit murinen Gehirnlisaten inkubiert. Die GST-Präzipitate (P) und die Überstände (S) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Westernblots mit einem monoklonalen Gehirn-spezifischen KLC Antikörper (63-90) und einem monoklonalen Gehirn-spezifischen KHC Antikörper (H2) lassen eine Präzipitation des endogenen KLC1 und KHC mittels SR und SR 2+3 erkennen. Westernblots der Überstände sowie eine Coomassie Färbung wurden als Kontrolle angefertigt und zeigen äquivalente Proteinmengen. (B) Nesprin-2 Immunpräzipitation: Nesprin-2-pAb K1 Immunkomplexe aus murinem Gehirnextrakten wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Westernblots mit pAb K1, mAb KLC (63-90), mAb KHC (H2) und mAb WA3 (Tubulin) zeigen die Anwesenheit verschiedener Nesprin-2 Isoformen, des KLC1, der KHC und von Tubulin. Als Kontrolle fungierte ein mit GFP Antikörpern (IgG) immunpräzipitiertes Lysat. Die Detektion erfolgte mit dem ECL System. Eine Silberfärbung zeigt die Antikörpermengen (schwere und leichte Ketten des IgGs).

3.1.6 Mikrotubuli-unabhängige Verteilung des GFP-KLC1 entlang der Kernmembran

Aufgrund der bereits bekannten Kinesin-Mikrotubuli-Interaktion und der in Kapitel 3.1.5 dargestellten Resultate wurde geprüft, ob die KLC1-Lokalisierung an der Kernmembran Mikrotubuli-abhängig ist. Zur Ermittlung der Mikrotubuli-abhängigen bzw. -unabhängigen Verteilung des KLC1 an der Kernmembran wurden GFP-KLC1 exprimierende COS7-Zellen in einer indirekten Immunfluoreszenzanalyse mit mAb WA3 (Tubulin) gefärbt. Weiterhin wurden die Zellen mit Colchicin behandelt, um das Mikrotubulinetzwerk zu depolymerisieren. Unbehandelte Kontrollzellen zeigen eine Lokalisierung von GFP-KLC1 an der Kernmembran und lassen ein intaktes Mikrotubulizytoskelett erkennen (Abb. 3.1.16 A-A''), während in Colchicin-behandelten COS7-Zellen das Mikrotubulinetzwerk nahezu vollständig zerstört ist (Abb. 3.1.16 B' und C'). COS7-Zellen, die nach der Fixierung mit 0,5 % Triton-X-100 permeabilisiert wurden, zeigen eine diffuse Verteilung der Tubulinstrukturen im Zytoplasma. Allerdings konnten einige dieser Strukturen neben GFP-KLC1 an der Kernmembran nachgewiesen werden (Abb. 3.1.16; Pfeil in B und B'). COS7-Zellen, die vor der Fixierung mit 0,1 % Triton-X-100 permeabilisiert wurden, lassen keine Tubulinrückstände entlang der Kernmembran erkennen. Die vorgezogene Permeabilisierung hatte zur Folge, dass nahezu alle zerstörten Mikrotubulistrukturen vor der Fixierung aus dem Zytoplasma der Zelle heraus gewaschen wurden (vergleiche Abb. 3.1.16 C und C'). Die Lokalisierung von GFP-KLC1 wurde jedoch nicht beeinflusst (Abb. 3.1.16 C; Pfeil). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die subzelluläre Verteilung des GFP-KLC1 Fusionsproteins entlang der Kernmembran Mikrotubuli-unabhängig ist.

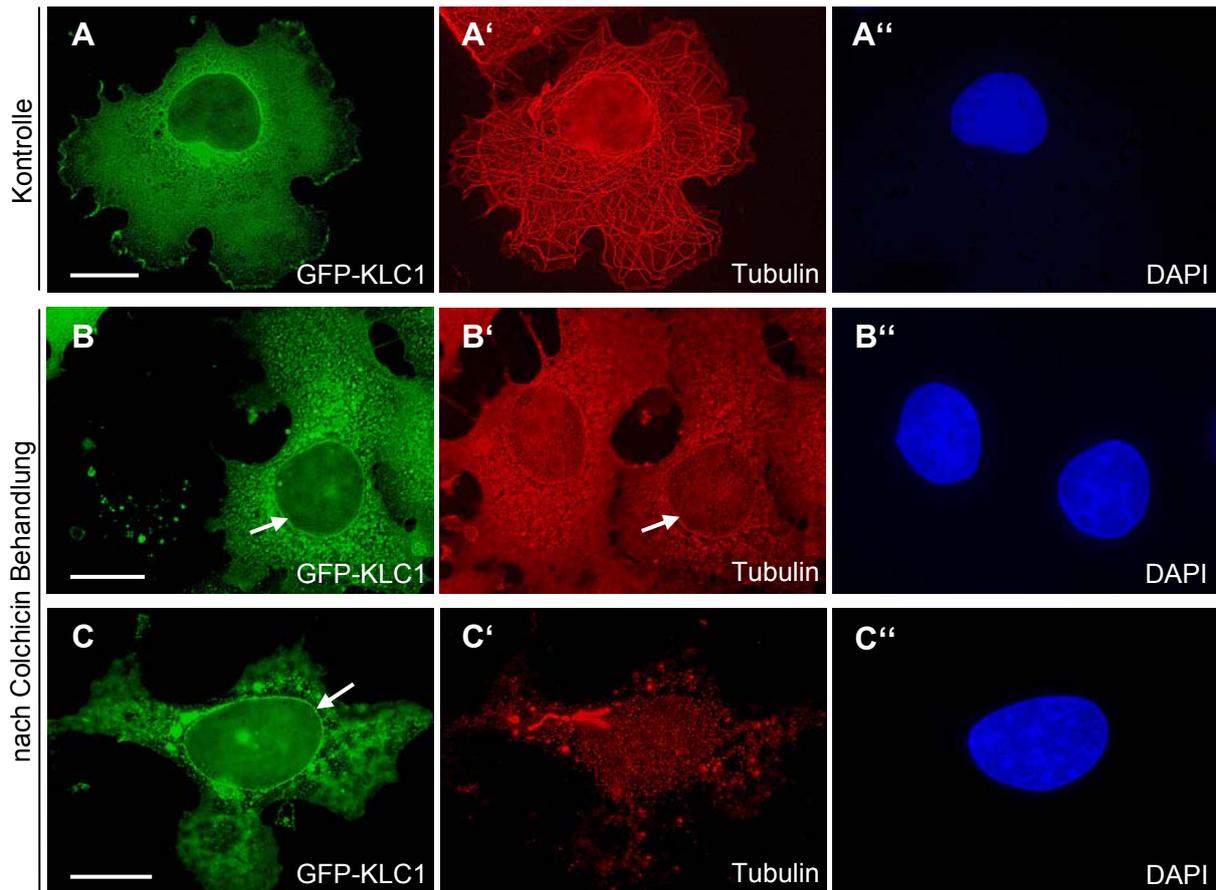


Abb. 3.1.16: Mikrotubuli-unabhängige Verteilung von GFP-KLC1 an der Kernmembran. GFP-KLC1 exprimierende COS7-Zellen wurden mit Colchicin behandelt und anschließend mit dem Tubulin spezifischen mAb WA3 angefärbt (sekundärer Antikörper anti-Maus Cy3-Konjugat). Markierung der Nuklei erfolgte mittels DAPI. (A-A'') Colchicin unbehandelte Zellen als Kontrolle. (B-B'') Colchicin behandelte Zelle, die nach der Fixierung mit 0,5 % Triton-X-100 permeabilisiert wurden. (C-C'') In Colchicin behandelte COS7-Zellen, in denen die Permeabilisierung mit 0,1 % Triton-X-100 vor der Fixierung erfolgte, konnte eine Mikrotubuli-unabhängige Verteilung von GFP-KLC1 entlang der Kernhülle nachgewiesen werden. Pfeile markieren die Lokalisation von KLC1 und Tubulin an der Kernmembran. Balken: 20 μm .

3.1.7 Nesprin-2 beeinflusst die Lokalisation und Expression von KLC1

In einer murinen Fibroblasten-Zelllinie (NIH-3T3) konnte mittels einer indirekten Koimmunlokalisationsstudie mit dem Nesprin-2 spezifischen mAb K56-386 und pAb KLC1 (H-75) eine Nesprin-2 spezifische Abhängigkeit der KLC1 Verteilung beobachtet werden. NIH-3T3-Zellen, die ein schwaches Fluoreszenzsignal für das endogene Nesprin-2 aufweisen (Abb. 3.1.17 A; Stern und Pfeilspitze), zeigen auch eine Reduktion des KLC1 entlang der Kernhülle (Abb. 3.1.17 B; Stern und Pfeilspitze). Im Gegensatz dazu lassen Zellen mit intensiven Nesprin-2 Fluoreszenzsignalen eine Anreicherung des endogenen KLC1 an der Kernmembran erkennen (Abb. 3.1.17; Pfeile in A und B). Aufgrund dieses Resultats wurde eine potentielle Abhängigkeit des KLC1 von Nesprin-2 vermutet und in weiteren Versuchen getestet.

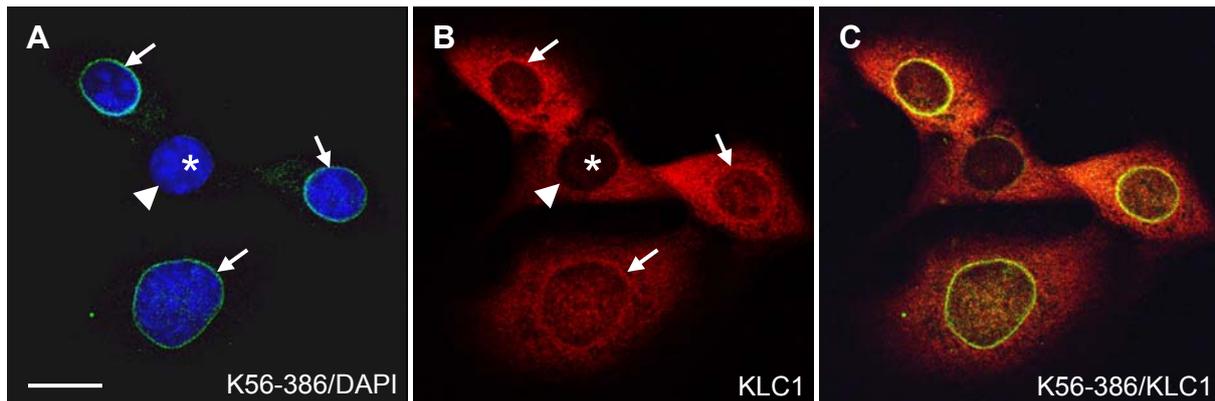


Abb. 3.1.17: Nesprin-2 abhängige Lokalisation des KLC1 in NIH-3T3-Zellen. Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie mit dem Nesprin-2 spezifischen monoklonalen Antikörper (mAb K56-386) (A) und pAb KLC1 (H-75) (B). Als sekundäre Antikörper wurden anti-Maus Alexa 488- und anti-Kaninchen Alexa 568-Konjugate verwendet. (C) Überlagerung von Nesprin-2 und KLC1. Färbung der Zellkerne mit DAPI. Zellen mit schwachen Nesprin-2 Fluoreszenzsignalen (A; Stern und Pfeilspitze) zeigen eine Reduzierung des KLC1 entlang der Kernhülle (B; Stern und Pfeilspitze). Pfeile kennzeichnen intensive Nesprin-2 und KLC1 Fluoreszenzsignal an der Kernmembran. Balken: 20 μ m.

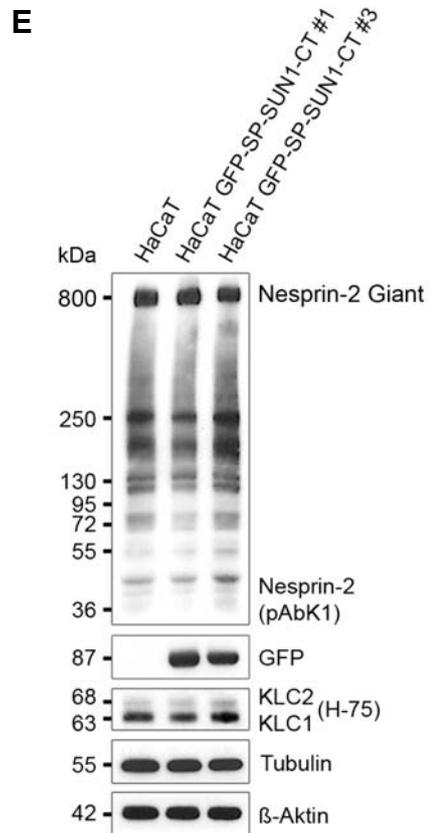
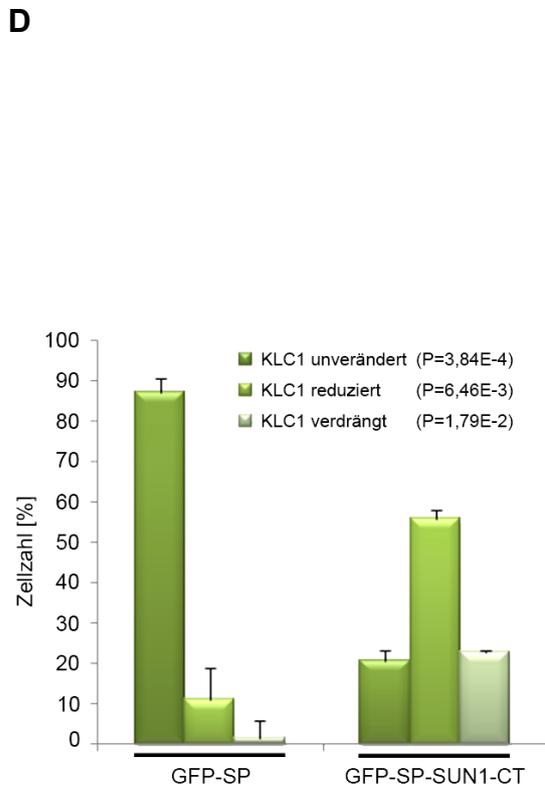
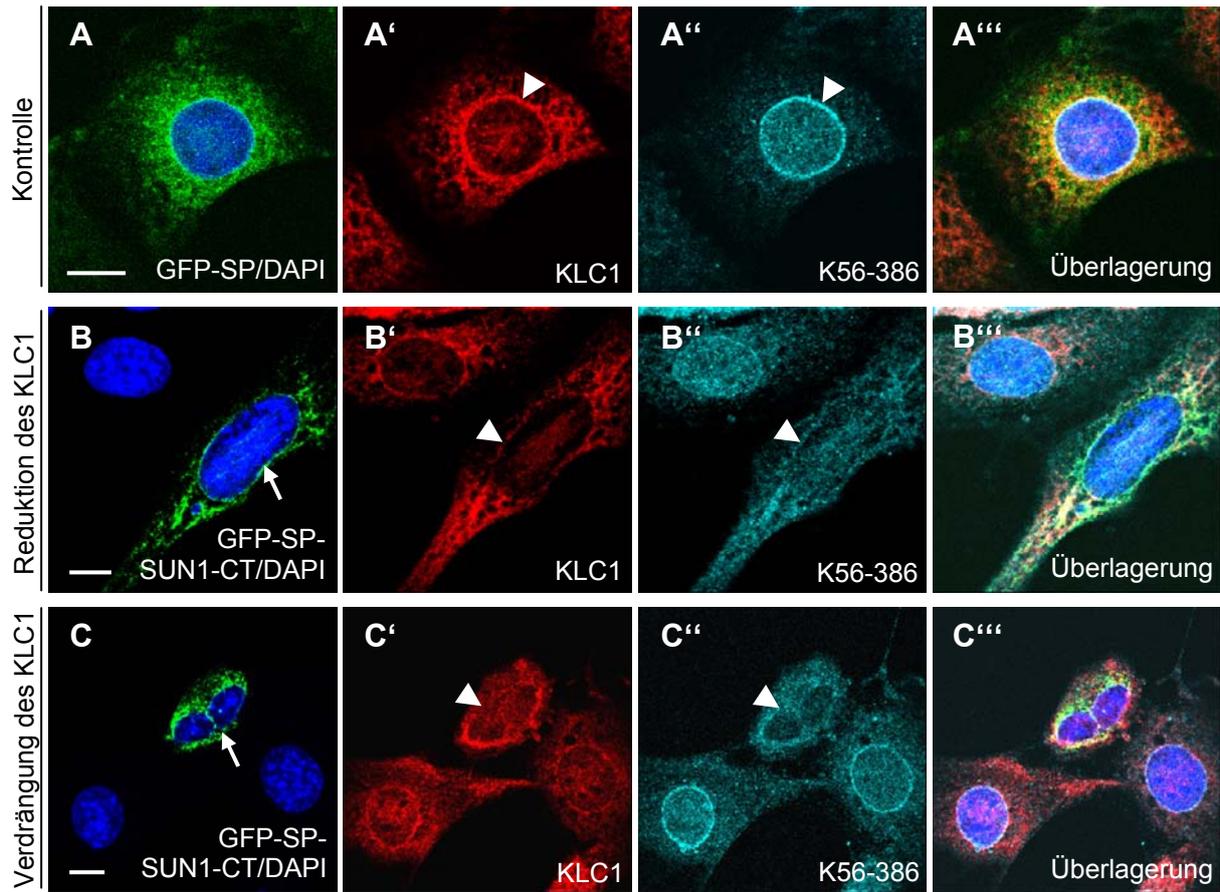
3.1.7.1 Nesprin-KASH Proteine rekrutieren KLC1 an die Kernmembran

Um einen tieferen Einblick in die potentielle Abhängigkeit des KLC1 von den Nesprinen zu gewinnen, wurde die Verteilung und die Expression des KLC1 mit Hilfe der „dominant negativen Nesprin-Interferenz“ untersucht. Für diesen Ansatz wurde ein GFP-markiertes, dominant negativ agierendes Protein verwendet, das die luminaire Domäne des SUN1 und ein ER-spezifisches Signal-Peptid umfasst. Die Expression dieses GFP-SP-SUN1-CT Fusionsproteins führt zu einer Verdrängung der KASH-Domänen tragenden Nesprin Isoformen von der Kernmembran, wohingegen ein Kontrollprotein (GFP-SP), das nur das ER-spezifische Signalpeptid umfasst, nicht zu einer Verdrängung der Nesprine von der Kernmembran führt (Lu, 2007). In Immunfluoreszenzen von GFP-SP-SUN1-CT und GFP-SP exprimierenden NIH-3T3-Zellen mit pAb KLC1 (H-75) und mAb K56-386 lassen sich deutliche Unterschiede zwischen Kontroll- und experimentellen Zellen erkennen. Während in der Kontrolle Nesprin-2 und KLC1 durchgehend an der Kernhülle lokalisiert sind (Abb. 3.1.18; Pfeilspitzen in A' und A''), zeigt sich in Zellen, die das dominant negativ wirkende Protein exprimieren, eine veränderte Verteilung von Nesprin-2 und KLC1. Beide Proteine sind von der Kernmembran verdrängt und weisen demnach eine reduzierte Färbung an der Kernhülle auf (Abb. 3.1.18; Pfeilspitzen in B', B'' und C', C''). Die von Lu (2007) beschriebenen Kerndeformationen, die durch die Verdrängung der Nesprine von der Kernmembran induziert werden, lassen sich in den gezeigten GFP-SP-SUN1-CT exprimierenden NIH-3T3-Zellen ebenfalls beobachten (Abb. 3.1.18; Pfeil in B und C).

In einer statistischen Analyse wurde die subzelluläre Lokalisation des KLC1 überprüft (Abb. 3.1.18 D) und die unveränderte Lokalisation des KLC1, die reduzierte sowie die

verdrängte Lokalisierung des KLC1 entlang der Kernhülle ausgewertet. Während in Kontrollfibroblasten 87 % der Zellen eine unveränderte Verteilung des KLC1 Proteins an der Kernhülle aufweisen, sinkt der Anteil bei den dominant negativen Zellen auf 21 %. Für die reduzierte Lokalisation des KLC1 entlang der Kernmembran lässt sich im Vergleich zur Kontrolle ein Anstieg um 45 % nachweisen. Zudem konnte in 23 % der experimentellen Zellen und nur in 2 % der Kontrollzellen eine vollständige Verdrängung des KLC1 von der Kernmembran beobachtet werden. In einer Westernblotanalyse von stabil transfizierten GFP-SP-SUN1-CT (Klon #1 sowie #3) und nicht transfizierten HaCaT-Zellextrakten wurden die Expressionsmengen der endogenen Nesprin-2 und KLC1 Proteine verglichen. Ein Westernblot mit pAb K1 und pAb KLC1 (H-75) lässt erkennen, dass die Expression des GFP-SP-SUN1-CT keine Auswirkung auf die Nesprin-2 sowie die KLC1 Expression hat (vergleiche Abb. 3.1.18 E). Aufgrund des in Abb. 3.1.15 postulierten Nesprin-2/Kinesin 1- und Tubulin-Immunkomplexes wurde zusätzlich mit mAb WA3 das Expressionsniveau von Tubulin überprüft. Im Vergleich der Kontroll- und dominant negativen Zellextrakte weist auch Tubulin keine Mengenveränderung auf. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass durch die dominant negative Interferenz nur die Lokalisation, jedoch nicht aber die Expression der KLC1 und Nesprin-2 Proteine beeinflusst wird.

Abb. 3.1.18: (folgende Seite) Die dominant negative Interferenz von KASH-Domänen umfassenden Nesprin Isoformen beeinflussen die Anlagerung des KLC1 entlang der Kernmembran. SP-GFP-SUN1-CT transfizierte NIH-3T3-Zellen weisen in indirekten Immunfluoreszenzen mit pAb KLC1 (H-75) und mAb K56-386 im Vergleich zur Kontrolle (GFP-SP, A-A^{'''}) eine Reduktion (B-B^{'''}) bzw. Verdrängung (C-C^{'''}) des endogenen KLC1 entlang der Kernhülle auf. Als sekundäre Antikörper wurden anti-Kaninchen Alexa 568- und anti-Maus Alexa 647-Konjugate verwendet. Nuklei wurden mit DAPI gefärbt. Pfeilspitzen weisen auf die Lokalisation von KLC1 und Nesprin-2 an der Kernmembran hin (A', A'', B', B'' und C', C''). Kerndeformationen sind durch Pfeile markiert (B und C). Balken: 10 µm. (D) Statistische Evaluation der Häufigkeit verschiedener Kernmembran-spezifischer Phänotypen des KLC1 in NIH-3T3-Zellen, die GFP-SP bzw. GFP-SP-SUN1-CT exprimieren. Die Signifikanzunterschiede der 300 ausgewerteten Zellen sind durch ein P (für P-Wert) dargestellt. (E) Westernblotanalyse von stabil transfizierten SP-GFP-SUN1-CT (zwei verschiedene Klone; #1 und #3) und Kontroll- (nicht transfizierten) HaCaT-Zellen. Im Vergleich der Kontrollextrakte mit den dominant negativen Zelllysaten konnte weder eine Veränderung in der Nesprin-2 Expression noch in den KLC1 sowie Tubulin Mengen erfasst werden.



Indirekte Immunfluoreszenzanalysen von GFP-SP-SUN1-CT und Myc-KLC1 koexprimierenden HaCaT-Zellen mit mAb 9E10 und pAb K1 lassen jedoch in einigen Zellen trotz der Abwesenheit von Nesprinen eine Verteilung des Myc-KLC1 Fusionsproteins an der Kernmembran erkennen (Abb. 3.1.19 B; Pfeilspitze). Zudem weist die in Abbildung Abb. 3.1.18 D gezeigte Statistik in 21 % der GFP-SP-SUN1-CT transfizierten NIH-3T3-Zellen eine unveränderte Lokalisation des KLC1 entlang der Kernmembran auf. Aufgrund dieser Beobachtungen erscheint es wahrscheinlich, dass die Verteilung des KLC1 an der Kernmembran nicht nur von Nesprinen abhängt sondern auch von weiteren noch nicht bekannten molekularen Mechanismen bzw. Bindungspartnern.

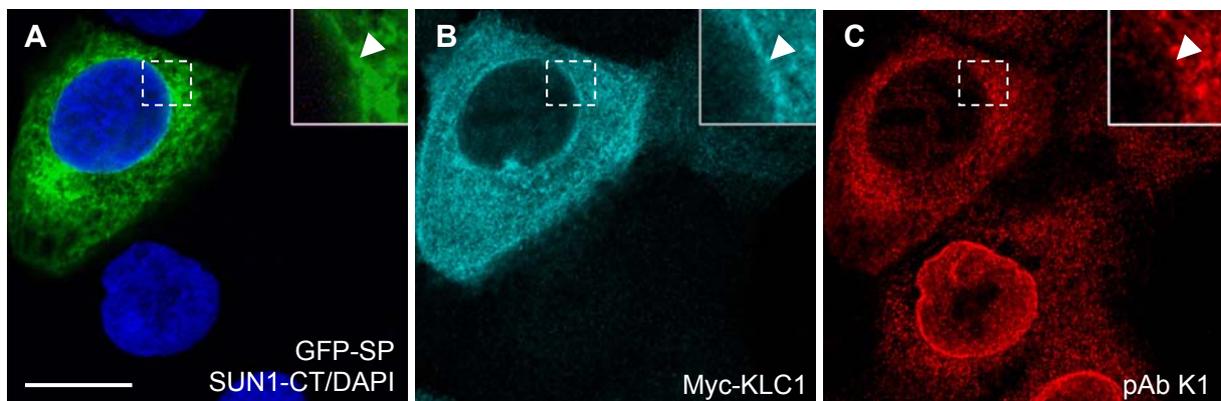


Abb. 3.1.19: Zusätzliche Mechanismen bestimmen die Anlagerung von KLC1 entlang der Kernmembran. Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von GFP-SP-SUN1-CT (A) und Myc-KLC1 kotransfizierten HaCaT-Zellen mit mAb 9E10 (B; sekundärer Antikörper anti-Maus Alexa 647-Konjugat) und pAb K1 (C; sekundärer Antikörper anti-Kaninchen Alexa 568-Konjugat). Färbung der Nuklei mit DAPI. Trotz der Verdrängung der endogenen Nesprine durch SP-GFP-SUN1-CT kann Myc-KLC1 an der Kernmembran detektiert werden (s. Vergrößerung und Pfeilspitzen). Balken: 25 μ m.

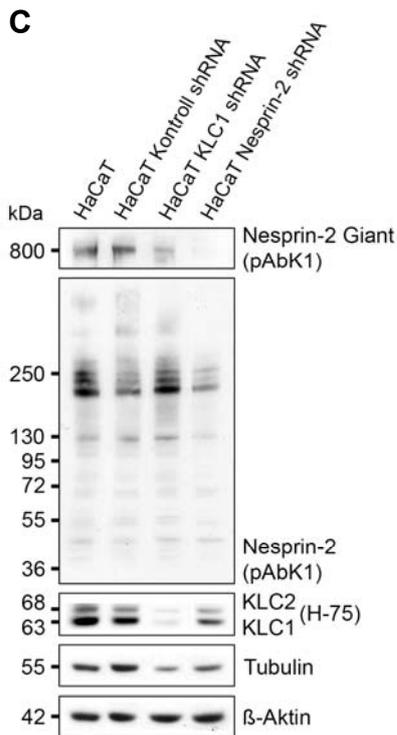
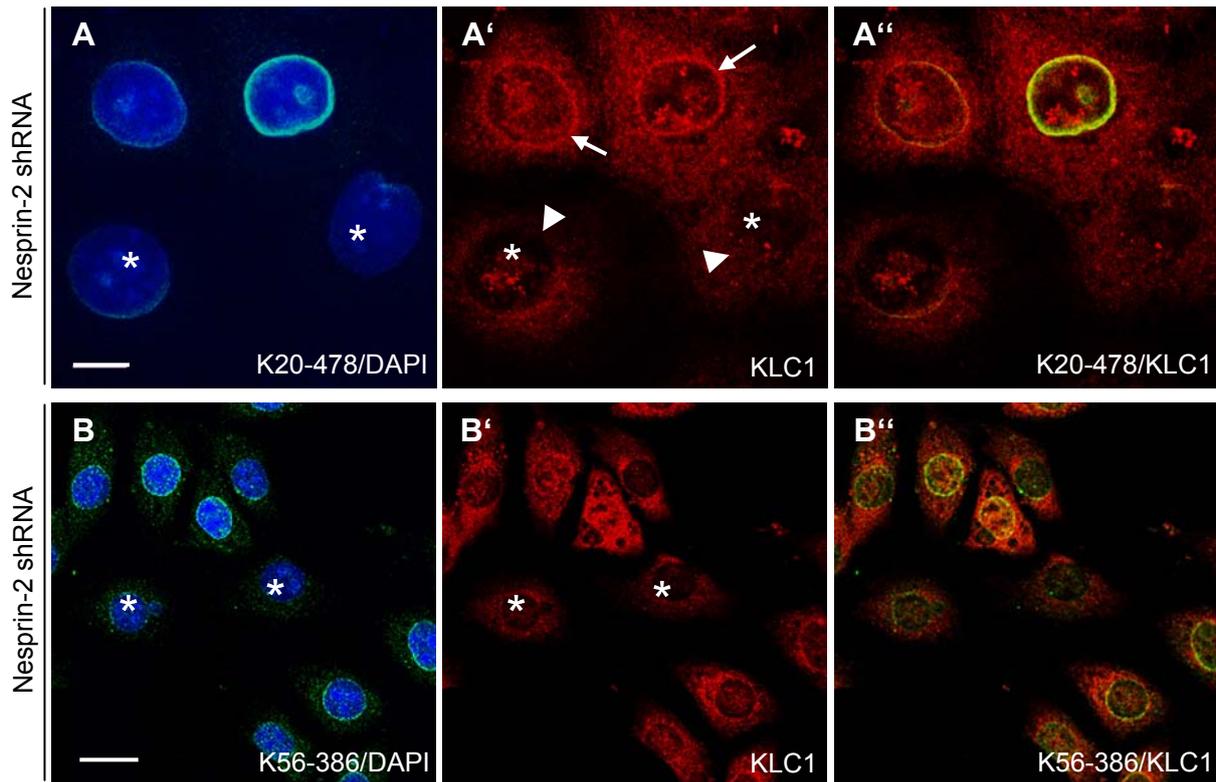
3.1.7.2 Nesprin-2 Giant Silencing in humanen Keratinozyten und murinen Fibroblasten beeinflusst die Lokalisation und Expression des KLC1

Um die Abhängigkeit der KLC1 Lokalisation von Nesprin-2 zu bestätigen, wurden Nesprin-2 Giant spezifische shRNAs („short hairpin“ RNAs) gegen die C-terminale CH2 Domäne der ABD verwendet und ihre Wirkung auf die Lokalisation des KLC1 untersucht. Dieser Ansatz erschien notwendig, da die dominant negative Nesprin-Interferenz alle Kernhüllen gebundene Nesprine (Nesprin-1, Nesprin-2 als auch Nesprin-3) beeinflusst (Lu, 2007). Immunfluoreszenzanalysen mit mAb K20-478 und pAb KLC1 (H-75) zeigen eine von Nesprin-2 induzierte Veränderung der subzellulären Verteilung des KLC1 in transfizierten humanen Keratinozyten-Zelllinien (HaCaT). Der knock down von Nesprin-2 führt zu einem Verlust der KLC1 Färbung an der Kernmembran (Abb. 3.1.20 A'; Sterne und Pfeilspitzen), wohingegen in nicht transfizierten HaCaT-Zellen eine eindeutige

Lokalisation des KLC1 entlang des Zellkerns beobachtet werden konnte (Abb. 3.1.20; Pfeile in A').

Entsprechende Ergebnisse wurden auch in einer Nesprin-2 shRNA transfizierten murinen Fibroblasten-Zelllinie (NIH-3T3) erzielt (Abb. 3.1.20; Sterne in B-B'). In HaCaT- sowie in NIH-3T3- knock down Zellen konnte zusätzlich ein schwächeres KLC1 Fluoreszenzsignal festgestellt werden. HaCaT- und NIH-3T3-Zellen, die mit einem shRNA Kontroll-Plasmid transfiziert wurden, zeigten weder eine Reduktion von KLC1 an der Zellkernmembran noch ein weniger intensives, zelluläres Fluoreszenzsignal für KLC1 (Daten nicht gezeigt). Das Silencing von Nesprin-2 und die dadurch bedingte Beeinflussung des KLC1 wurde in Westernblotanalysen und densitometrischen Studien verifiziert (Abb. 3.1.20 C und D). Westernblotanalysen mit pAb K1 zeigen in Zellextrakten von Nesprin-2 knock down HaCaT-Zellen eine Verringerung von Nesprin-2 Giant (800 kDa) und weiterer Nesprin-2 Isoformen. Zudem konnte anhand dieser biochemischen Studien gezeigt werden, dass es durch den knock down von Nesprin-2 im Vergleich zur Kontrolle zu einer ~51 % reduzierten Expression von KLC1 kommt (Abb. 3.1.20 C und grün markiertes Feld in D). Um zu prüfen, ob KLC1 eine vergleichbare Wirkung auf das Nesprin-2 Expressionsmuster ausübt, wurden spezifische C-terminale KLC1 shRNAs entwickelt bzw. verwendet. HaCaT KLC1 shRNA Zellextrakte, die eine 76 prozentige Reduktion der KLC1 Mengen aufweisen, zeigten jedoch keine Veränderung des Nesprin-2 Expressionsprofils (vergleiche Abb. 3.1.20 C und blau unterlegtes Feld in D). In einer weiteren Westernblotanalyse mit dem Tubulin spezifischen mAb WA3, konnte im Vergleich zu Kontrollzelllysaten zusätzlich eine verringerte Expression der Tubulin Levels in KLC1 sowie Nesprin-2 shRNA Extrakten um jeweils ~30 bzw. ~50 % dokumentiert werden (Abb. 3.1.20 C und blau sowie grün markierter Bereich in D).

Im Rahmen dieser Versuchsreihe zeigt sich, dass die Abwesenheit des Nesprin-2 Proteins nicht nur einen Einfluss auf die Lokalisation des KLC1 entlang der Kernhülle hat, sondern dass auch die Mengen des KLC1 beeinflusst werden. Die aufgeführten Daten weisen ebenfalls darauf hin, dass der knock down von KLC1 sowie von Nesprin-2 die Tubulinmengen beeinträchtigt.



D

	KLC1 Reduktion [%]	Tubulin Reduktion [%]
HaCaT	0%	0%
Kontroll shRNA	19,87%	15,41%
KLC1 shRNA	76,23%	29,58%
Nesprin-2 shRNA	51,01%	52,80%

Abb. 3.1.20: Nesprin-2 Giant Silencing in HaCaT- und NIH-3T3-Zellen beeinflusst die Lokalisation und das Expressionsprofil von KLC1. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit mAb K20-478 bzw. mAb K56-386 und pAb KLC1 (H-75) von Nesprin-2 shRNA transfizierten HaCaT-(A-A') und NIH-3T3-Zellen (B-B'). Als sekundäre Antikörper wurden anti-Maus Alexa 488- und anti-Kaninchen Alexa 568-Konjugate verwendet. Färbung der Zellkerne mit DAPI. Pfeile und Pfeilspitzen markieren den KLC1 spezifischen Phänotyp an der Kernmembran. Nesprin-2 knock down Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet. Balken: (A) 20 µm; (B) 25 µm. (C) Westernblotanalyse von Kontroll-, Nesprin-2- sowie KLC1-knock down HaCaT-Zellextrakten. (D) Densitometrische Studie der verschiedenen Kontroll- und knock down-Chemilumineszenzsignale. Es wurden drei unterschiedliche Messungen ausgewertet. Die Abwesenheit von Nesprin-2 hat einen Einfluss auf die Kernmembranspezifische Lokalisation des KLC1 und auf dessen Expression. Zudem zeigen KLC1 sowie Nesprin-2 knock down Lysate reduzierte Tubulinmengen.

3.1.7.3 Lamin A/C abhängige Lokalisation des Nesprin-2 und KLC1 in humanen Keratinozyten-Zelllinien

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass die Verteilung des endogenen Nesprin-2 entlang der Kernhülle von einem intakten Lamin A/C Netzwerk abhängt (Libotte et al., 2005; Zhang et al., 2005). Um zu untersuchen, ob die Kernmembran-spezifische Lokalisation des KLC1 indirekt durch Lamin A/C beeinflusst wird, erfolgte ein knock down von Lamin A/C mit einer humanen Lamin A/C siRNA. Indirekte Immunfluoreszenzfärbungen mit einem Lamin A/C monoklonalen Antikörper (mAb Jol2) und mit pAb K1 zeigen in Lamin A/C knock down HaCaT-Zellen einen vollständigen Verlust von Lamin A/C und Nesprin-2 (Abb. 3.1.21 A-A''); Sterne und Pfeile). Lamin A/C defiziente HaCaT-Zellen, die mit mAb Jol2 und pAb KLC1 (H-75) gefärbt wurden, weisen in 80 % der Zellen eine Reduktion bzw. einen vollständigen Verlust der Kernhüllenfärbung durch pAb KLC1 (H-75) auf (Abb. 3.1.21 B-B''); Sterne und Pfeile). Das Silencing von Lamin A/C lässt in einigen HaCaT-Zellen zusätzlich ein schwächeres Fluoreszenzsignal für KLC1 erkennen.

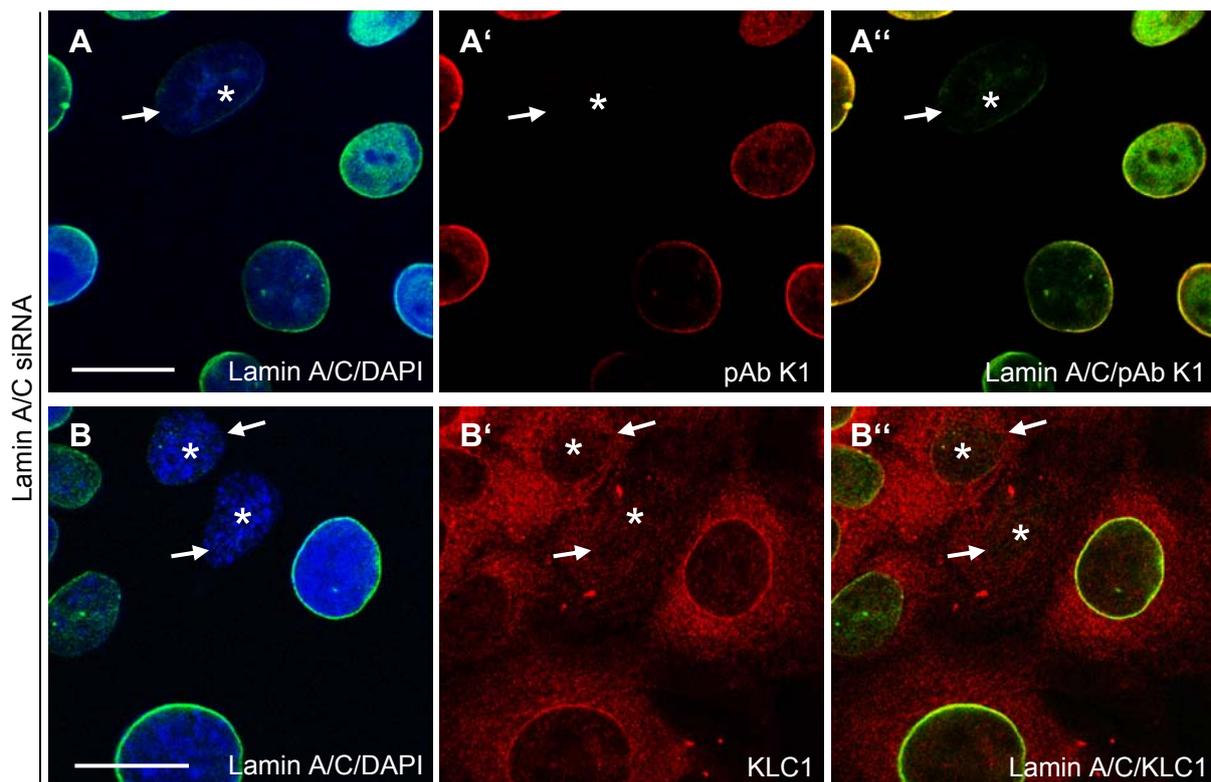


Abb. 3.1.21: Lamin A/C abhängige Lokalisierung von Nesprin-2 und KLC1. Lamin A/C siRNA transfizierte HaCaT-Zellen wurden sowohl mit dem Lamin A/C spezifischen mAb Jol2 und pAb K1 (A-A'') als auch mit mAb Jol2 und pAb KLC1 (H-75) (B-B'') gefärbt. Als sekundäre Antikörper wurden anti-Maus Alexa 488- und anti-Kaninchen Alexa 568-Konjugate eingesetzt. Färbung der Nuklei mit DAPI. Der knock down von Lamin A/C führt zu einer vollkommenen Verdrängung des Nesprin-2 (A-A''); Sterne und Pfeile) und zu einer partiellen Verdrängung des KLC1 von der Kernmembran (B-B''); Sterne und Pfeile). Balken: 20 µm.

Lamin A/C positive HaCaT-Zellen (Abb. 3.1.21 A und B) bzw. Zellen, die mit einer spezifischen Kontroll siRNA transfiziert wurden (nicht dargestellt), zeigten weder eine Veränderung der Nesprin-2 noch der KLC1 Verteilung an der Kernmembran. Der Verlust von Lamin A/C induziert demnach eine indirekte, Nesprin-2 abhängige Veränderung der Kernhüllenlokalisierung von KLC1.

3.1.8 Nesprin-2 sowie KLC1 abhängige Lokalisation der Mikrotubuli entlang der Kernhülle

Aufgrund des in Abbildung Abb. 3.1.20 C gezeigten Nesprin-2 sowie KLC1 Silencing und der damit einhergehenden Reduktion der Tubulinmengen wurde die Nesprin-2 bzw. KLC1 abhängige Verteilung der Mikrotubuli an der Kernmembran weiterführend analysiert. Es wurde eine murine Fibroblasten-Zelllinie (NIH-3T3) mit pAb K1 (Nesprin-2) und mAb WA3 (Tubulin) sowie mit pAb KLC1 (H-75) und mAb WA3 im Parallelansatz kogefärbt. Die indirekte Immunfluoreszenzanalyse zeigt, dass in Zellen, die ein starkes Fluoreszenzsignal für Nesprin-2 bzw. KLC1 an der Kernhülle aufweisen, ebenso intensive Signale für Tubulin entlang der Kernmembran vorhanden sind (Abb. 3.1.22; Pfeilspitzen in A-A' und B-B'). Dem entgegengesetzt konnte in Zellen mit schwachen Nesprin-2 und KLC1 Signalen ein reduziertes Fluoreszenzsignal für Tubulin an der Kernhülle detektiert werden (Abb. 3.1.22; Stern in A-A' und B-B'). Auch in Colchicin behandelten NIH-3T3-Zellen, die auf identische Weise gefärbt wurden, zeigten sich korrespondierende Fluoreszenzintensitäten (Abb. 3.1.22 C-C' und D-D'). Zur weiteren Prüfung dieser Nesprin-2 und KLC1 spezifischen Abhängigkeit des Tubulins wurde in knock down Studien die Anlagerung der Mikrotubuli an die Kernmembran weitergehend untersucht. Zur Reduktion des zytoplasmatischen Hintergrundes der Mikrotubuli erfolgte die Permeabilisierung der knock down Zellen mit 0,1 % Triton-X-100 vor der Fixierung. Eine indirekte Immunfluoreszenzanalyse von einer Nesprin-2 shRNA transfizierten humanen Keratinozyten-Zelllinie (HaCaT) mit pAb K1 und mAb WA3 lässt im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen nur noch eine schwache Anlagerung der Mikrotubuli entlang der Kernhülle erkennen (Abb. 3.1.23 A-A'', Sterne und Pfeil). Die von Lüke et al. (2008) beschriebenen Kerndeformationen, die durch den Verlust von Nesprin-2 Giant induziert werden, lassen sich in den Nesprin-2 knock down Zellen ebenfalls beobachten (vergleiche Abb. 3.1.23; Sterne in A'').

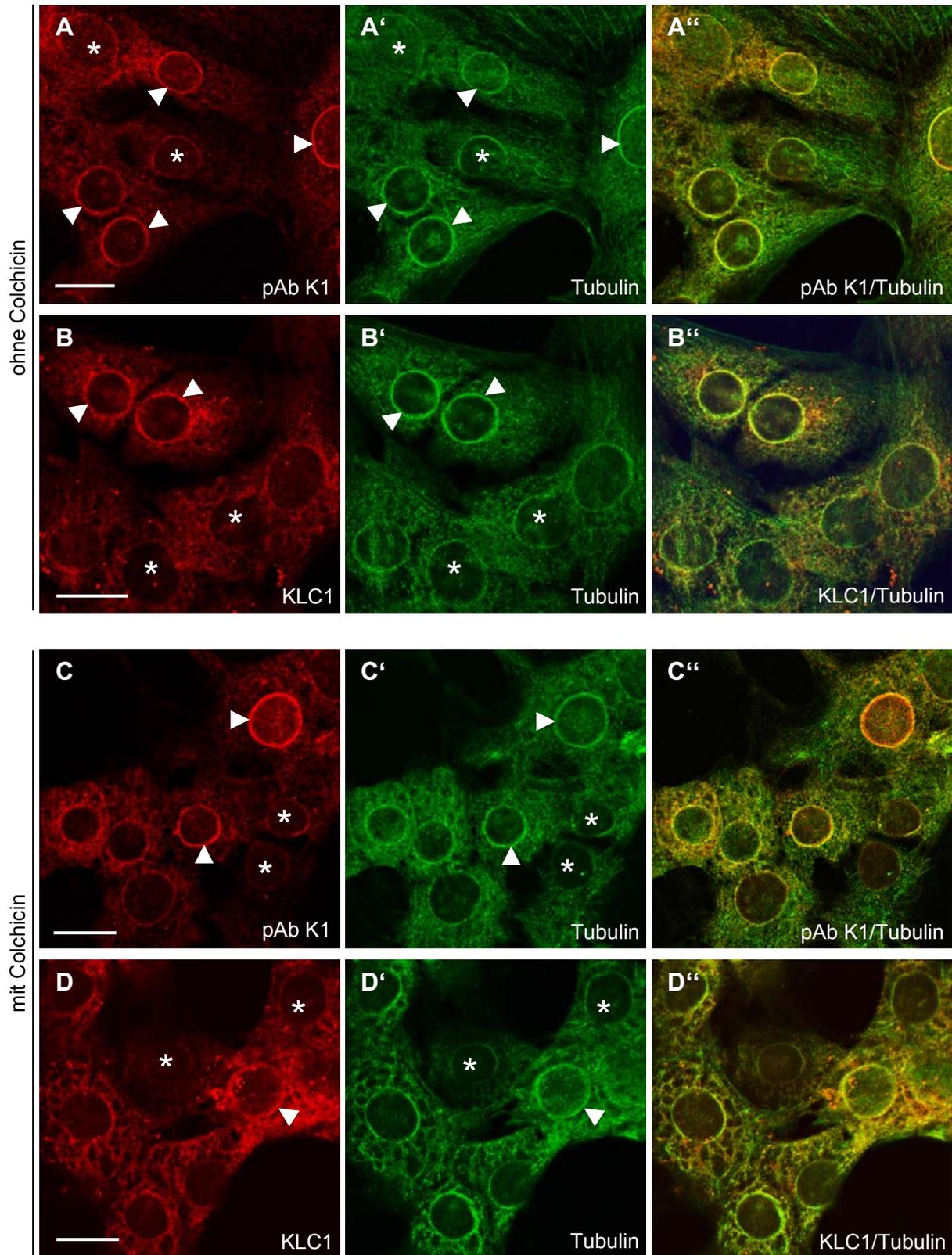


Abb. 3.1.22: Nesprin-2 und KLC1 abhängige Verteilung der Mikrotubuli in NIH-3T3-Zellen. Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von NIH-3T3-Zellen (mit und ohne Colchicin Behandlung) mit pAb K1 (Nesprin-2) und mAb WA3 (Tubulin) (A-A'' und C-C'') sowie mit pAb KLC1 (H-75) und mAb WA3 (B-B'' und D-D'') zeigen korrespondierende Fluoreszenzintensitäten entlang der Kernhülle. Als sekundäre Antikörper wurden anti-Maus Alexa 488- und anti-Kaninchen Alexa 568-Konjugate verwendet. Starke Fluoreszenzsignale an der Kernmembran sind durch Pfeilspitzen markiert, wohingegen Zellen mit schwachen Signalen mit einem Stern gekennzeichnet sind. Balken: 20 µm.

In KLC1 knock down HaCaT-Zellen, die mit pAb KLC1 und mAb WA3 gefärbt wurden, lässt sich eine Reduktion der an den Zellkern angelagerten Mikrotubuli nachweisen (Abb. 3.1.23 B-B“; Stern und Pfeil), wohingegen in nicht transfizierten HaCaT-Zellen kein Effekt auf die Mikrotubuli beobachtet werden konnte (Abb. 3.1.23; Pfeilspitze in B-B“). Die bisherigen Daten deuten daraufhin, dass Nesprin-2 sowie KLC1 als essenzielle Komponenten an der Organisation des Mikrotubulinetzwerks rund um den Zellkern beteiligt sind.

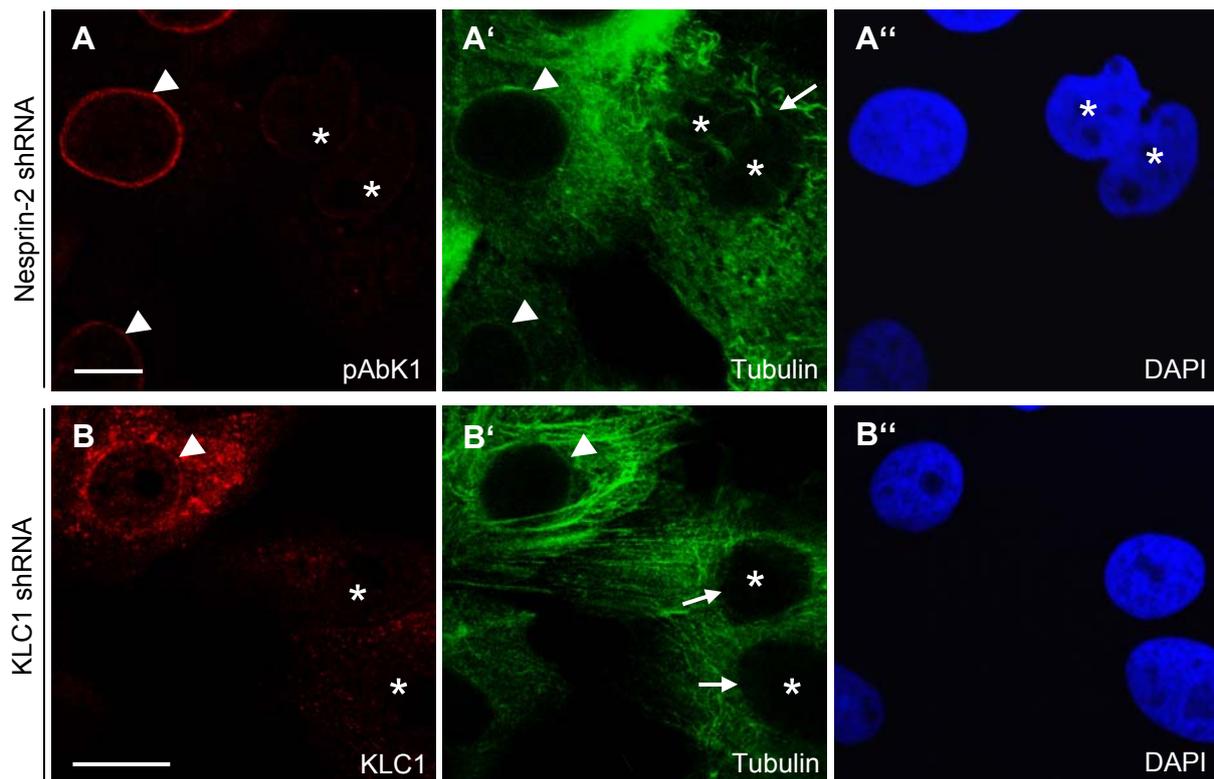


Abb. 3.1.23: Nesprin-2 sowie KLC1 Silencing beeinflusst die Anlagerung der Mikrotubuli an die Kernmembran. (A-A“) Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie an Nesprin-2 knock down HaCaT-Zellen mittels pAb K1 und mAb WA3. (B-B“) Färbung von KLC1 shRNA transfizierten HaCaT-Zellen mit pAb KLC1 (H-75) als auch mit mAb WA3. Als sekundäre Antikörper wurden anti-Kaninchen Alexa 568- und anti-Maus Alexa 488-Konjugate eingesetzt. Nuklei wurden mit DAPI gefärbt. Es erfolgte eine Permeabilisierung vor der Fixierung, um die Anlagerung der Mikrotubuli entlang der Kernmembran beobachten zu können. Pfeilspitzen kennzeichnen die Kernhüllenlokalisation der Mikrotubuli in nicht transfizierten Zellen. ShRNA transfizierte Zellen wurden mit einem Stern und die Abwesenheit von Mikrotubulistrukturen an der Kernmembran mittels Pfeilen markiert. Balken: 10 μ m.

3.1.9 Nesprin-2 und KLC1 akkumulieren am Zentrosom

3.1.9.1 KLC1 lokalisiert am Zentrosom

Aufgrund der beschriebenen Assoziation des KLC1 mit Rootletin (Yang und Li, 2005), einer Komponente des Zentrosoms, das die Zentriolen miteinander verknüpft und der in Abbildung Abb. 3.1.2 B-B“ dokumentierten Lokalisation des Myc-SR Fusionsproteins könnte KLC1 aufgrund dieser Protein-Protein-Interaktionen am Zentrosom gebunden

sein. Indirekte immunchemische Untersuchungen von Colchicin behandelten NIH-3T3-Fibroblasten, die nach Permeabilisierung und Fixierung mit mAb WA3 und pAb KLC1 (H-75) gefärbt wurden, zeigen eine Akkumulation des endogenen KLC1 am MTOC (Abb. 3.1.24 A-A''); Vergrößerung und Pfeilspitzen). Zudem lässt sich in einer indirekten Immunfluoreszenzanalyse von NIH-3T3-Zellen mit einem γ -Tubulin Antikörper (mAb GTU-88) und pAb KLC1 (H-75) eine Überlagerung der Fluoreszenzsignale an den Zentrosomen feststellen (Abb. 3.1.24; Pfeilspitze in B-B''). Somit konnte KLC1 neben Myc-SR und Rootletin als eine weitere Komponente des Zentrosoms identifiziert werden.

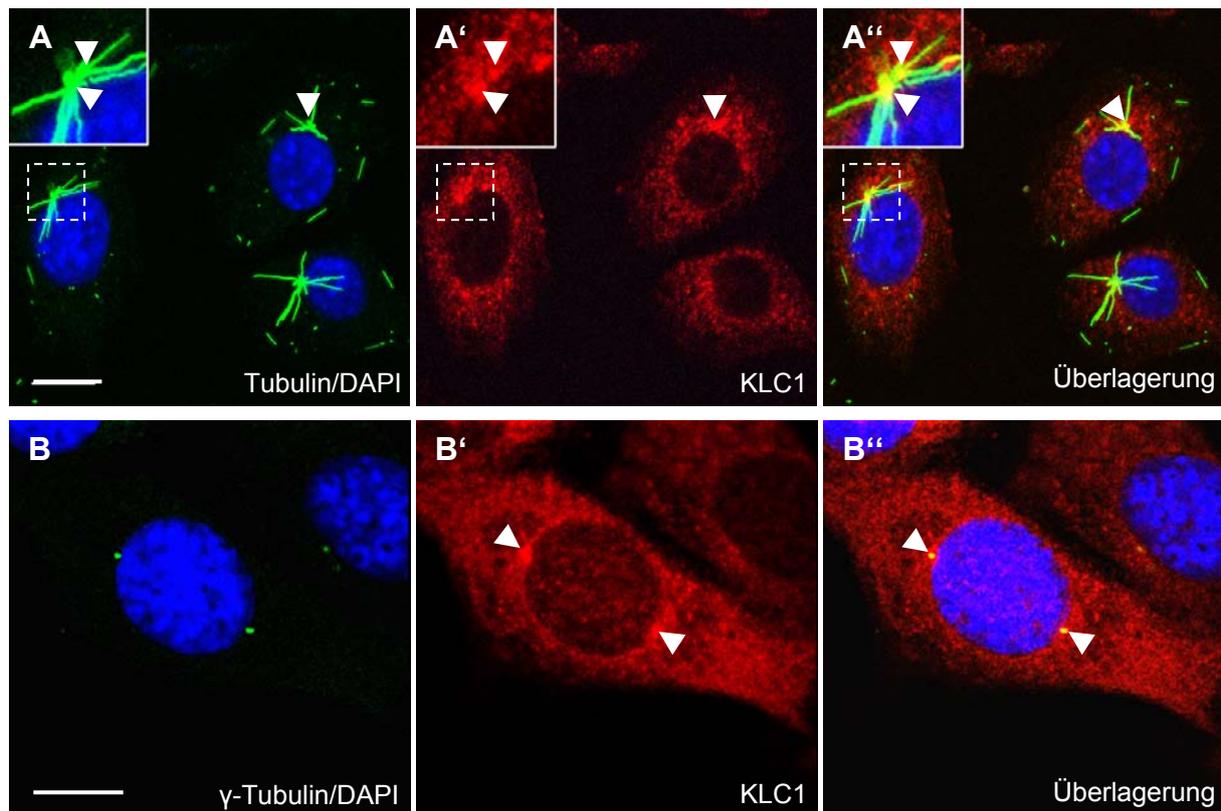


Abb. 3.1.24: Anlagerung des KLC1 am Zentrosom in NIH-3T3-Fibroblasten. (A-A'') Colchicin behandelte NIH-3T3-Zellen, die vor der Fixierung permeabilisiert wurden, zeigen in indirekten immunchemischen Färbungen mit mAb WA3 und pAb KLC1 (H-75) eine Überlagerung am MTOC (Pfeilspitzen). Der markierte Bereich ist vergrößert dargestellt. (B-B'') Indirekte Kofärbung von NIH-3T3-Fibroblasten mit einem γ -Tubulin spezifischen monoklonalen Antikörper (mAb GTU-88) und pAb KLC1 (H-75). Als sekundäre Antikörper wurden anti-Maus Alexa 488- und anti-Kaninchen Alexa 568-Konjugate verwendet. Pfeilspitzen kennzeichnen die Anlagerung sowie Kolokalisation des KLC1 am bzw. mit dem Zentrosom. Färbung der Kerne mit DAPI. Balken: 10 μ m.

3.1.9.2 Kolokalisation von Nesprin-2 und KLC1 am MTOC

Um zu überprüfen, ob das endogene Nesprin-2 am Zentrosom lokalisiert, erfolgte eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung von RFP-Pericentrin und Myc-KLC1 überexprimierenden NIH-3T3-Zellen mit mAb 9E10 und pAb K1. Das Myc-KLC1 Fusionsprotein kolokalisiert mit RFP-Pericentrin (Abb. 3.1.25 A und B; Vergrößerung und Pfeilspitzen).

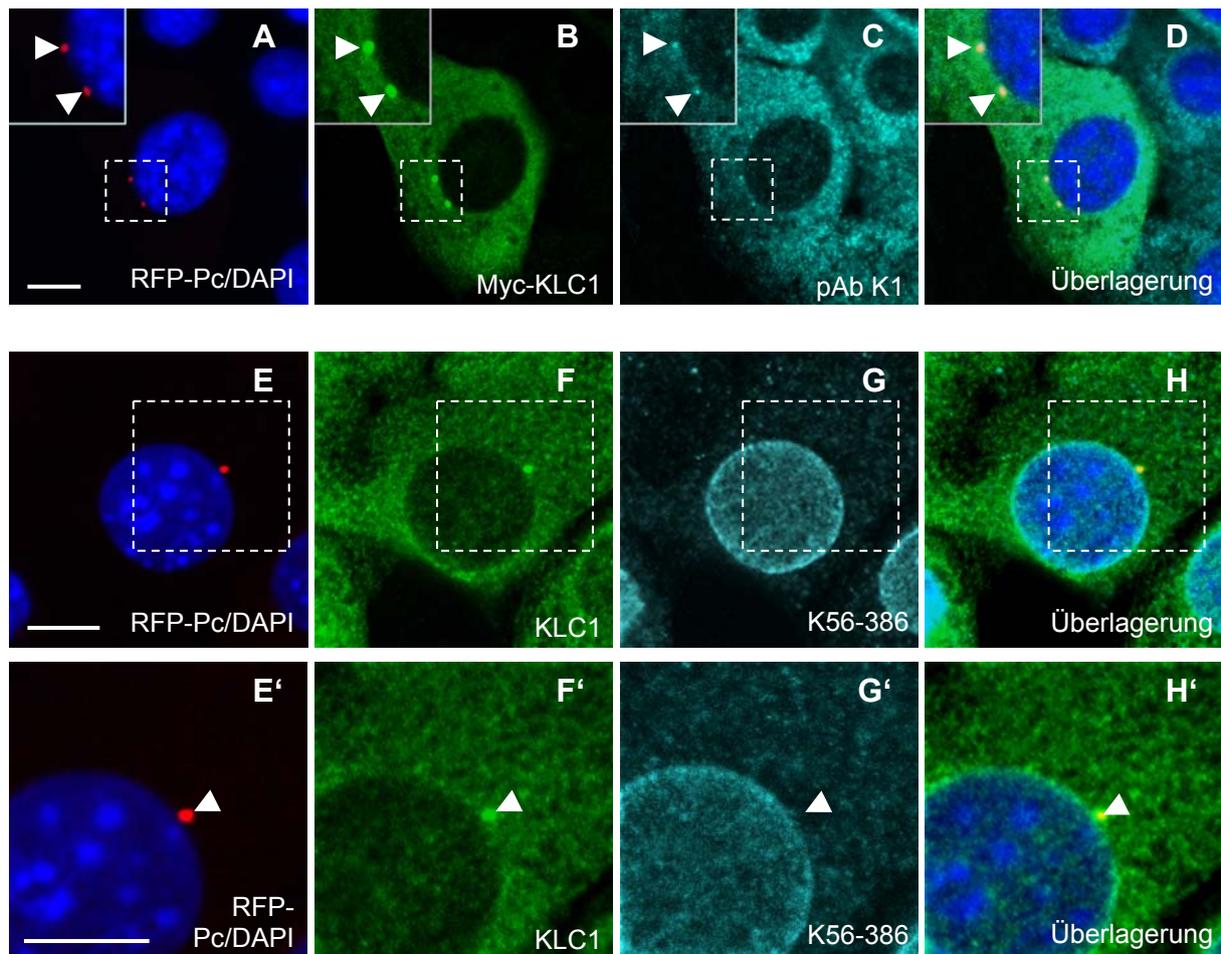


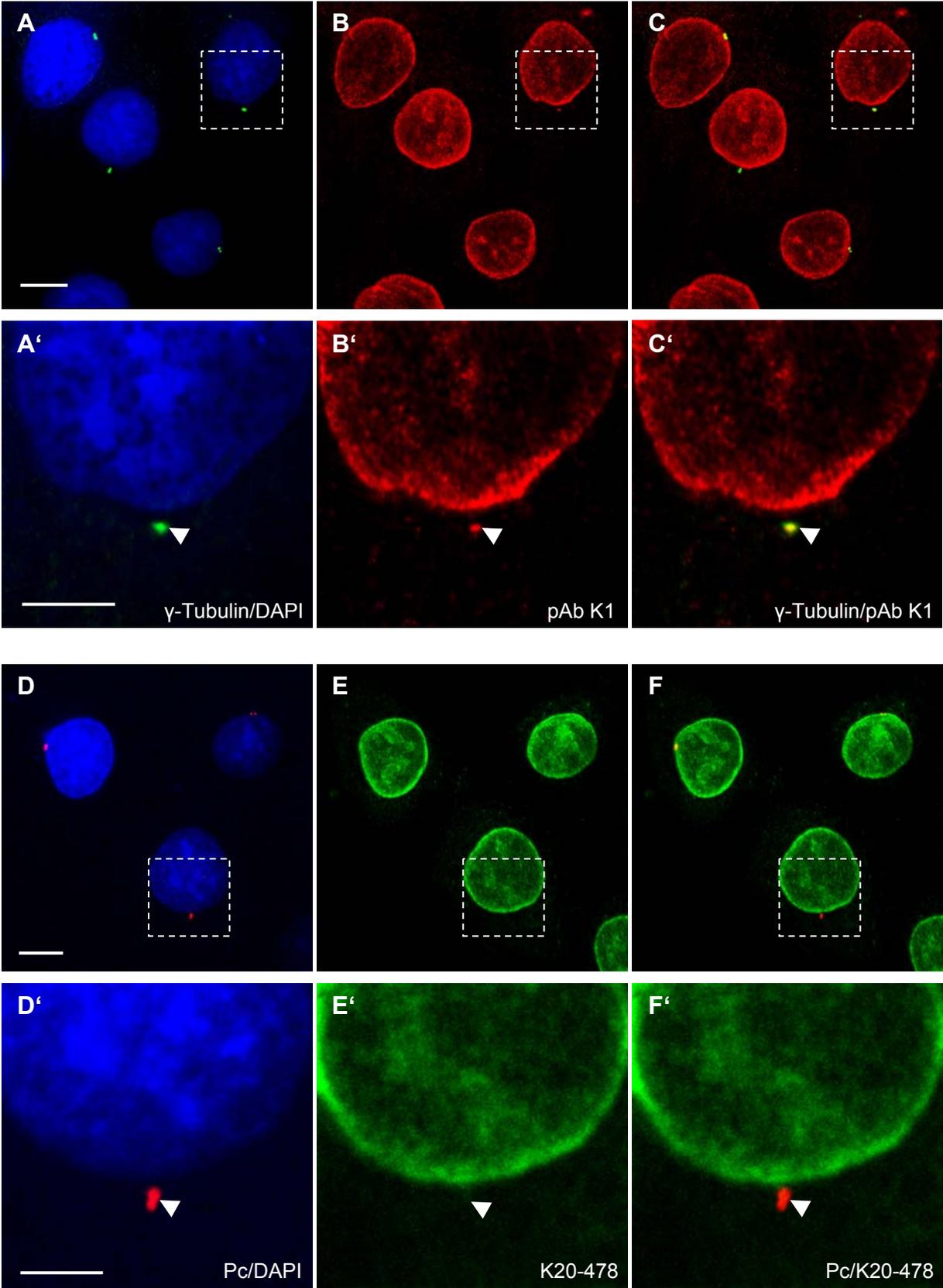
Abb. 3.1.25: Kolokalisation von Nesprin-2 und KLC1 am Zentrosom in murinen NIH-3T3-Fibroblasten. (A-D) RFP-Pericentrin und Myc-KLC1 koexprimierende NIH-3T3-Zellen, die mit mAb 9E10 (sekundärer Antikörper anti-Maus Alexa 488-Konjugat) und pAb K1 (Nesprin-2; sekundärer Antikörper anti-Kaninchen Alexa 647-Konjugat) gefärbt wurden, zeigen eine Überlagerung des ektopisch exprimierten KLC1 und des endogenen Nesprin-2 am Zentrosomen (Vergrößerung und Pfeilspitzen). (E-H) Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von RFP-Pericentrin überexprimierenden NIH-3T3-Zellen mit pAb KLC1 (H-75) (sekundärer Antikörper anti-Kaninchen Alexa 488-Konjugat) und mAb K56-386 (Nesprin-2 Giant; sekundärer Antikörper anti-Maus Alexa 647-Konjugat). Mit dem N-Terminus spezifischen Nesprin-2 Antikörper konnte im Gegensatz zu pAb K1 kein Fluoreszenzsignal am Zentrosom detektiert werden. Die in E'-H' (Vergrößerung aus E-H) eingezeichneten Pfeilspitzen markieren die Position des MTOCs. Färbung der Zellkerne mit DAPI. Balken: 10 µm.

Zusätzlich weisen auch die mit pAb K1 (C-terminaler Nesprin-2 Antikörper) gefärbten NIH-3T3-Zellen deutliche Fluoreszenzsignale am Zentrosom auf (Abb. 3.1.25 C; Vergrößerung und Pfeilspitzen). Demnach konnte eine Kolokalisation von RFP-Pericentrin, Myc-KLC1 und endogenem Nesprin-2 an den Zentrosomen gezeigt werden. Immunfluoreszenzanalysen von RFP-Pericentrin transfizierten NIH-3T3-Zellen mit pAb KLC1 (H-75) und einem N-Terminus spezifischen Nesprin-2 Giant Antikörper (mAb K56-386) lassen jedoch nur für das endogene KLC1 eine Färbung des Zentrosoms erkennen (Abb. 3.1.25; Pfeilspitzen in E, E', F, F' und G, G'). Deshalb ist anzunehmen, dass nur der C-Terminus von Nesprin-2 Giant bzw. C-terminale Isoformen von Nesprin-2 das Potential besitzen über KLC1 mit dem Zentrosom zu assoziieren.

3.1.9.3 C-terminale Nesprin-2 Isoformen assoziieren mit dem Zentrosom

Die vorausgehenden Analysen wurden mit Nesprin spezifischen Antikörpern durchgeführt, die gegen den C-Terminus (pAb K1) und den N-Terminus (mAb K56-386) von murinem Nesprin-2 gerichtet sind. Dabei konnte nur mit pAb K1 eine Färbung am Zentrosom beobachtet werden, was ein Hinweis darauf ist, dass N-terminale Isoformen von Nesprin-2 Giant, die die Aktin-bindende Domäne umfassen, nicht am Zentrosom lokalisieren. Wir haben vergleichbare Untersuchungen für das humane Nesprin-2 in der humanen Keratinozyten-Zelllinie HaCaT mit pAb K1 und mAb K20-478, der gegen die Aktin-bindende Region von Nesprin-2 gerichtet ist durchgeführt. Auch in HaCaT-Zellen konnte nur mit pAb K1 eine Färbung am Zentrosom beobachtet werden. Das Zentrosom wurde mit mAb GTU-88 (γ -Tubulin) und mit pAb Pc-4448 (Pericentrin) gefärbt (Abb. 3.1.26; Pfeilspitzen in A'-C' und D'-F'). In höherer Vergrößerung sind solche Zellen gezeigt, in denen das Zentrosom $\sim 1 \mu\text{m}$ vom Nukleus entfernt ist. Da das Nesprin-2 Giant Molekül nur eine Länge von $\sim 0,6 \mu\text{m}$ aufweist, ist auszuschließen, dass Nesprin-2 Giant unter diesen Voraussetzungen mit dem MTOC assoziiert. Demnach lässt sich vermuten, dass C-terminale Isoformen von Nesprin-2 mit dem Zentrosom interagieren.

Abb. 3.1.26. (folgende Seite) C-terminale Nesprin-2 Isoformen lokalisieren am Zentrosom in der humanen Keratinozyten-Zelllinie HaCaT. Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie von HaCaT-Zellen mit mAb GTU-88 (γ -Tubulin) und pAb K1 (A-C) sowie pAb Pc-4448 (Pericentrin) und mAb K20-478 (Nesprin-2 Giant) (D-F). Als sekundäre Antikörper wurden anti-Maus Alexa 488- und anti-Kaninchen Alexa 568-Konjugate verwendet. Kerne wurden mit DAPI gefärbt. Nur der C-Terminus spezifische Nesprin-2 Antikörper pAb K1 zeigt eine Färbung am Zentrosom (A'-C'; Vergrößerung von A-C; Pfeilspitzen), nicht aber der N-Terminus spezifische Nesprin-2 Giant Antikörper (D'-F'; Vergrößerung von D-F; Pfeilspitzen). Balken: $10 \mu\text{m}$; Balken in der Vergrößerung: $5 \mu\text{m}$.



3.1.10 Akkumulation der SUN-Proteine am Zentrosom

Wang et al. (2006) und Xiong et al. (2008) zeigten bereits, dass die SUN-Proteine der inneren Kernmembran eine Bedeutung für die Assoziation zwischen Kernhülle und Zentrosom besitzen. Um diese Studien darüber hinaus in Vertebraten zu validieren, wurde eine mögliche Lokalisation der SUN1 und SUN2 Proteine am Zentrosom geprüft. Färbungen von HaCaT-Zellen mit einem SUN1 spezifischen Antikörper (pAb SUN1b) und mAb GTU-88 (γ -Tubulin) zeigten nur eine sehr schwache SUN1 Färbung am MTOC (Abb. 3.1.27 A-A“; Pfeilspitze und Vergrößerung). Andererseits lassen HaCaT-Zellen, die mit einem polyklonalen SUN2 Antikörper (pAb SUN2) und mAb GTU-88 (γ -Tubulin) markiert wurden, eine Anreicherung von SUN2 unterhalb des Zentrosoms erkennen (s. Abb. 3.1.27 B-B“; Pfeilspitzen und Vergrößerung). In Kollokalisationsanalysen der ektopisch exprimierten SUN-Proteine mit der zentrosomalen Komponente Pericentrin konnten in COS7-Zellen identische Ergebnisse erzielt werden. Das überexprimierte SUN1 GFP-Fusionsprotein weist nur eine schwache und partielle Akkumulation an den Rändern des Zentrosoms auf (Abb. 3.1.27; Vergrößerung und Pfeilspitzen in C). Im Gegensatz dazu konnte für das V5-SUN2 Fusionsprotein eine Lokalisation am Zentrosom dokumentiert werden (Abb. 3.1.27; Vergrößerung und Pfeilspitzen in B). Die Kollokalisation von ektopisch expimiertem SUN1 und endogenem SUN2 mit dem Zentrosom wurde bereits in einer humanen Osteosarcoma-Zelllinie U2OS von Wang et al. (2006) beschrieben.

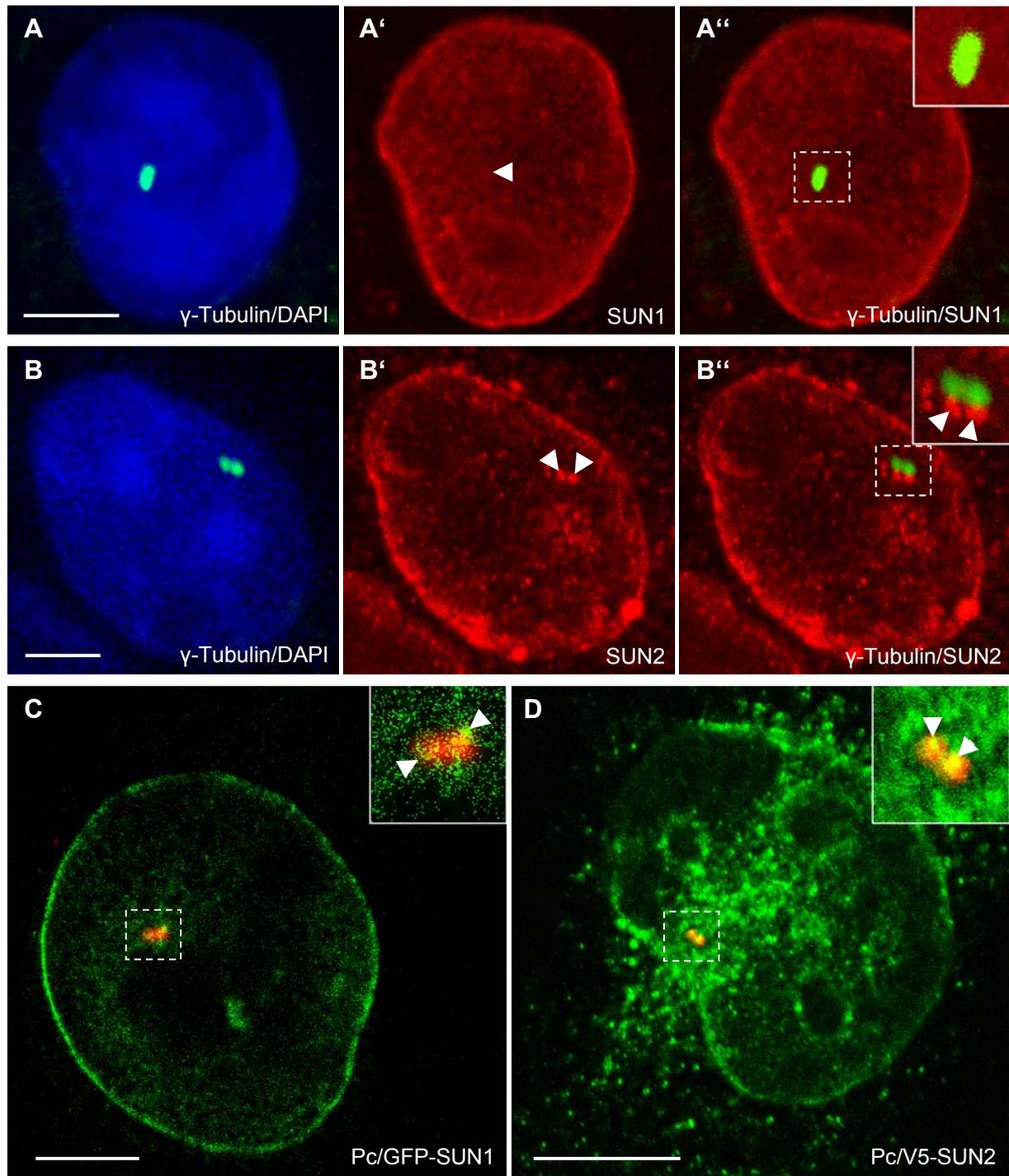


Abb. 3.1.27: SUN-Proteine, Komponenten der inneren Kernmembran, akkumulieren an Regionen nahe dem Zentrosom. HaCaT-Zellen wurden mittels der indirekten Immunfluoreszenzanalyse mit mAb GTU-88 (γ -Tubulin) und pAb SUN1b (A-A'') sowie mit mAb GTU-88 (γ -Tubulin) und pAb SUN2 (B-B'') gefärbt. Als sekundäre Antikörper wurden anti-Maus Alexa 488- und anti-Kaninchen Alexa 568-Konjugate eingesetzt. Markierung der Nuklei mit DAPI. Balken: 5 μ m. (C) Färbung von GFP-SUN1 exprimierenden COS7-Zellen mit pAb Pc-4448 (Pericentrin; sekundärer Antikörper anti-Kaninchen Alexa 568-Konjugat). Balken: 10 μ m. (D) V5-SUN2 transfizierte COS7-Zellen wurden mittels mAb V5 und pAb Pc-4448 komarkiert (sekundäre Antikörper anti-Maus Alexa 488- und anti-Kaninchen Alexa 568-Konjugat). Balken 10 μ m. Sowohl das endogene als auch das ektopisch exprimierte SUN1 zeigt eine schwache Anreicherung am Zentrosom (s. Pfeilspitzen). Hingegen konnte für SUN2 (ektopisch sowie endogen) eine eindeutige Akkumulation am Zentrosom erfasst werden (durch Pfeilspitzen gekennzeichnet).

3.1.11 Rootletin, eine Komponente des Zentrosoms, beeinflusst die Lokalisation von Nesprin-2 und KLC1

Rootletin ist eine zentrale Komponente des Zentrosoms. Das 220 kDa große Protein formt durch laterale „Coiled coil“ Interaktionen ein bis zu 10 nm dickes Protofilament. Diese Protofilamente lagern sich zusammen und bilden zusätzlich die ziliaren „Rootlets“, die vor allem in retinalen Photorezeptoren sehr prominent exprimiert werden (Yang et al., 2002). Rootletinfilamente entspringen aus dem zentriolären Material und verknüpfen durch filamentäre Strukturen Mutter- und Tochter-Zentriole, wobei diese Filamentstrukturen einen bedeutenden Einfluss für die zentrosomale Kohäsion besitzen (Bahe et al., 2005; Yang et al., 2006). Die Überexpression von Rootletin führt in Zellkulturen zur Ausbildung von filamentären Netzwerken (Yang et al., 2002; Yang und Li, 2006). Da Rootletin bis jetzt der einzige bekannte zentrosomale Bindepartner des KLC1 ist (Yang und Li, 2005), vermuten wir, dass Nesprin-2 aufgrund dieser Protein-Protein-Interaktion mit dem MTOC verknüpft ist.

3.1.11.1 Ektopisch exprimiertes Rootletin rekrutiert KLC1, während die Verteilung des Nesprin-2 Giant unverändert bleibt

Um diesen Befund zu stützen, wurde in NIH-3T3-Fibroblasten GFP-Rootletin transient exprimiert. In einer Koimmunfluoreszenzanalyse mit pAb KLC1 (H-75) und dem Nesprin-2 Antikörper mAb K56-386 zeigte sich im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen eine Rekrutierung des endogenen KLC1 entlang der filamentären Rootletin Strukturen. Die Lokalisation von Nesprin-2 Giant bzw. N-terminalen Nesprin-2 Isoformen wurde jedoch nicht beeinflusst (Abb. 3.1.28; Pfeilspitzen in A-D und A'-D'). Um diese Daten weiterhin zu bestätigen, wurde GFP-Rootletin auch in COS7-Zellen exprimiert, in denen mAb K20-478 zur Detektion von Nesprin-2 Giant verwendet werden konnte (Zhen et al., 2002). COS7-Zellen zeigen ebenfalls eine Relokalisation des endogenen KLC1, während die Nesprin-2 Giant Färbung unverändert ist (vergleiche Abb. 3.1.28 E-H; Pfeilspitzen).

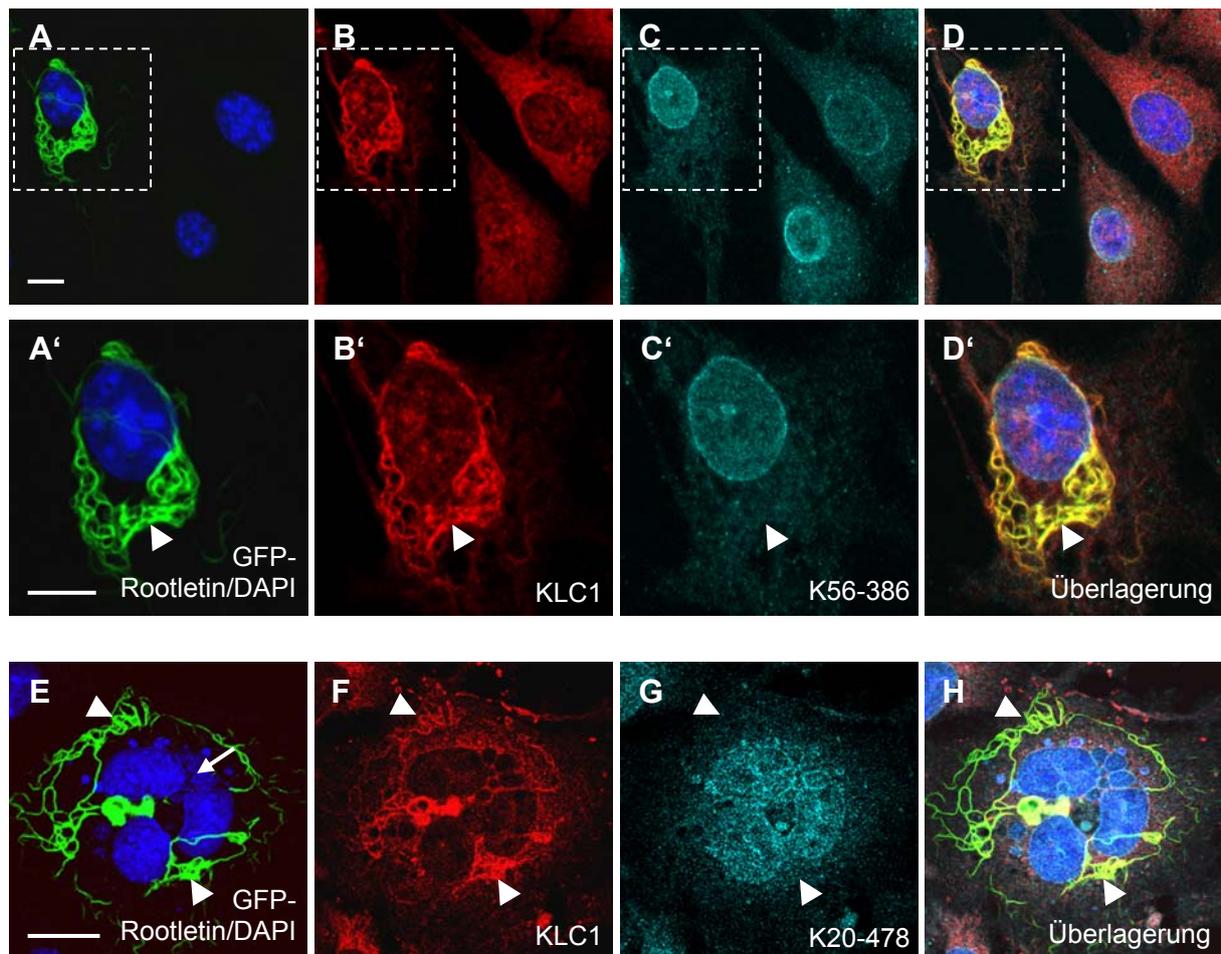


Abb. 3.1.28: Überexprimiertes Rootletin organisiert KLC1 entlang von filamentären Strukturen, wohingegen die subzelluläre Verteilung des Nesprin-2 Giant bzw. der N-terminalen Nesprin-2 Isoformen unverändert bleibt. (A-D) Kofärbung von GFP-Rootletin exprimierenden murinen NIH-3T3-Fibroblasten mit einem KLC1 spezifischen polyklonalen Antikörper und dem N-Terminus spezifischen monoklonalen Nesprin-2 Antikörper mAb K56-386. (A'-D') Vergrößerung des in Abbildung A-D gekennzeichneten Bereiches. (E-F) GFP-Rootletin transfizierte COS7-Zellen wurden in indirekten Immunfluoreszenzanalysen mit pAb KLC1 (H-75) und mAb K20-478 (Nesprin-2 Giant) behandelt. Als sekundärer Antikörper wurden anti-Kaninchen Alexa 568- und anti-Maus Alexa 647-Konjugate verwendet. Nur KLC1, nicht aber das vom N-terminalen Antikörper detektierte Nesprin-2, zeigt eine Rekrutierung entlang der Rootletinfilamente (Pfeilspitzen). Pfeil kennzeichnet den deformierten Zellkern. Balken: (A-D und A'-D') 10 µm; (E-H) 20 µm.

3.1.11.2 Umlagerung des KLC1 und der C-terminalen Nesprin-2 Isoformen entlang der überexprimierten Rootletinfilamente

Immunchemische Analysen von NIH-3T3-Fibroblasten (Abb. 3.1.29 A-D) sowie COS7-Zellen (Abb. 3.1.29 E-H), die GFP-Rootletin und Myc-KLC1 exprimieren, zeigen, dass sowohl die KLC1 spezifische Isoform 1, die in der Hefe-Zwei-Hybrid Durchmusterung identifiziert werden konnte, als auch die C-terminalen Nesprin-2 Isoformen entlang der Rootletin-Filamente rekrutiert werden (Abb. 3.1.29; Pfeilspitze in A'-D' und E'-H').

Die Daten, die mittels der Überexpression des Rootletins erzielt wurden, stimmen mit den in Abbildung Abb. 3.1.25 und Abb. 3.1.26 dargestellten zentrosomalen Kollokalisationsstudien überein. Im Gegensatz zu Nesprin-2 Giant akkumulieren pAb K1

positive Nesprin-2 Isoformen, wie auch das KLC1 an den Rootletinstrukturen. Die von Yang et al. (2006) beschriebenen nukleären Deformationen, die sich durch die Überexpression des Rootletins in MDCK-Zellen induzieren lassen, konnten zudem in NIH-3T3-Fibroblasten und in COS7-Zellen bestätigt werden (Abb. 3.1.28 E sowie Abb. 3.1.29 A und E; Pfeile).

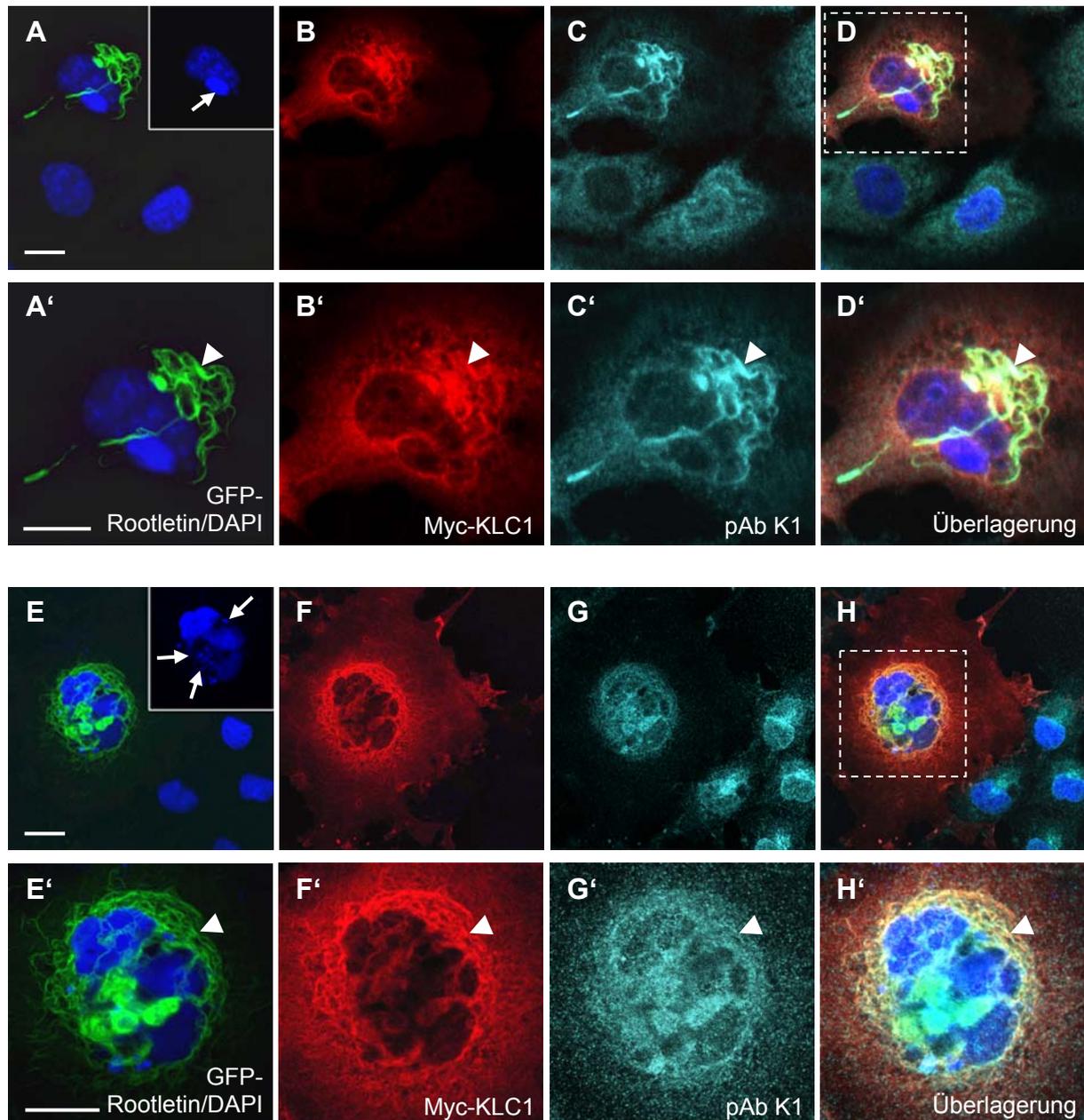


Abb. 3.1.29: Ektopisch exprimierte Rootletinfilamente führen zu einer Veränderung der Verteilung des KLC1 und der C-terminalen Nesprin-2 Isoformen in NIH-3T3-Fibroblasten und COS7-Zellen. GFP-Rootletin und Myc-KLC1 kotransfizierte NIH-3T3- (A-D) und COS7-Zellen (E-H), die mit mAb 9E10 (sekundärer Antikörper anti-Maus Alexa 568-Konjugat) und pAb K1 (sekundärer Antikörper anti-Kaninchen Alexa 647-Konjugat) gefärbt wurden, zeigen eine Rekrutierung des ektopisch exprimierten KLC1 und der C-terminalen Nesprin-2 Isoformen entlang der filamentären Rootlets (Pfeilspitzen). Die durch GFP-Rootletin induzierten nukleären Deformationen sind durch Pfeile markiert. A'-D' und E'-H' zeigen die Vergrößerung der in D bzw. H gekennzeichneten Region. Färbung der DNA mit DAPI. Balken: (A-D und A'-D') 10 µm; (E-H und E'-H') 20 µm.

3.1.11.3 Ektopisch exprimiertes Rootletin und Nesprin-2 überlagern partiell mit dem Mikrotubulizytoskelett

Yang und Li (2005) zeigten, dass die schweren Ketten des Kinesin 1 (KIF5B) an das rekombinante Rootletin Protein rekrutiert werden. Sie schlossen daraus, dass die „Coiled coil“ Domäne des KLC1, die normalerweise eine Bindung zu den schweren Ketten des Kinesin 1 vermittelt, gleichzeitig mit den Rootletinfilamenten interagieren kann. Eine Kolokalisation mit dem Mikrotubulizytoskelett konnte von Yang und Li (2005) jedoch nicht gezeigt werden.

Rootletin überexprimierende COS7-Zellen, die mit pAb K1 sowie mAb WA3 (Tubulin) gefärbt wurden, weisen eine partielle Überlagerung der Rootletin und Nesprin-2 Komplexe mit den Mikrotubuli auf (s. Abb. 3.1.30; Pfeilspitzen in A'-D'). Außerdem lässt sich eine vergleichbare Polarität der filamentären Strukturen des Rootletin und der Mikrotubuli erkennen (s. Abb. 3.1.30; Pfeile in A-D). Um den Bezug der Rootletinfilamente zum Mikrotubulisystem zu erfassen, erfolgte eine Serienaufnahme über verschiedene Schnittebenen zu einer übereinandergelagerten maximalen Projektion der GFP-Rootletin transfizierten COS7-Zellen. Die in den Querschnitten dargestellten Rootletin- und Mikrotubulifilamente zeigen eine partielle Kolokalisation (Abb. 3.1.30 E; Y-Achse und Pfeile). Filamentstrukturen, die keine korrespondierende Überlagerung des Rootletins und der Mikrotubuli aufweisen, verlaufen meist parallel zueinander (Abb. 3.1.30 E; X-Achse und Pfeile). Zusätzlich konnte in der Überlagerung mit dem pAb K1 Fluoreszenzsignal eine eindeutige Kolokalisation von Nesprin-2 und Rootletin im zweidimensionalen Maßstab bewiesen werden (Abb. 3.1.30 E'; Y-Achse und Pfeile).

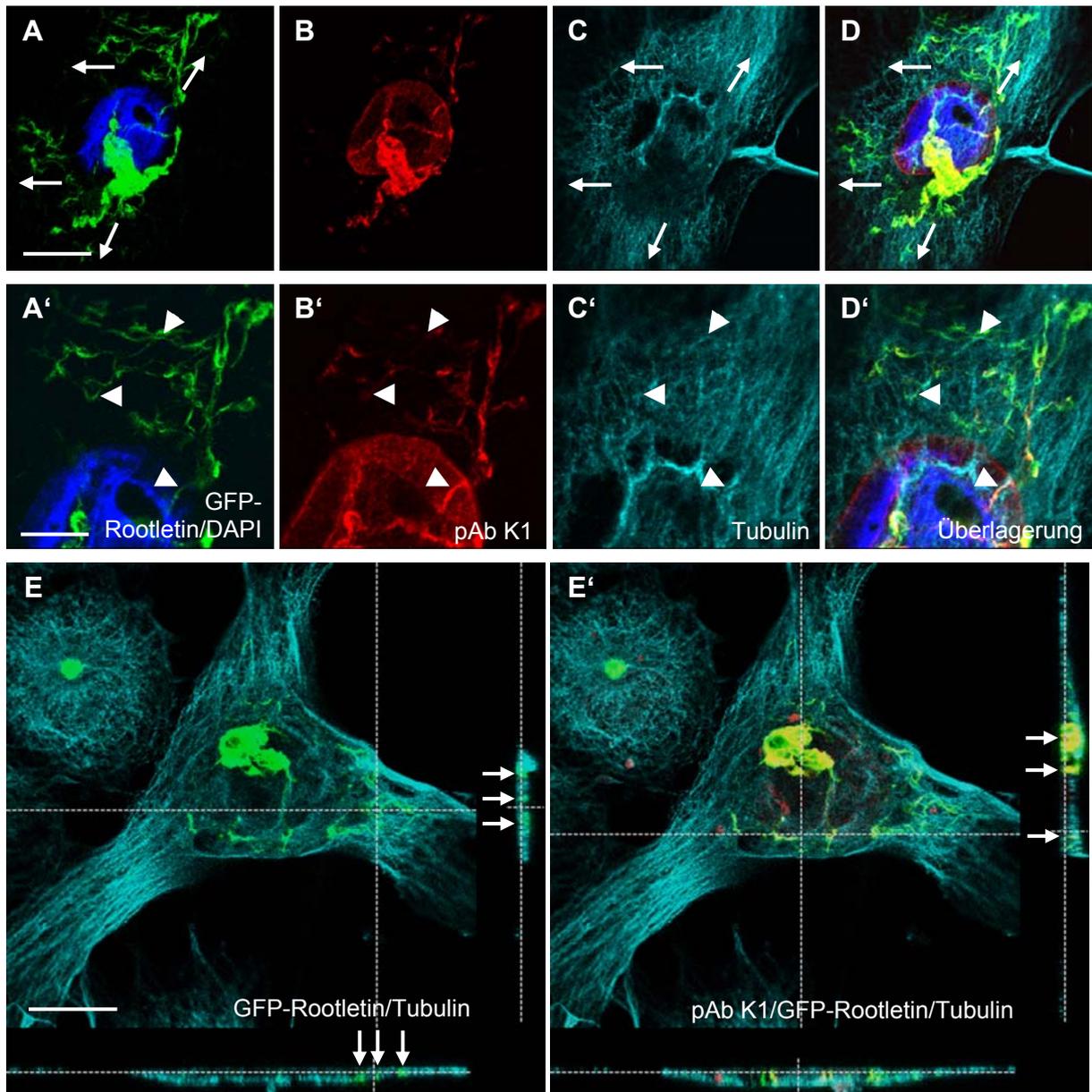


Abb. 3.1.30: Rootletin und Nesprin-2 kolokalisieren partiell entlang des Mikrotubulizytoskeletts. (A-D und A'-D') Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von GFP-Rootletin überexprimierenden COS7-Zellen mit pAb K1 (Nesprin-2; sekundärer Antikörper anti-Kaninchen Alexa 568-Konjugat) und mAb WA3 (Tubulin; sekundärer Antikörper anti-Maus Alexa 647-Konjugat). Pfeilspitzen zeigen eine partielle Kolokalisation der Rootletin und Nesprin-2 Komplexe mit dem Mikrotubulizytoskelett. Pfeile weisen eine homologe Polarität der filamentären Strukturen von Rootletin und den Mikrotubuli auf. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Balken: (A-D) 20 μm ; (A'-D') 10 μm . (E-E') Serienaufnahme, über verschiedene Schnittebenen zu einer übereinandergelagerten maximalen Projektion, der GFP-Rootletin transfizierten COS7-Zellen, die mit mAb WA3 und pAb K1 gefärbt wurden. Die gestrichelten Linien kennzeichnen die spezifischen Positionen des auf der X- und Y-Achse dargestellten Querschnitts. (E) Mikrotubuli- und GFP-Rootletinfilamente überlagern partiell (Pfeile; Y-Achse) oder verlaufen parallel zueinander (Pfeile; X-Achse). (E') Auch im zweidimensionalen Maßstab zeigt sich eine eindeutige Kolokalisation von Nesprin-2 und Rootletin (Pfeile; Y-Achse). Balken: 25 μm .

3.1.12 Nesprin-2 SR wird durch Komponenten des perizentriolären Materials rekrutiert

RFP-markiertes Pericentrin, ein „Coiled coil“ Protein, das eine Komponente des perizentriolären Materials darstellt, wurde mit Myc-SR in COS7-Zellen koexprimiert. Interessanterweise wurden in COS7-Zellen, die RFP-Pericentrin stark überexprimieren, filamentäre Pericentrinstrukturen beobachtet (Abb. 3.1.31; Pfeilspitzen in A). Diese Filamentstrukturen, die sich überwiegend entlang des Zentrosoms erkennen lassen, rufen starke nukleäre Deformationen hervor. Pericentrin kann aufgrund seiner „Coiled coil“ Struktur mit sich selbst assoziieren und die filamentären Pericentrinstrukturen ausbilden. Die Koexpression führt zu einer Rekrutierung von Myc-SR an das Zentrosom wie auch entlang des filamentären Pericentrins (Abb. 3.1.31 B und C; Pfeil bzw. Pfeilspitzen). Somit konnte neben Rootletin eine weitere zentrosomale Komponente identifiziert werden, die Nesprin-2 eventuell direkt oder indirekt bindet.

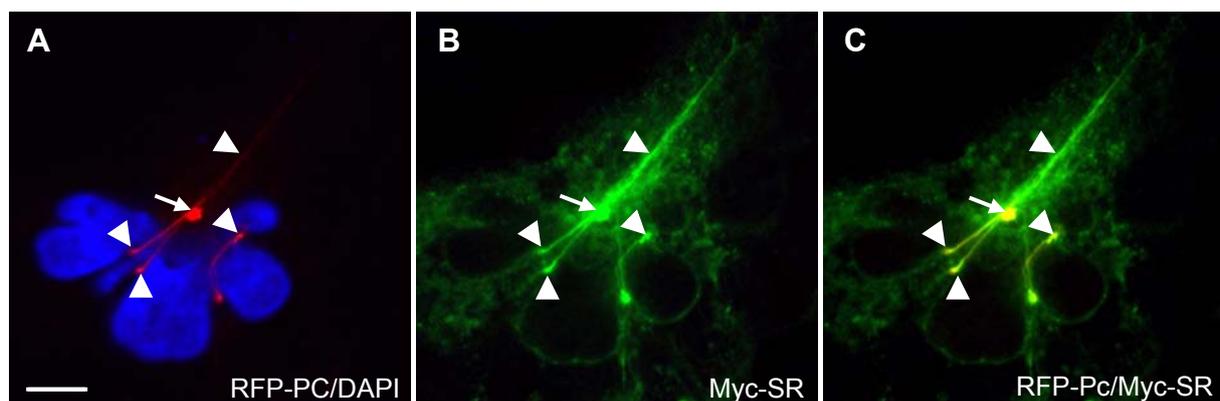


Abb. 3.1.31: RFP-Pericentrin und Myc-SR kolokalisieren an filamentären Strukturen. RFP-Pericentrin (A) und Myc-SR (B) exprimierende COS7-Zellen, die mit mAb 9E10 (sekundärer Antikörper anti-Maus Alexa 488-Konjugat) gefärbt wurden, zeigen eine Überlagerung (C) an filamentären Strukturen des Zentrosoms (Pfeilspitze). Das Zentrosom ist durch einen Pfeil markiert. Vor der Fixierung der COS7-Zellen erfolgte eine Permeabilisation, um die Myc-SR spezifischen zentrosomalen Komponenten hervorzuheben. Nuklei wurden mit DAPI markiert. Balken: 5 μ m.

3.1.13 Nesprin-2 und KLC1 beeinflussen die Lage der Zentrosomen

Lüke et al. (2008) zeigte bereits einen Einfluss von Nesprin-2 Giant auf die Lokalisation der Zentrosomen. In Nesprin-2 Giant defizienten murinen Fibroblasten wurde neben einer gestörten Zellpolarisation zusätzlich eine erhöhte Zentrosomenanzahl sowie eine veränderte Distanz zum Kern beobachtet (Lüke, 2008). Zudem weisen die bisher gezeigten Daten eine spezifische Akkumulation von Nesprin-2 und KLC1 an den zentrosomalen Komponenten Rootletin und Pericentrin auf. Um einen Einblick in die Funktion der Nesprin-2 und KLC1 Assoziation an den Zentrosomen zu erlangen, wurden die Auswirkungen der Nesprin-2 SR Überexpression, der dominant negativen Interferenz

von KASH-Domänen umfassenden Nesprinen sowie des Nesprin-2 und KLC1 Silencings auf die Lage des Zentrosoms hin untersucht.

3.1.13.1 Die Nesprin-2 SR Expression hebt die Verbindung zwischen Zentrosom und Kernmembran auf

Myc-SR exprimierende COS7-Zellen, die in einer indirekten immunchemischen Färbung mit pAb Pc-4448 (Pericentrin) und mAb 9E10 behandelt wurden, zeigen eine Überlagerung von Pericentrin und Myc-SR am Zentrosom (Abb. 3.1.32; Pfeilspitzen in A“). Außerdem ist in diesen Zellen eine Dislokation des Zentrosoms vom Zellkern zu beobachten. In der in Abbildung Abb. 3.1.32 gezeigten Zelle, beträgt der Abstand des Zentrosoms zum Nukleus 8,48 μm . In einer statistischen Analyse konnte eine durchschnittliche Entfernung der Zentrosomen vom Kern von $1,78 \pm 0,10 \mu\text{m}$ in Myc transfizierten Kontrollzellen und von $3,30 \pm 0,31 \mu\text{m}$ in Myc-SR exprimierenden COS7-Zellen bestimmt werden (Abb. 3.1.32 C und C‘). Nesprin-2 SR beeinflusst damit die Anheftung des Zentrosoms an die Kernmembran, wodurch sich die durchschnittliche Distanz in Myc-SR überexprimierenden COS7-Zellen um $\sim 1,52 \mu\text{m}$ vergrößert. Eine erhöhte Zentrosomenanzahl, wie sie in Abbildung Abb. 3.1.32 B zusehen ist, konnte in einer statistischen Kalkulation nicht bestätigt werden. Während in der Kontrolle etwa ~ 98 % der Zellen je nach Zellzyklusstadium ein oder zwei MTOCs besitzen, weisen auch die Myc-SR transfizierten Zellen mit ~ 90 % annähernd vergleichbare Werte auf. Der Anteil der Nesprin-2 SR transfizierten Zellen, die eine erhöhte MTOC Anzahl aufweisen, ist nur auf ~ 8 % erhöht (Abb. 3.1.32 D). Die Auswertung der Zentrosomenanzahl lässt somit keinen signifikanten Unterschied (t-Test: $P= 6,34\text{E-}02$) zwischen Kontroll- und Nesprin-2 SR exprimierenden COS7-Zellen erkennen.

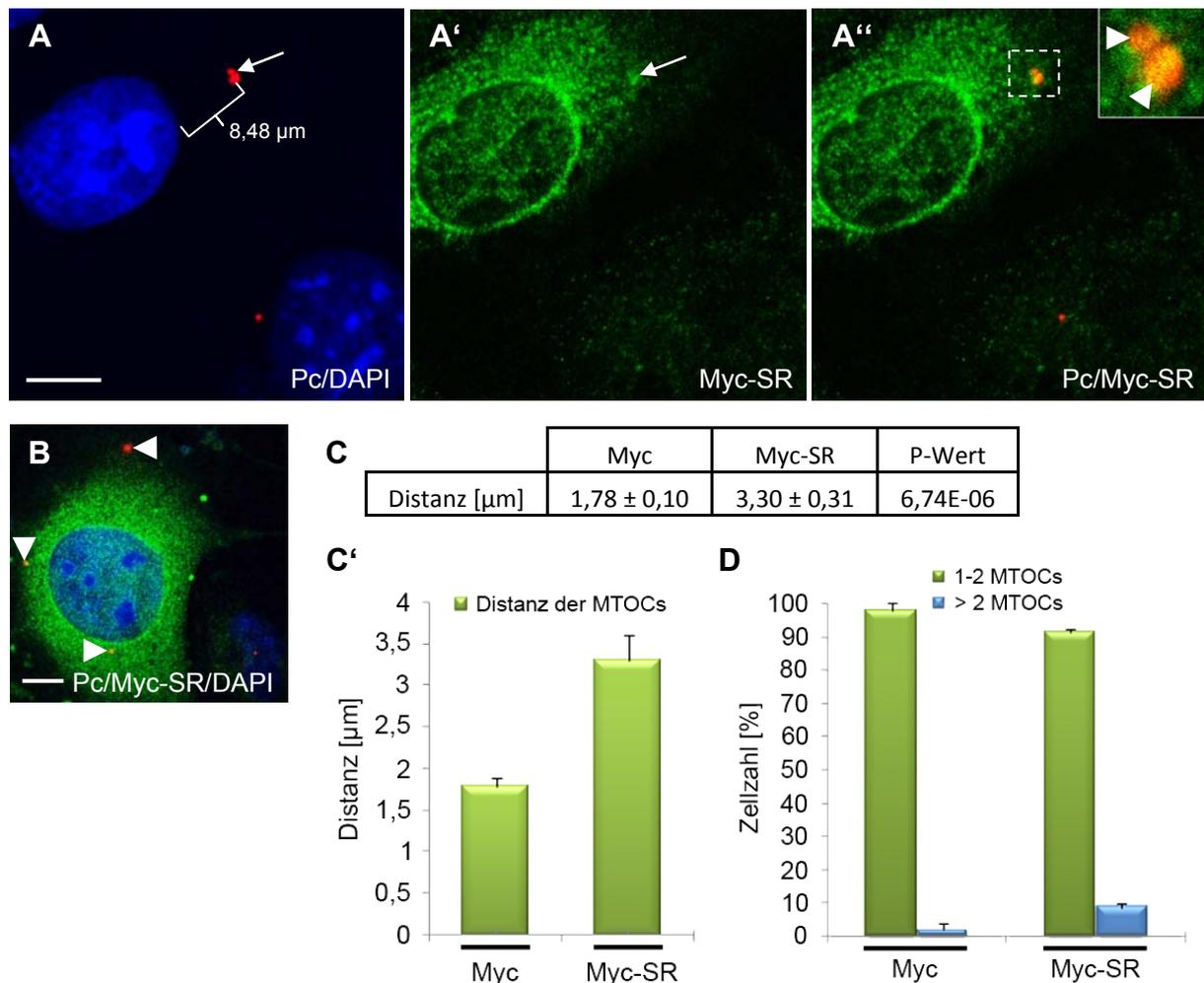


Abb. 3.1.32: Nesprin-2 SR beeinflusst die Anheftung des Zentrosoms an die Kernmembran. (A-A'') Färbung von Myc-SR transfizierten COS7-Zellen mit pAb Pc-4448 (Pericentrin) und mAb 9E10 (Myc) weisen eine erhöhte Zentrosomendistanz zum Nukleus auf (Pfeil). (B) In einigen Myc-SR transfizierten COS7-Zellen die mit pAb Pc-4448 und mAb 9E10 markiert wurden, konnte zusätzlich eine höhere Anzahl an MTOCs detektiert werden (Pfeilspitzen). Als sekundäre Antikörper wurden anti-Kaninchen Alexa 568- und anti-Maus Alexa 488-Konjugate verwendet. Färbung der nukleären DNA mittels DAPI. Balken: 10 μm . Eine statistische Auswertung zeigt die durchschnittliche zentrosomale Distanz \pm SEM („standard error of the mean“) zum Nukleus (C und C'). Jeweils 100 Zellen wurden ausgewertet. (D) Eine signifikante Erhöhung der Zentrosomenanzahl lässt sich durch eine statistische Analyse von jeweils 300 Zellen nicht bestätigen (t-Test: $P= 6,34\text{E-}02$).

3.1.13.2 KASH-Domänen haltige Nesprine verknüpfen das Zentrosom mit der Kernmembran

In einer weiteren Untersuchung wurde der Einfluss der dominant negativen Interferenz von Nesprin-1/-2 und -3 umfassenden KASH-Isoformen auf die Zentrosomenlokalisierung analysiert. In Immunfluoreszenzanalysen von stabil transfizierten GFP-SP-SUN1-CT HaCaT-Zellen mit mAb GTU-88 (γ -Tubulin) und pAb K1 lässt sich ein vergrößerter Abstand der MTOCs zu den Nuklei erkennen (Abb. 3.1.33; Pfeile in A). An diesen Zentrosomen konnten C-terminale Nesprin-2 Isoformen nachgewiesen werden (Abb. 3.1.33; Pfeile in A' sowie Vergrößerungen und Pfeilspitzen in A''). Wie in Abb. 3.1.33 A'' dargestellt führt sogar nur eine partielle Verdrängung des Nesprin-2 von der Kernhülle zu

solch einem zentrosomalen Phänotyp. Diese Resultate lassen vermuten, dass die KASH-Domänen umfassenden Nesprine, die durch die Überexpression von GFP-SP-SUN1-CT von der Kernhülle verdrängt werden, eine Funktion in der Verankerung des Zentrosoms besitzen, wobei die Zentrosomen-gebundenen C-terminalen Nesprin-2 Isoformen nach wie vor mit dem MTOC assoziieren.

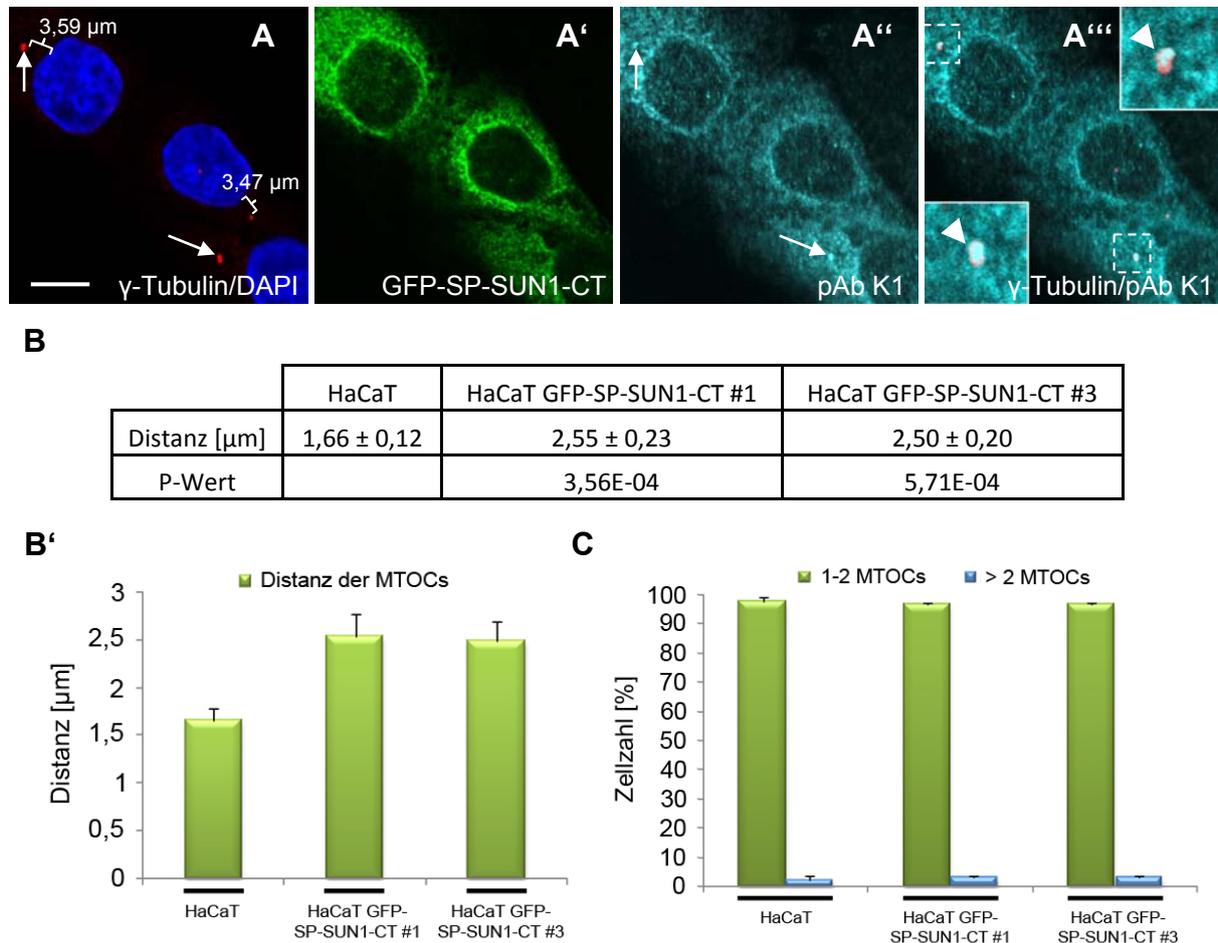


Abb. 3.1.33: Die dominant negative Interferenz von KASH-Domänen umfassenden Proteinen führt zu einer Dissoziation des Zentrosoms vom Zellkern. (A-A''') Stabil transfizierte GFP-SP-SUN1-CT HaCaT-Zellen, die mit einem mAb GTU-88 (γ -Tubulin; sekundärer Antikörper anti-Maus Alexa 568-Konjugat) und einem pAb K1 (Nesprin-2; sekundärer Antikörper anti-Kaninchen Alexa 647-Konjugat) gefärbt wurden, zeigen trotz erhöhter Zentrosomenabstände zum Nukleus eine Anlagerung der C-terminalen Nesprin-2 Isoformen am MTOC (Pfeile). Nuklei wurden mit DAPI markiert. Balken: 10 μm . (B und B') In Kontroll-HaCaT-Zellen und stabil exprimierenden GFP-SP-SUN1-CT HaCaT-Zellen (Klon #1 und #3) wurde der durchschnittliche Zentrosomenabstand \pm SEM („standard error of the mean“) durch eine statistische Analyse von je 100 Zellen erfasst. (C) Statistische Studie der MTOC Anzahl von einer Kontroll- und stabil transfizierten Keratinozyten-Zelllinie, wobei je 300 Zellen ausgewertet wurden.

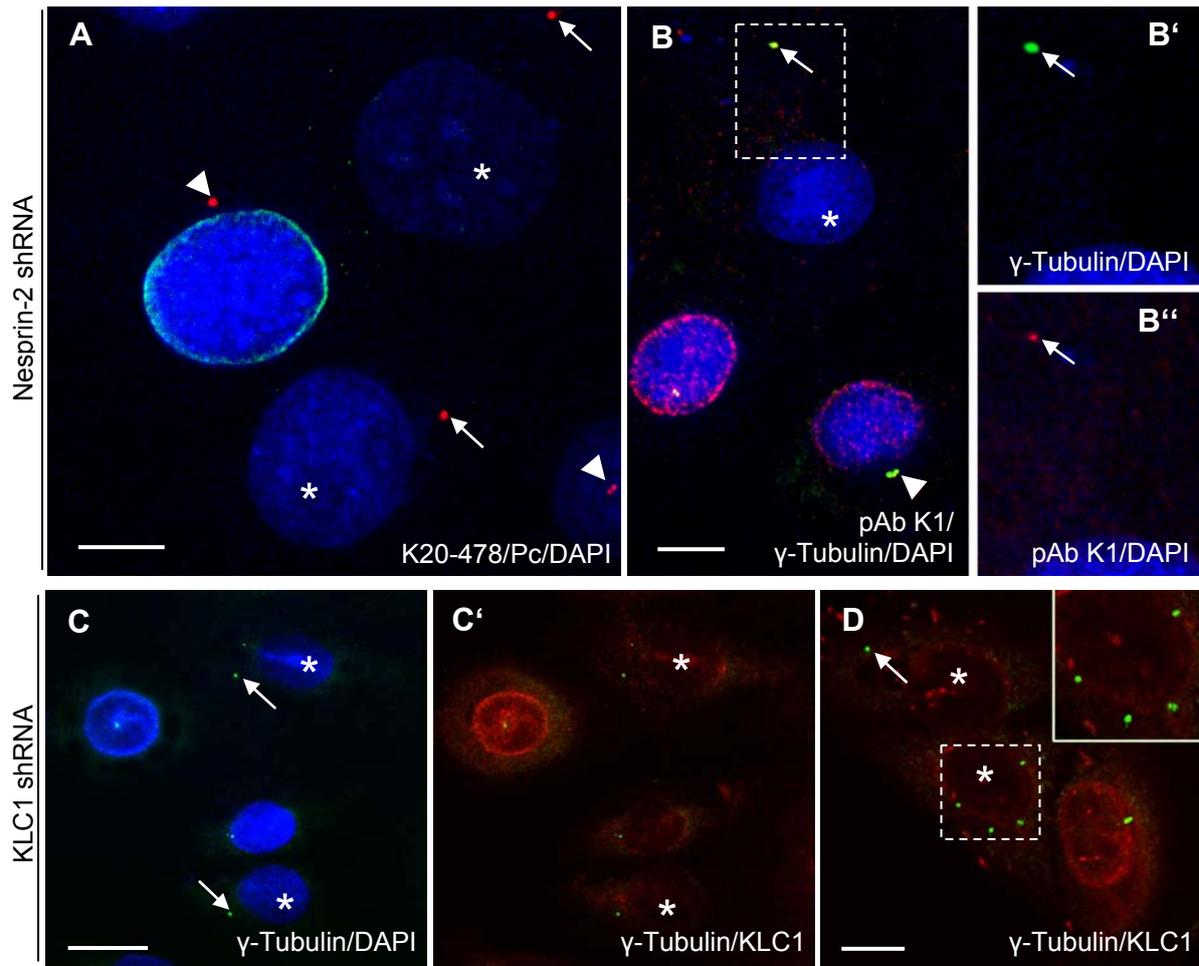
In statistischen Analysen wurde der Durchschnitt der Nukleus-Zentrosomendistanz \pm SEM in nicht transfizierten HaCaT-Kontrollzellen und in zwei stabil exprimierenden GFP-SP-SUN1-CT HaCaT-Klonen bestimmt. Während in der Kontrolle das MTOC durchschnittlich $1,66 \pm 0,12 \mu\text{m}$ vom Zellkern entfernt ist, vergrößert sich der Abstand in den dominant negativen SP-SUN1-CT HaCaT-Zellen signifikant auf $2,55 \pm 0,23 \mu\text{m}$ (Klon

#1; t-Test: $P=3,56E-04$) bzw. auf $2,50 \pm 0,20 \mu\text{m}$ (Klon #3; t-Test: $P=5,71E-04$) (Abb. 3.1.33 B und B'). In der statistischen Quantifizierung der Zentrosomenzahl konnte weder im GFP-SP-SUN1-CT Klon #1 noch im Klon #3 ein Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden (s. Abb. 3.1.33 C). Demzufolge beeinträchtigen die Nesprin-1/-2 und -3 KASH Isoformen nur die zentrosomalen Abstände zum Zellkern, die Zentrosomenamplifikation ist jedoch nicht verändert.

3.1.13.3 Nesprin-2 und KLC1 Silencing verändert die Zentrosomenlokalisierung

Um einen möglichen Einfluss des Nesprin-2 sowie des KLC1 auf die zentrosomale Positionierung zu evaluieren, wurde die Wirkung der Nesprin-2 sowie der KLC1 shRNA auf das Zentrosom in HaCaT-Zellen analysiert. Immunfluoreszenzanalysen mit mAb K20-478 (Nesprin-2 Giant) und pAb Pc-4448 (Pericentrin) sowie pAb K1 (Nesprin-2) und mAb GTU-88 (γ -Tubulin) weisen in Nesprin-2 shRNA transfizierten Zellen einen vollständigen Verlust des Kernmembran-spezifischen Nesprin-2 Giant auf. Das Nesprin-2 Giant Silencing induziert wie auch die Überexpression des Nesprin-2 SR und die dominant negative KASH-Protein Interferenz, einen erhöhten Zentrosomenabstand zum Nukleus (Abb. 3.1.34 A und B; Stern sowie Pfeil). Vereinzelt lässt sich eine große Distanz des MTOCs zum Nukleus beobachten, wohingegen in nicht transfizierten HaCaT-Zellen keine Veränderung der Zentrosomenposition beobachtet werden konnte (Abb. 3.1.34; Pfeilspitzen in A und B). Interessanterweise lassen sich auch in diesem Versuchsansatz trotz der großen zentrosomalen Abstände und des Nesprin-2 Giant knock downs pAb K1 positive Isoformen am Zentrosom detektieren (Abb. 3.1.34; Pfeile in B-B''). Diese Resultate weisen auf eine funktionelle Bedeutung der Nesprin-2 KASH-Domänen umfassenden Isoformen in der Nuklearmembran-spezifischen zentrosomalen Verankerung hin.

HaCaT-Zellen, die mit einer KLC1 shRNA transfiziert und mit mAb GTU-88 sowie pAb KLC1 (H-75) gefärbt wurden, zeigen eine 80-90 prozentige Reduzierung des KLC1 Fluoreszenzsignals. KLC1 knock down Zellen weisen im Vergleich zu nicht transfizierten HaCaT-Zellen einen vergrößerten Zentrosomen-Kernabstand (s. Abb. 3.1.34 C und C'; Sterne und Pfeile) sowie eine erhöhte Anzahl der Zentrosomen auf (s. Abb. 3.1.34; Vergrößerung in D).



E

	Kontroll shRNA	KLC1 shRNA	Nesprin-2 shRNA
Distanz [μm]	1,51 \pm 0,08	4,09 \pm 0,21	3,63 \pm 0,21
P-Wert		3,38E-26	1,93E-17

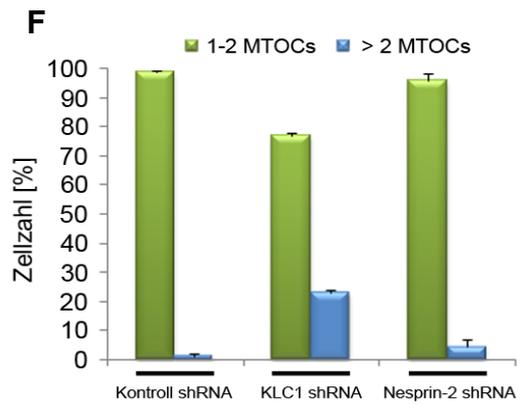
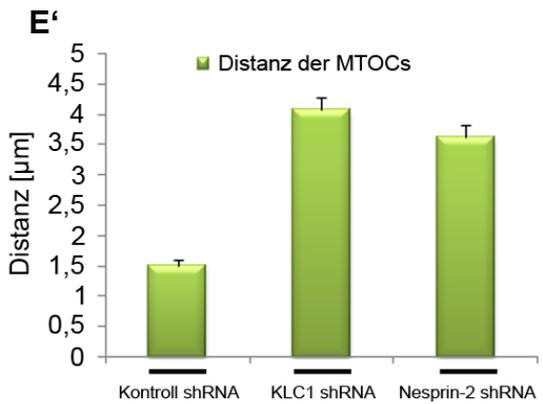
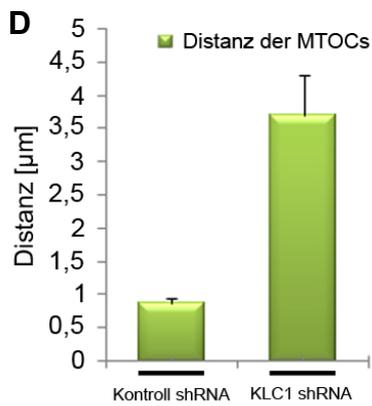
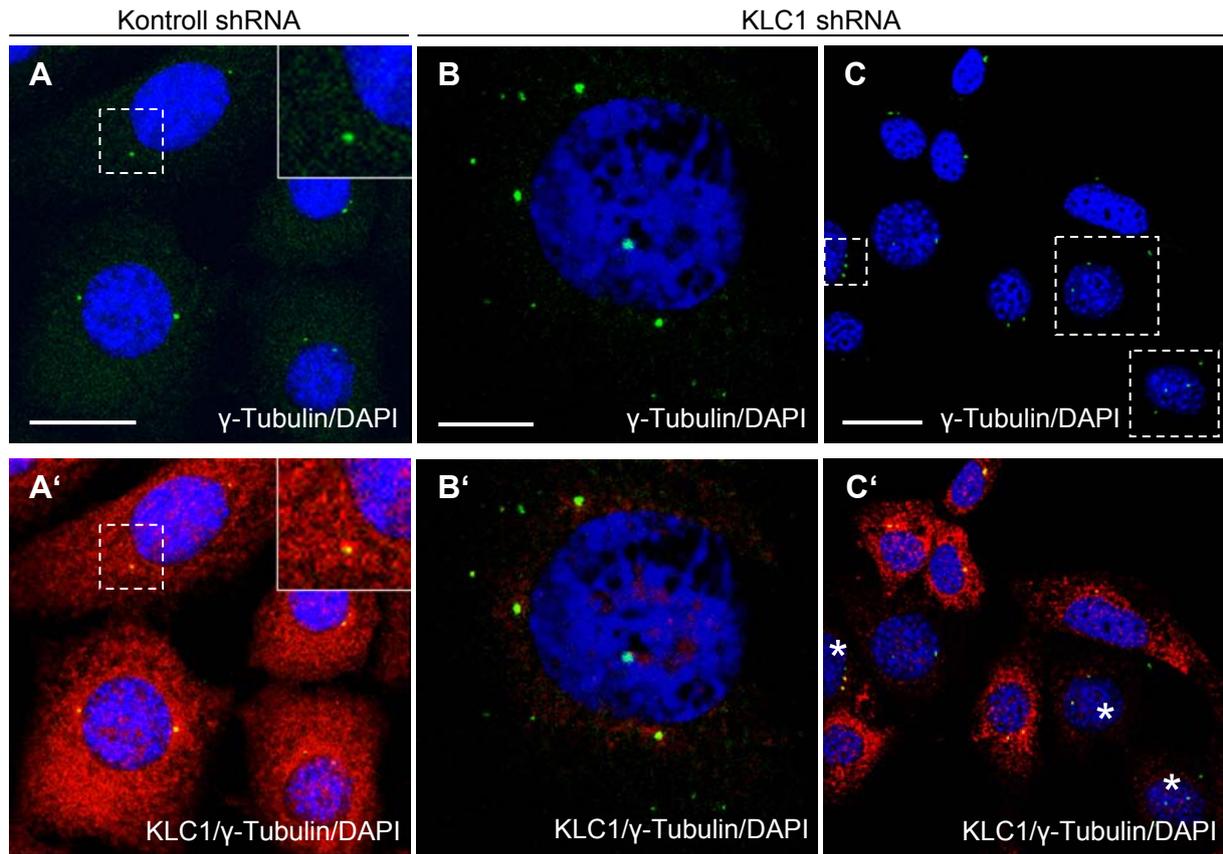


Abb. 3.1.34: Nesprin-2 sowie KLC1 Silencing beeinflusst die Lage der Zentrosomen. (A und B) Immunfluoreszenzanalyse von Nesprin-2 shRNA transfizierte HaCaT-Zellen mit Antikörpern gegen Nesprin-2 (A; mAb K20-478, B; pAb K1) und das Zentrosom (A; pAb Pc-4448, Pericentrin; B; mAb GTU-88, γ -Tubulin). (C, C' und D) KLC1 shRNA transfizierte HaCaT-Zellen, die mit mAb GTU-88 und pAb KLC1 (H-75) gefärbt wurden. Als sekundäre Antikörper wurden anti-Kaninchen Alexa 568- und anti-Maus Alexa 488-Konjugate verwendet. Kernfärbung mit DAPI. Balken: (A, B und D) 10 μm ; (C) 20 μm . (E und E') Eine statistische Analyse zeigt in KLC1 sowie Nesprin-2 knock down Zellen einen vergrößerten durchschnittlichen Abstand \pm SEM der MTOCs zu den Nuklei. (F) Das KLC1 Silencing führt zu einer signifikanten Erhöhung der Zentrosomenanzahl (t-Test: $P=1,65\text{E-}03$). Ein erhöhter Abstand und eine erhöhte Anzahl der Zentrosomen wurden durch eine Auswertung von jeweils 300 Zellen nachgewiesen.

Statistische Auswertungen bestätigten die zentrosomalen Phänotypen der Nesprin-2 und KLC1 shRNA. Die durchschnittliche Zentrosomenentfernung \pm SEM zum Zellkern von $1,51 \pm 0,08 \mu\text{m}$ in der Kontroll shRNA ist signifikant auf $4,09 \pm 0,21 \mu\text{m}$ in der KLC1 shRNA erhöht sowie auf $3,63 \pm 0,21 \mu\text{m}$ in den HaCaT-Zellen, die einen Nesprin-2 knock down aufweisen (Abb. 3.1.34 E und E'). Vereinzelt lassen sich in KLC1 knock down Zellen mehrere MTOCs erkennen. Im Gegensatz zu Zellen mit Kontroll shRNA und Nesprin-2 shRNA, bei denen nur 99 % bzw. 96 % der Zellen je nach Zellzyklusstadium ein oder zwei MTOCs besitzen, ist der Anteil der KLC1 shRNA transfizierten HaCaT-Zellen, die eine normale MTOC Anzahl zeigen, auf 77 % reduziert. Somit konnte in 23 % der KLC1 knock down Zellen eine signifikante Störung (t-Test: $1,65\text{E-}03$) der für die Zellteilung wichtige Zentrosomenamplifikation festgestellt werden (Abb. 3.1.34 F).

Um den neuen Effekt des KLC1 Silencing auf das Zentrosom zu bestätigen, wurde der Effekt der KLC1-spezifische shRNA in einer murinen Fibroblasten-Zelllinie (NIH-3T3) analysiert. NIH-3T3-Fibroblasten, die nach der KLC1 shRNA Transfektion mit mAb GTU-88 (γ -Tubulin) und pAb KLC1 (H-75) gefärbt wurden, zeigen einen nahezu identischen zentrosomalen Phänotyp wie für HaCaT-Zellen beschrieben. In KLC1 knock down NIH-3T3-Zellen ist sowohl die Distanz als auch die Anzahl der MTOCs gestört (Abb. 3.1.35 B, B' und C-C'''). In Kontroll shRNA transfizierten NIH-3T3-Zellen sind die Zentrosomen nah am Nukleus lokalisiert (Entfernung des Zentrosoms vom Zellkern $0,89 \pm 0,07 \mu\text{m}$), während sich der Abstand im KLC1 knock down auf $3,70 \pm 0,61 \mu\text{m}$ erhöht (Abb. 3.1.35 D und D'). Die statistische Auswertung der Zentrosomenanzahl lässt erkennen, dass im Gegensatz zur Kontrolle, in der 91 % der Zellen eine normale MTOC Anzahl (1-2 MTOCs) besitzen, im KLC1 knock down nur etwa 48 % der Zellen ein bis zwei MTOCs aufzeigen. Somit ist der Anteil der KLC1 shRNA transfizierten Zellen, die eine abnormale Zentrosomenanzahl besitzen, bis auf 52 % erhöht (Abb. 3.1.35 E). Der KLC1 knock down zeigt in 7 % der NIH-3T3-Fibroblasten drei MTOCs, in 26 % vier Zentrosomen und in 19 % der Zellen mehr als vier MTOCs (Abb. 3.1.35 E'), wobei in einigen der Zellen sogar bis zu 20 MTOCs nachgewiesen werden konnten.



D'

	Kontroll shRNA	KLC1 shRNA	P-Wert
Distanz [μm]	0,89 ± 0,07	3,70 ± 0,61	2,18E-05

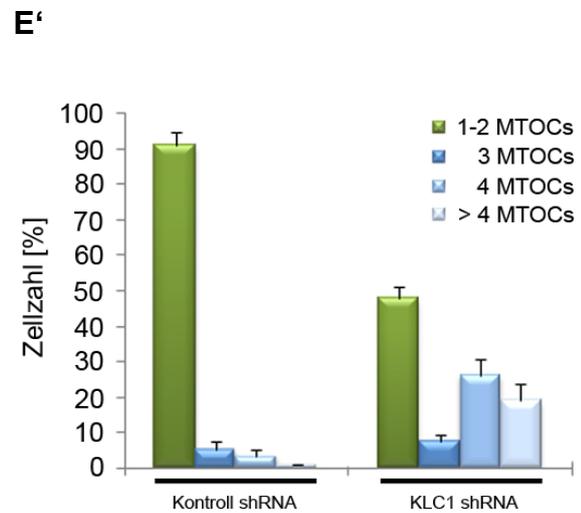
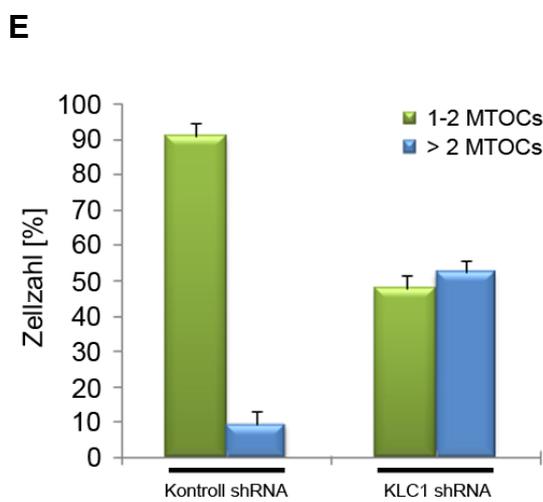
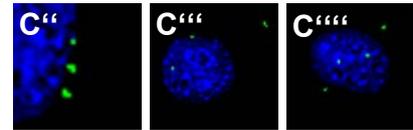


Abb. 3.1.35 (vorherige Seite) KLC1 Silencing in NIH-3T3-Fibroblasten erhöht die Zentrosomenzahl und die Distanz zum Nukleus. (A-C und A'-C') Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von Kontroll- sowie KLC1-shRNA transfizierten NIH-3T3-Zellen mit mAb GTU-88 (γ -Tubulin; sekundärer Antikörper anti-Maus Alexa 488-Konjugat) und pAb KLC1 (H-75) (sekundärer Antikörper anti-Kaninchen Alexa 568-Konjugat). Nuklei wurden mit DAPI gefärbt. Balken: (A und C) 20 μm ; (B) 10 μm . (D und D') Messung der zentrosomalen Distanzen zum Zellkern in Kontroll- und KLC1 knock down NIH-3T3-Zellen. Das KLC1 Silencing führt zu einer signifikanten Vergrößerung der durchschnittlichen zentrosomalen Distanz \pm SEM. Es wurden 100 transfizierte Zellen ausgewertet. (E) KLC1 shRNA transfizierte Zellen lassen eine signifikante Erhöhung der Zentrosomenanzahl erkennen (t-Test: $P=3,05E-3$). (E') Detaillierte graphische Darstellung der verschiedenen MTOC Anzahlen in Kontroll- und KLC1 knock down NIH-3T3-Zellen. Es wurden für jede Zelllinie jeweils 450 Zellen analysiert.

3.1.14 KLC1 beeinflusst die Polarisation von HaCaT-Zellen

Die Kommunikation zwischen Kernhülle und Zytoskelett ist für den Mechanismus der nukleären Positionierung und Migration von ausschlaggebender Bedeutung (Starr, 2007). Nesprin-2 und seine in niederen Eukaryoten beschriebenen Orthologen sind als Kernhüllen-spezifische Komponenten in diesen Mechanismus involviert (Rosenberg-Hasson et al., 1996; Starr und Han, 2002 und 2003; Yu et al., 2006; Lüke et al., 2008).

Aufgrund der bisherigen Resultate kann vermutet werden, dass KLC1 als ein neues Bindeglied zwischen Kernmembran und Zytoskelett an der nukleären Positionierung und Migration beteiligt ist. Da sowohl die Kernmigration als auch die Kernpositionierung für die Polarität der Zelle entscheidend sind (Gomes et al., 2005), wurde der Einfluss des KLC1 auf die Zellpolarität untersucht. Eine humane Keratinozyten-Zelllinie (HaCaT) wurden mit einer Kontroll- sowie KLC1-shRNA transfiziert und zu einem konfluenten Zellrasen kultiviert. Nach einer Verwundung des Zellrasens („scratch-Assay“) wurden die Zentrosomen der HaCaT-Zellen mit pAb Pc-4448 (Pericentrin) gefärbt. In polarisierten Zellen reorientiert sich das Zentrosom und positioniert sich zwischen dem Zellkern und der Migrationsfront. Kontroll-HaCaT-Zellen weisen eine Repositionierung des Zentrosoms in einem Radius von 120° zwischen Zellkern und Wunde auf (Abb. 3.1.36 A). In 55 % der KLC1 shRNA transfizierten HaCaT-Zellen zeigt das Zentrosom jedoch eine nicht polarisierte Lage (Abb. 3.1.36 B und B'; Sterne und Pfeilspitzen). In KLC1 knock down Zellen konnten somit neben der gestörten Zentrosomenamplifikation und der erhöhten Zentrosomendistanz zum Nukleus zusätzliche Defekte in der Zellpolarisierung beobachtet werden.

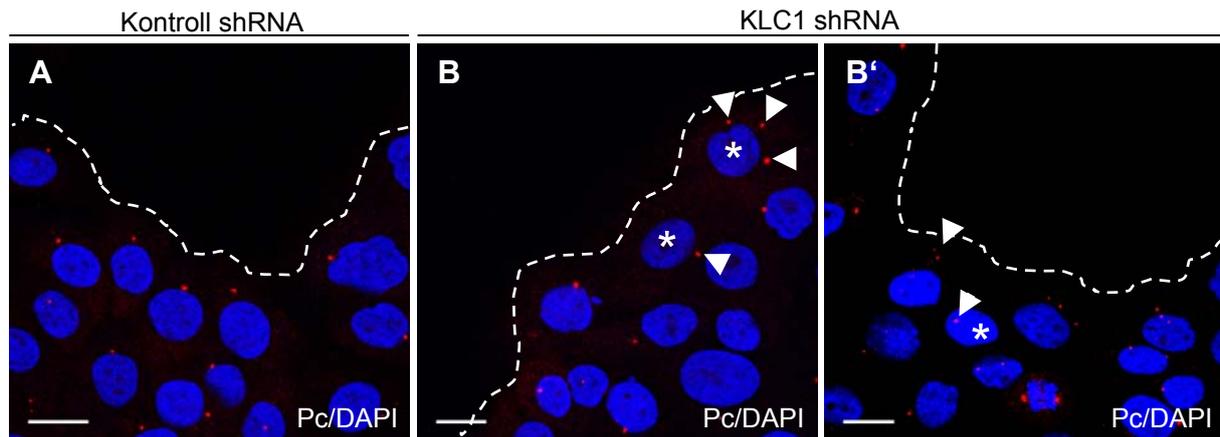


Abb. 3.1.36: Der Verlust von KLC1 in HaCaT-Zellen beeinträchtigt die Zellpolarisierung. Sechs Stunden nach einer Verwundung des Zellrasens von Kontroll- (A) und KLC1-shRNA transfizierten (B, B') HaCaT-Zellen wurde eine indirekte Immunfluoreszenzanalyse mit pAb Pc-4448 gegen Pericentrin durchgeführt. Als sekundärer Antikörper wurde ein anti-Kaninchen Alexa 568-Konjugat verwendet. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die gestrichelte Linie repräsentiert die Zellmigrationsfront. Zellen deren Zentrosomen in einem Winkel von 120° zwischen Zellkern und Migrationsfront ausgerichtet sind, wurden als polarisiert betrachtet. Der KLC1 knock down zeigt neben der erhöhten Zentrosomenanzahl und Distanz vom Nukleus eine defekte Zellpolarisierung (B und B'; Pfeilspitzen und Stern). Balken: 20 μm .

3.1.15 Die Effekte der dominant negativen Interferenz von KASH-Domänen umfassenden Nesprinen auf den TGF- β -Signalweg

Da Kinesin 1 eine essentielle Komponente im TGF- β -Signalweg darstellt und den nukleären Transport der Smad Proteine vermittelt (Batut et al., 2007), wurde der Einfluss der dominant negativen Interferenz von KASH-Domänen umfassenden Nesprinen auf die Akkumulation der Smad Proteine im Zellkern untersucht. Nach Anschaltung des Signalwegs durch die Zugabe von TGF- β wurden Kontroll-HaCaT-Zellen wie auch stabil transfizierte GFP-SP-SUN1-CT HaCaT-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert und mit einem monoklonalen Smad 2/3 Antikörper gefärbt. Im Vergleich zu den Kontrollzellen zeigen die GFP-SP-SUN1-CT überexprimierenden Zellen eine schwächere bzw. zeitlich verzögerte Smad Akkumulation im Nukleus (Abb. 3.1.37; Pfeilspitzen in A-F und G-L). Um diese Beobachtung zu evaluieren, erfolgte eine statistische Auswertung der nukleären Smad Akkumulation in den Kontroll- sowie dominant negativen Zellen über eine Zeitspanne von 30 min (Abb. 3.1.37 M). Dabei weisen 98 % der nicht mit TGF- β behandelten Zellen (0 min) eine zytoplasmatische Lokalisation der Smad Proteine auf, wohingegen nur 2 % der Zellen nukleäre Smads erkennen lassen.

Prozent der transfizierten bzw. nicht transfizierten Zellen weisen eine Anhäufung der Smads im Zellkern auf. Interessanterweise zeigt die Kontrolle 10-30 min nach TGF- β Induktion einen stetigen Anstieg von 19 auf 96 % der Zellen mit nukleären Smad Akkumulationen, während in den experimentellen Zellen (dominant negative Interferenz) in dieser Zeiteinheit nur ein Anstieg von 15 auf 42 % der Zellen erkennbar ist. Die dominant negative Interferenz von KASH-Domänen Proteinen führt somit zu einer verringerten bzw. zeitlich verzögerten Akkumulation der Smad Proteine im Kern. Diese Daten weisen auf einen Einfluss von Nesprin auf die Funktionalität des Kinesin 1 an der Kernmembran hin und stören so den TGF- β Signalweg.

3.1.16 Nesprine beeinflussen die zelluläre Verteilung von Mitochondrien

Basierend auf dem Phänotyp von ANC-1 Mutationen in *C. elegans*, der eine abnormale Anhäufung von Mitochondrien repräsentiert (Hedgecock und Thomson, 1982; Starr und Han, 2002), wurde angenommen, dass die Nesprine in höheren Eukaryoten einen vergleichbaren Einfluss auf die Mitochondrien Positionierung aufweisen. Zudem zeigten Khodjakov et al. (1998), dass KLC1 mit den Mitochondrien kolokalisiert. Aufgrund dieser Literaturhinweise wurde die Beteiligung dieser Proteine in der mitochondrialen Verteilung weitergehend analysiert. Durch die Markierung von GFP-KLC1 transfizierten COS7-Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker konnte eine partielle korrespondierende Überlagerung der im Hefe-Zwei-Hybrid System identifizierten KLC1 Isoform 1 und den Mitochondrien verifiziert werden (Abb. 3.1.38; Vergrößerung).

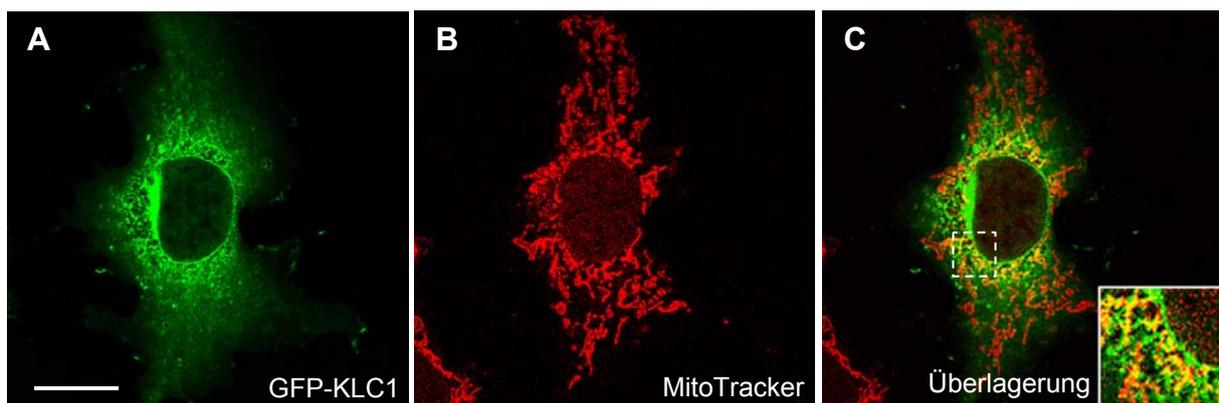


Abb. 3.1.38: KLC1 kolokalisiert partiell mit den Mitochondrien in COS7-Zellen. GFP-KLC1 exprimierende COS7-Zellen (A), die vor der Fixierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker (MitoTracker[®]Red CMXRos) markiert wurden (B), zeigen eine partielle Überlagerung des GFP-KLC1 und der Mitochondrien (C; der markierte Bereich ist vergrößert dargestellt). Balken: 20 μ m.

Der Einfluss der Nesprine auf die Positionierung der Mitochondrien wurde anhand der dominant negativen Interferenz der KASH-Domänen beinhaltenden Nesprine untersucht. Kontroll-HaCaT-Zellen und zwei verschiedene Klone von stabil transfizierten GFP-SP-

SUN1-CT HaCaT-Zellen wurden über Nacht ohne Serum kultiviert, wobei diese Behandlung zu einer perinukleären Ansammlung der Mitochondrien führt. Nach einer einstündigen Seruminkubation und einer Fluoreszenzfärbung der Mitochondrien lassen sich eindeutige mitochondriale Defekte erkennen. Während in den Kontrollzellen eine Repositionierung der Mitochondrien bis hin zur Zellperipherie beobachtet wird (Abb. 3.1.39 A), zeigen die dominant negativen Zellen eine Akkumulation der mitochondrialen Strukturen nahe dem Zellkern (Abb. 3.1.39 B und C). Somit konnte auch für die in höheren Eukaryoten beschriebenen Nesprine anhand der dominant negativen Interferenz eine gestörte Repositionierung und demzufolge eine Anhäufung der Mitochondrien an den Nuklei nachgewiesen werden. Die Abwesenheit der Kernmembran-gebundenen Nesprine in den experimentellen HaCaT-Zellen wurde bereits von Lu, 2007 gezeigt.

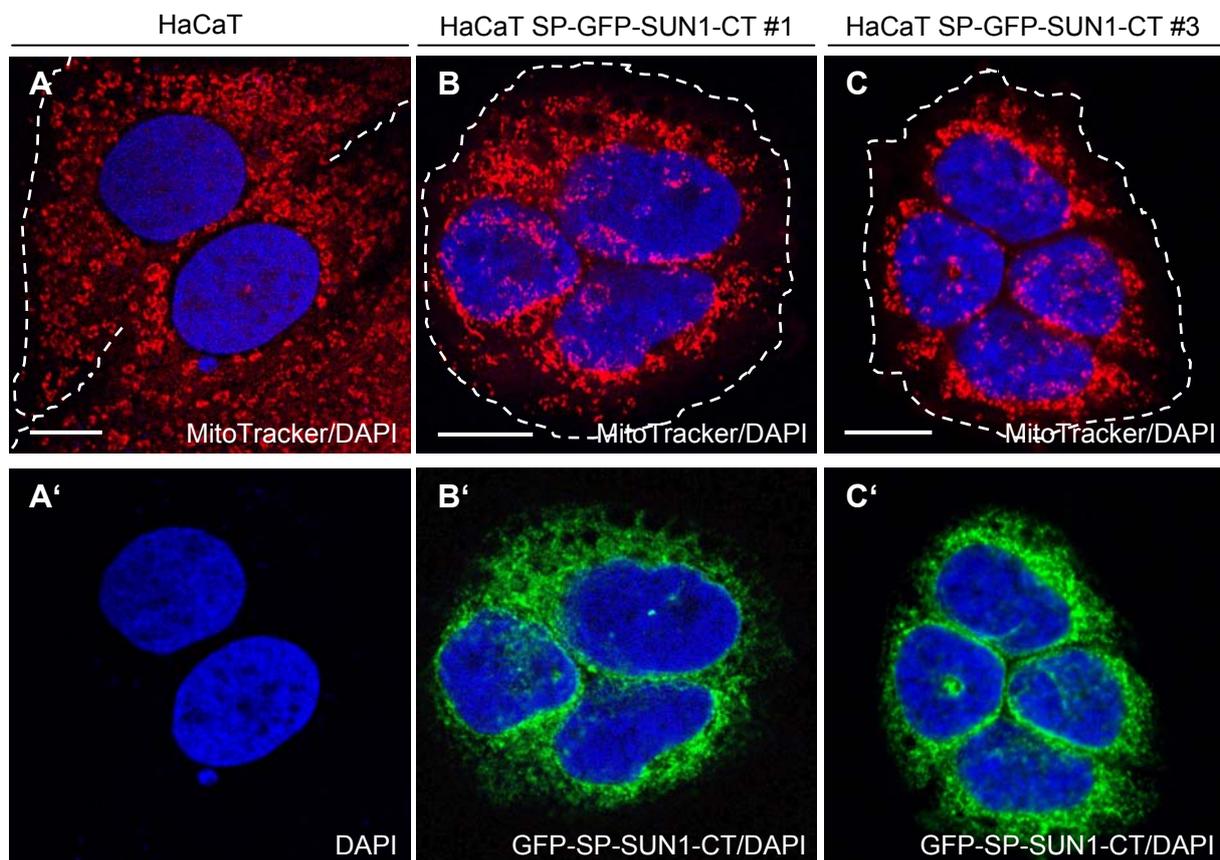


Abb. 3.1.39: Die Kernhüllen-spezifischen Nesprine beeinflussen die Positionierung von Mitochondrien in HaCaT-Zellen. Hungernde Kontroll-HaCaT-Zellen (A) und stabil GFP-SP-SUN1-CT exprimierende HaCaT-Zellen (zwei verschiedene Klone; B und C) wurden mit einem rot fluoreszierenden mitochondrialen Marker (MitoTracker[®]Red CMXRos) gefärbt. Färbung der Kerne mit DAPI. Die dominant negativen Zellen lassen im Vergleich zur Kontrolle eine Stunde nach Serumzugabe einen Defekt in der mitochondrialen Repositionierung und eine Anhäufung der Mitochondrien in Nähe der Nuklei erkennen. Die Zellperipherie ist durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet. Balken: 10 μ m.

3.2 Identifizierung neuer Proteininteraktionen für Nesprin-1

Nesprin-1 Giant besitzt wie auch das zu 65 % homologe Nesprin-2 (Warren et al., 2005) aufgrund seiner immensen Größe (1 MDa) und Domänenorganisation eine vielseitige Basis für Protein-Protein Assoziationen (Abb. 3.2.1). Um potentielle Nesprin-1 Bindepartner zu bestimmen, wurde eine kleine Nesprin-1-165 Isoform (165 kDa), die den N-Terminus des Nesprin-1 Giant umfasst (Abb. 3.2.1; AS 1-1431 von Nesprin-1 Giant) mit der Gal4-DNA-Bindungsdomäne fusioniert (BD-Nesprin-1-165) und im Rahmen einer Hefe-Zwei-Hybrid cDNA-Bank Durchmusterung als Köderprotein verwendet. Da sich Nesprin-1-165 primär im neuronalen Gewebe nachweisen lässt, wurde eine humane Gehirn-spezifische cDNA Bank für das Hefe-Zwei-Hybrid System verwendet.

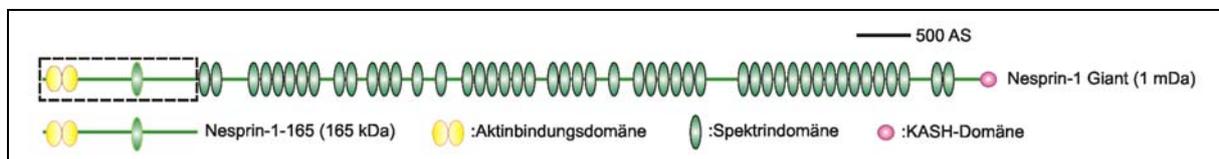


Abb. 3.2.1: Domänenstruktur von Nesprin-1 Giant und Nesprin-1-165. Schematische Repräsentation der größten Nesprin-1 Isoform sowie der kleinen Gehirn-spezifischen Nesprin-1-165 Isoform. Nesprin-1-165 enthält den N-Terminus von Nesprin-1 Giant (AS 1-1431; 165 kDa).

3.2.1 p150 Glued, ein neuer Partner von Nesprin-1-165

Durch die cDNA-Bank Durchmusterung konnten für Nesprin-1-165 drei unabhängige Dynactin (p150 Glued) Hefeklone isoliert und identifiziert werden (Schneider, 2005). Um die Nesprin-1-165/p150 Glued Interaktion zu validieren, wurde einer der p150 Glued Klone (AD-p150 Glued⁶³⁸⁻¹²⁷⁸) mit BD-Nesprin-1-165 erneut in Hefen koexprimiert (Abb. 3.2.2). Die Bindung zwischen Nesprin-1-165 und p150 Glued konnte mittels des Hefe-Zwei-Hybrid Systems verifiziert werden.

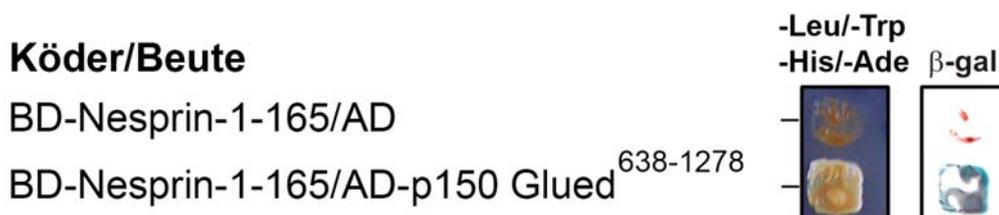


Abb. 3.2.2: p150 Glued⁶³⁸⁻¹²⁷⁸ assoziiert mit Nesprin-1-165. Die Abbildung zeigt das Wachstum der mit BD-Nesprin-1-165/AD (Negativ-Kontrolle) sowie BD-Nesprin-1-165/AD-p150 Glued⁶³⁸⁻¹²⁷⁸ kotransfizierten AH109 Hefezellen auf SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade Selektionsplatten. Während die Negativ-Kontrolle (BD-Nesprin-1-165/AD) kein Wachstum der koexprimierenden Hefezellen aufweist, lassen BD-Nesprin-1-165/AD-p150 Glued⁶³⁸⁻¹²⁷⁸ positive Hefezellen ein eindeutiges Wachstum erkennen (linkes Bild). Der mit X-Gal behandelten Filterabdruck repräsentiert nach 8 Stunden eine signifikante Blaufärbung der BD-Nesprin-1-165/AD-p150 Glued⁶³⁸⁻¹²⁷⁸ koexprimierenden Hefen und deutet somit auf eine mögliche Protein-Protein-Interaktion hin (β-gal; rechtes Bild).

3.2.2 Eingrenzung und Verifizierung der p150 Glued Bindungsdomäne

Einer der p150 Glued Hefeklone weist die Aminosäuren 638 bis 1.278 (AD-p150 Glued⁶³⁸⁻¹²⁷⁸) des p150 Glued Proteins auf. Die zwei anderen p150 Glued spezifischen Hefeklone umfassen annähernd die gleichen Sequenzabschnitte von Aminosäure 902 bzw. 917 bis 1.278 des volllängen p150 Glued (AD-p150 Glued⁹⁰²⁻¹²⁷⁸ sowie AD-p150 Glued⁹¹⁷⁻¹²⁷⁸) (Abb. 3.2.3 A; Sterne). Um die Bindedomäne des p150 Glued weiterhin zu spezifizieren, wurde AD-p150 Glued⁶³⁸⁻¹²⁷⁸ in kleinere Gal4-Fusionsproteine zerlegt (AD-p150 Glued¹⁰⁷⁶⁻¹²⁷⁸; AD-p150 Glued⁶³⁸⁻¹⁰⁵¹ sowie AD-p150 Glued^{638-1278Δ}; s. Abb. 3.2.3 A). In einer Koexpressionsstudie dieser AD-p150 Glued Fusionen mit BD-Nesprin-1-165 zeigt sich, dass sowohl der N- als auch der C-terminale Bereich des p150 Glued⁶³⁸⁻¹²⁷⁸ und somit die letzten zwei „Coiled coil“ Domänen für die Interaktion mit Nesprin-1-165 von Bedeutung sind (Schneider, 2005).

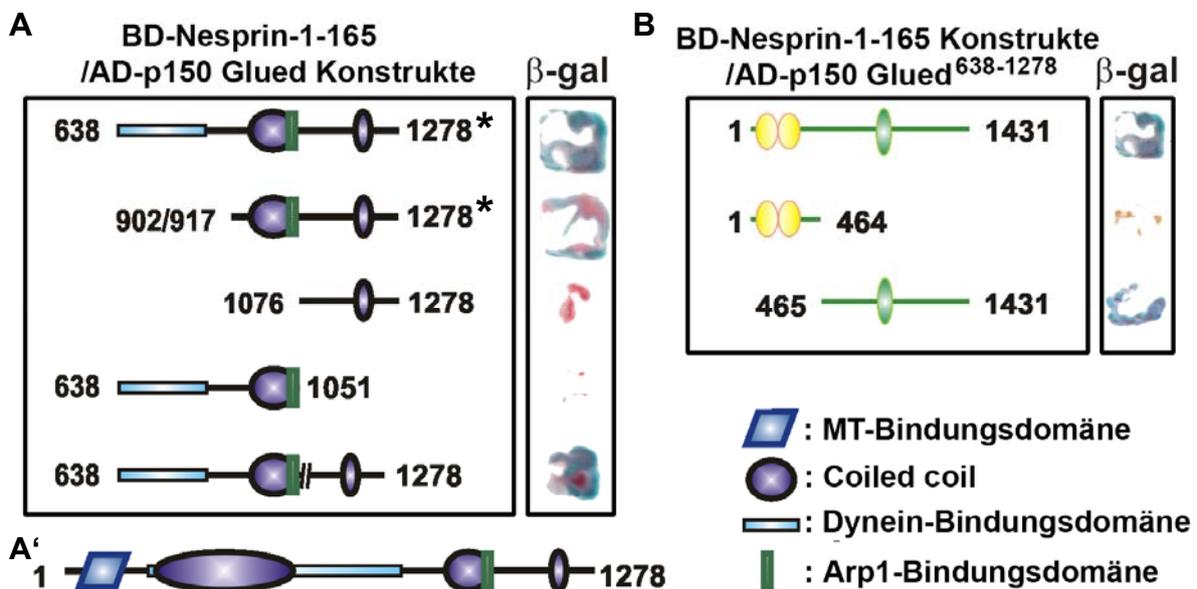


Abb. 3.2.3: Eingrenzung der p150 Glued/Nesprin-1-165 Bindungsdomänen in vivo. (A) Hefe-Zwei-Hybrid Interaktionsstudie zur Eingrenzung der p150-Glued Bindedomäne. Die mit einem Stern gekennzeichneten p150 Glued Proteinsequenzen konnten mit Hilfe des Köderproteins BD-Nesprin-1-165 in der Hefe-Zwei-Hybrid Durchmusterung identifiziert werden. Durch einen Restriktionsverdau wurden die p150 Glued Fragmente in kleinere AD-Fusionspartitionen unterteilt (nicht markiert). Die C-terminale Region des p150 Glued (AS 638-1278) zeigt in der Bindungsanalyse mit dem BD-Nesprin-1-165 Fusionsprotein das intensivste β-Gal Signal und ist demzufolge für die Proteininteraktion von Bedeutung. (A') Vollständige Domänenstruktur des p150 Glued (B). Eingrenzung des Nesprin-1-165 Interaktionsbereiches in vivo. BD-Nesprin-1-165⁴⁶⁵⁻¹⁴³¹/AD-p150 Glued⁶³⁸⁻¹²⁷⁸ koexprimierende Hefezellen lassen wie auch die Positiv-Kontrolle (BD-Nesprin-1-165/AD-p150 Glued⁶³⁸⁻¹²⁷⁸) eine deutliche X-Gal spezifische Blaufärbung und folglich eine Assoziation im Rahmen des Hefe-Zwei-Hybrid Systems erkennen. BD-Nesprin-1-165¹⁻⁴⁶⁴/AD-p150 Glued⁶³⁸⁻¹²⁷⁸ positive Hefen zeigen keine Verfärbung im β-Galaktosidasetest.

Für die Eingrenzung des Nesprin-1-165 Bindungsbereiches wurden zwei weitere Nesprin-1-165 spezifische Hefekonstrukte generiert, die verschiedene Teilfragmente des Nesprin-1-165 umfassen. Dabei erfolgte die Fusion der Unterfragmente, Nesprin-1-

165¹⁻⁴⁶⁴ (AS 1-464; N-Terminus) und Nesprin-1-165⁴⁶⁵⁻¹⁴³¹ (AS 465-1431; C-Terminus) mit der Gal4-DNA-BD. Die Koexpression von BD-Nesprin-1-165¹⁻⁴⁶⁴ bzw. BD-Nesprin⁴⁶⁵⁻¹⁴³¹ mit AD-p150 Glued⁶³⁸⁻¹²⁷⁸ (Abb. 3.2.3 B) in Hefen lässt eine Assoziation zwischen den C-terminalen „Coiled coil“ Domänen des p150 Glued und dem C-Terminus von Nesprin-1-165 (AS 465-1431) erkennen.

3.2.3 Kolokalisation des GFP-Nesprin-1-165 Fusionsproteins und p150 Glued in COS7-Zellen

Padmakumar et al., 2004 zeigte bereits, dass ektopisch exprimiertes Nesprin-1-165 (GFP-Nesprin-1-165) entlang der Aktin-Stressfasern lokalisiert. Darüber hinaus wurde GFP-Nesprin-1-165 überwiegend im Nukleus und entlang der Peripherie von COS7-Zellen beobachtet. Zur Untersuchung einer Kolokalisation von Nesprin-1-165 und p150 Glued wurden GFP-Nesprin-1-165 überexprimierende COS7-Zellen mit einem monoklonalen p150 Glued Antikörper immunmarkiert. GFP-Nesprin-1-165 konnte an filamentären Strukturen (Abb. 3.2.4; Doppelpfeil in A), im Zellkern (Abb. 3.2.4; Stern in A) sowie am Zellkortex (Abb. 3.2.4; Pfeilspitze in A) detektiert werden. Ektopisch exprimiertes Nesprin-1-165 war darüber hinaus in einer vesikelähnlichen Ringstruktur im Zytoplasma vorhanden (Abb. 3.2.4; Pfeile in A'), die in ca. 30 % aller transfizierten COS7-Zellen nachgewiesen werden konnte. Endogenes p150 Glued zeigt eine punktartige subzelluläre Verteilung, die an einigen Regionen nahe der Plasmamembran akkumuliert (Abb. 3.2.4; Pfeilspitze in B und B'). Zusätzlich konnten schwache zytoplasmatische Filamentstrukturen erfasst werden. Eine Überlagerung der Fluoreszenzsignale wurde am Zellkortex (Abb. 3.2.4 C und C'; Pfeilspitze) sowie entlang von filamentären Strukturen (Abb. 3.2.4; Doppelpfeil in C) und an den vesikelähnlichen Ringstrukturen im Zytoplasma (Abb. 3.2.4; Pfeile in C') der COS7-Zellen beobachtet.

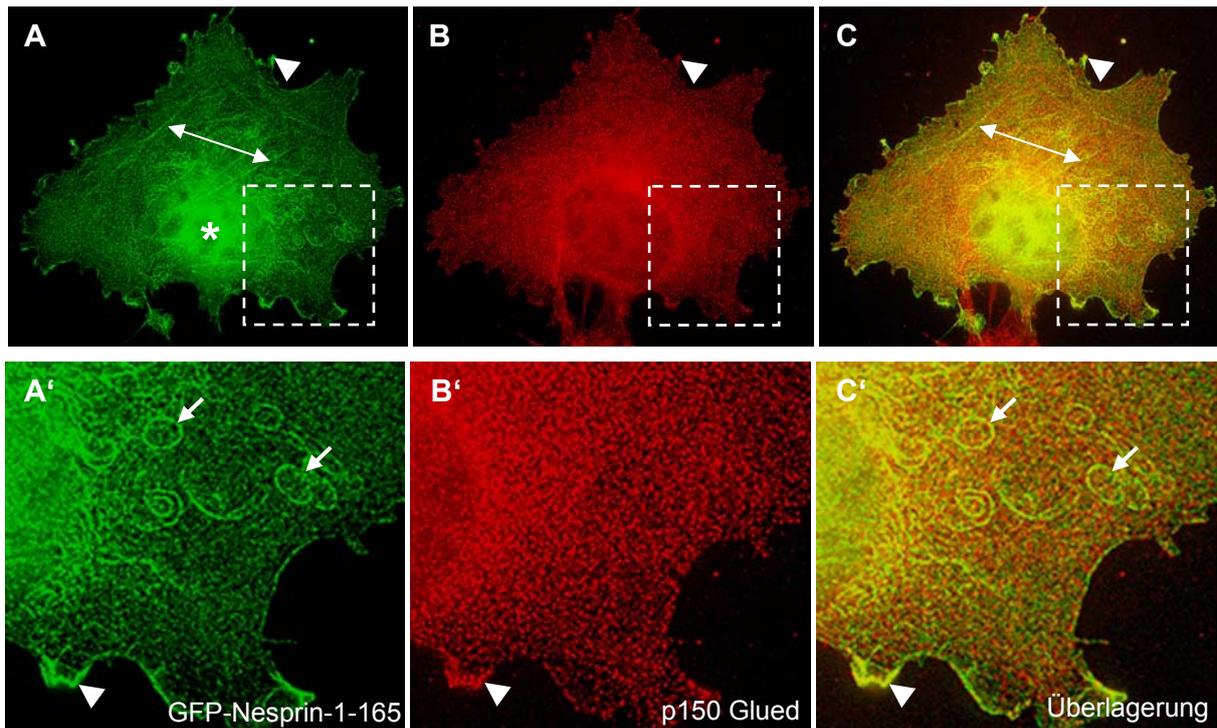


Abb. 3.2.4: Kolokalisierung von GFP-Nesprin-1-165 und p150 Glued in COS7-Zellen. GFP-Nesprin-1-165 transfizierte COS7-Zellen (A und A'), die mit mAb p150 Glued (B und B') gefärbt wurden (sekundärer Antikörper anti-Maus Alexa 568-Konjugat), zeigen eine Überlagerung der Färbung (C) an vesikelähnlichen Ringstrukturen (C'; Pfeile) wie auch an der Zellperipherie (Pfeilspitze). GFP-Nesprin-1-165 weist neben einer nukleären Lokalisation (A; Stern) auch eine Verteilung entlang von filamentären Strukturen auf, wo es mit p150 Gueld kolokalisiert (A und C; Doppelpfeil). (A'-C') Vergrößerung der in A-C gekennzeichneten Region. Balken: 20 µm.

4 Diskussion

Nesprine sind Typ II Transmembranproteine, die in der Zellkernmembran verankert sind und den Nukleus mit dem Aktin- und dem Intermediärfilamentsystem verknüpfen (Zhen et al., 2002; Padmakumar et al., 2004; Wilhelmsen et al., 2005). Aufgrund ihrer enormen Größe und ihrer diversen Isoformen bieten sie vielfältige Möglichkeiten für weitere Protein-Protein-Interaktionen. Vor allem die zentrale Stabdomäne dieser Proteine, die aus einer Vielzahl von aneinander gereihten Spektrindomänen besteht, bietet eine Plattform für Interaktionen mit vielen Proteinen in Analogie zu α -Aktinin dessen Spektrindomäne an Strukturproteine, Rezeptoren der Zellmembran, Zink-Finger-Proteine, Proteinkinasen, sowie Gerüst- und Adapter-Proteine bindet (Djinovic-Carugo et al., 2002).

Mit Hilfe einer humanen Gehirn-spezifischen cDNA-Bank konnten neue Interaktionspartner für Nesprin-1 und Nesprin-2 identifiziert werden, für Nesprin-2 die leichten Ketten des konventionellen Kinesin 1 (KLC1), für Nesprin-1-165, eine N-terminale Isoform von Nesprin-1, p150 Glued, die größte Untereinheit des Dynactin Komplexes. Somit haben beide Proteine Motorproteine als Bindepartner, die primär in den Mikrotubuli-spezifischen intrazellulären Transport involviert sind (Mandelkow und Mandelkow, 2002; Schroer und Sheetz, 1991; Schroer, 2004).

4.1 KLC1 ein neuer Interaktionspartner von Nesprin-2

Das menschliche KLC1 Gen (KNS2) liegt auf Chromosom 14 (14q32.3-14q32.33) und umfasst ~80 kb mit 23 Exons. McCart et al. (2003) beschrieben, dass dieses Gen das Potential besitzt, eine Vielzahl von Spleiß-Produkten zu generieren. Bis jetzt konnten 19 verschiedene Isoformen von KLC1 identifiziert werden, die sich im C-terminalen Bereich durch ihre Länge und Sequenz unterscheiden. Es wird vermutet, dass jede Isoform durch die Variation des C-Terminus eine spezifische Assoziation wie z.B. mit den Mitochondrien oder mit dem Golgi-Apparat vermittelt (Khodjakov et al., 1998; Gyoeva et al., 2000; McCart et al., 2003). Aufgrund der leichten Ketten zeigt das Kinesin 1 somit eine bemerkenswerte Vielfalt, die eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit den verschiedensten Vesikeln, Ladungen und Bindungspartnern spielt. Es entsteht so ein breites Spektrum an Funktionen und Möglichkeiten, über die bis jetzt jedoch noch wenig bekannt ist.

Im Rahmen des Hefe-Zwei-Hybrid Systems konnten zwei Spleiß-Varianten des KLC1 identifiziert werden, KLC1, Isoform 1 (KLC1C) sowie KLC1B, die sich in ihrer carboxyterminalen Aminosäuresequenz unterscheiden (McCart et al., 2003). Die unterschiedlichen Nesprin-2/KLC1 Komplexe erlauben vermutlich eine Verknüpfung zu verschiedenen zellulären Organellen und Bestandteilen und somit unterschiedliche funktionelle Aufgaben in der Zelle.

4.2 Nesprin-2 assoziiert mit dem Kinesin 1 Motorproteinkomplex an der äußeren Kernmembran

Das TPR- („tetratricopeptid repeat“) Motiv besteht aus einer 34 Aminosäure langen Primärsequenz, die sich meist durch eine multiple hintereinander gereichte Anordnung zu einer TPR-Plattform formiert. Diese Domänen weisen eine hohe Degeneration auf, nur acht der 34 Aminosäuren bilden einen hoch konservierten hydrophoben Konsensus, der für die strukturelle Integrität der TPR-Region verantwortlich ist. Jedes TPR-Motiv besteht aus zwei α -helikalen Domänen, die sich antiparallel zueinander anlagern. In dieser Sekundärstruktur lokalisieren die kurzen hydrophoben Aminosäuren des Konsensus zwischen den zwei Helices, während die langen hydrophoben Reste der Konsensussequenz an der Oberfläche der Helices positioniert sind. Aufgrund dieser Konformation bilden die aneinander gereichten TPR-Motive eine amphipatische Furche mit einem Winkel von 24° . Die TPR-Region konnte bislang in einer Vielzahl von nicht verwandten Proteinen identifiziert werden und repräsentiert ein multifunktionales Protein-Protein-Interaktions-Modul (Blatch und Lässle, 1999; Main et al., 2003). Die leichten Ketten des Kinesin 1 besitzen sechs dieser TPR-Motive. In biochemischen sowie in molekularbiologischen Interaktionsstudien konnte eine direkte Interaktion der TPR-Region mit den Aminosäuren 6.247-6.552 des Nesprin-2 Giant nachgewiesen werden (Abb. 3.1.5 und Abb. 3.1.6). Zudem zeigen Transfektionsanalysen, dass die subzelluläre Lokalisierung von KLC1 von Nesprin-2 abhängig ist (Abb. 3.1.9). Die Abbildung Abb. 3.1.9 lässt des Weiteren eine Nesprin-2 spezifische Rekrutierung der TPR-Domänen umfassenden KLC1 Fusionsproteine an die Kernmembran erkennen. Diese Kernhüllenlokalisation konnte für das endogene und das ektopisch exprimierte Vollängen KLC1 in Zellkulturen und in murinen Gewebeschnitten bestätigt werden (Abb. 3.1.7; Abb. 3.1.11 und Abb. 3.1.12). Obwohl bisherige Studien von Stenoien und Brady (1997), Verhey et al. (1998) und Glater et al. (2006) in Immunfluoreszenzanalysen von adrenalen chromaffinen Zellen wie auch in transient transfizierten COS7-Zellen das endogene und das überexprimierte KLC1 an der Kernmembran zeigen, wurde diese Lokalisation des

KLC1 bislang nie beschrieben bzw. detailliert charakterisiert. Neben KLC1 weisen zusätzlich das ektopisch exprimierte KIF5B (KHC) und die Mikrotubuli eine Verteilung entlang der Kernhülle auf (Abb. 3.1.13 und Abb. 3.1.14). Aufgrund des in Abb. 3.1.15 dokumentierten Nesprin-2/Kinesin 1/Tubulin Immunkomplexes und der zuvor beschriebenen korrespondierenden Lokalisation dieser Proteine lässt sich vermuten, dass das Kernmembran-gebundene Nesprin-2 über Kinesin 1 mit den Mikrotubuli verknüpft wird.

Die dominant negative Nesprin-Interferenz, in der die Nesprin KASH-Isoformen von der Kernmembran verdrängt werden (Lu, 2007) sowie das Nesprin-2 Giant Silencing führen zu einem Verlust des endogenen KLC1 entlang der nukleären Hülle (Abb. 3.1.18 und Abb. 3.1.20). Zudem stört ein KLC1 wie auch ein Nesprin-2 Giant knock down die Anlagerung der Mikrotubuli an die Kernmembran (Abb. 3.1.23). Folglich ist die Kernhüllenlokalisierung des KLC1 von Nesprin-2 und die der Mikrotubuli von Nesprin-2 und von KLC1 abhängig. Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass der Zellkern über Nesprin-2 und Kinesin 1 in das Mikrotubulinetzwerk integriert ist. Ferner besitzen auch Plectin sowie BPAG1 („bullous pemphigoid antigen 1“), das auch als Dystonin oder MACF2 („MT actin cross-linking factor“) bezeichnet wird, das Potential mit dem Mikrotubulinetzwerk zu interagieren (Svitkina et al., 1996; Young et al., 2006; Young und Kothary, 2008). Weiterhin kann über Nesprin-3 der Kern indirekt durch Plectin bzw. BPAG1 mit den MT-Filamenten verknüpft werden. Interessanterweise wurde solch ein molekularer Komplex auch für Nesprin-1 (Syne-1) identifiziert, das mit seiner zentralen Stab-Domäne an die Untereinheit des Kinesin II, KIF3B bindet. Diese Proteininteraktion ist in den komplexen Prozess der Zytokinese involviert (Fan und Beck, 2004). Emerin, das kürzlich an der äußeren Kernmembran beschrieben wurde, repräsentiert ein weiteres integrales Membranprotein, das direkte Interaktionen mit den MT eingeht (Salpingidou et al., 2007). Darüber hinaus besitzt auch Huntingtin, ein 350 kDa Protein, das an perinukleären Bereichen lokalisiert, die Fähigkeit an das Zentrosom und die Mikrotubuli zu binden (Hoffner und Djian, 2002). Primär vermitteln jedoch die Nesprine eine indirekte Verknüpfung mit den verschiedenen zytoplasmatischen Filamentsystemen und erlauben somit die Integration des Zellkerns in das Zytoskelett der Zelle.

Aufgrund der Anlagerung des Zytoskeletts an der äußeren Kernmembran könnte dieses entscheidend an der strukturellen Integrität des Kernes beteiligt sein. Diese Hypothese wird von den bereits beschriebenen biologischen Eigenschaften der Nesprine unterstützt. Die Abwesenheit von Nesprin-1 als auch von Nesprin-2 führt zu massiven Defekten der Kernmorphologie (Lüke et al., 2008; Kandert et al., 2007; Zhang et al.,

2007). Bisherige Daten in unserer Arbeitsgruppe deuten zudem daraufhin, dass die Aktin-bindende Domäne (ABD) des Nesprin-1 sowie des Nesprin-2 direkt mit Nesprin-3 interagieren (Schneider et al., 2008; Lu, unveröffentlichte Daten). Diese Interaktionen zeigen, dass Nesprine sowohl über ihren C-Terminus (via KASH-Domäne) als auch über ihren N-Terminus (via ABD) an der Kernhülle lokalisiert sind. Diese Lokalisation ist in Immunfluoreszenzanalysen mit Hilfe von N- sowie C-terminalen Nesprin-2 Giant Antikörpern gezeigt, da eine identische Verteilung entlang der nukleären Hülle beobachtet werden konnte (Libotte et al., 2005 und Abb. 3.1.26).

Bisherige Modelle repräsentieren KASH-umfassende Nesprine als lange in das Zytoplasma ragende Moleküle. Allerdings sprechen die zuvor beschriebenen Daten dafür, dass diese Modelle modifiziert werden sollten. Es ist sehr viel wahrscheinlicher, dass durch die Vernetzung mit Nesprin Molekülen ein strukturelles Geflecht von Filamenten den Zellkern umschließt (Schneider et al., 2008). Mit unseren Daten schlagen wir vor, dass ein spezialisiertes Zytoskelett an der zytoplasmatischen Seite der Kernhülle existiert, das über integrale Proteine der äußeren Nuklearmembran verankert bzw. stabilisiert wird (Abb. 4.2.1). Die Abwesenheit von Nesprinen könnte folglich direkt als auch indirekt über das Zytoskelett die Kernarchitektur beeinträchtigen.

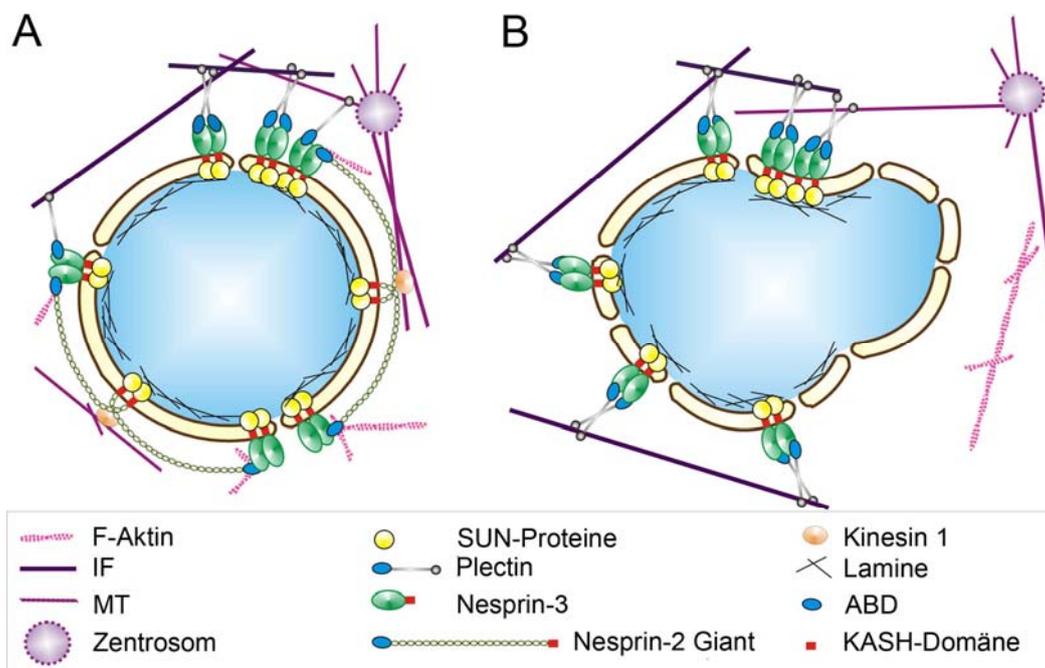


Abb. 4.2.1: Modell der verschiedenen Nesprin Interaktionen an der äußeren Kernmembran. (A) Nesprin-2 bildet aufgrund seiner direkten und indirekten Interaktionen mit dem Zytoskelett und weiteren Nesprin Proteinen eine zytoplasmatische Phasengrenzfläche entlang der Kernhülle. (B) Die Abwesenheit von Nesprin-2 führt zu einer Ablösung der verschiedenen Komponenten des Zytoskeletts, wodurch die Morphologie der Kernhülle beeinträchtigt wird (adaptiert und modifiziert aus Schneider et al., 2008).

4.3 Nesprin-2 und KLC1 verankern das Zentrosom an der Kernmembran

Bahe et al. (2005) zeigten erstmals, dass Rootletin, eine filamentäre Komponente der ziliären Rootlets, für die Adhäsion der parentalen Zentriolen verantwortlich ist und folglich die zentrosomale Kohäsion beeinflusst. Zeitgleich konnte von Yang und Li (2005) eine direkte Interaktion zwischen Rootletin und der „Coiled coil“ (HR) Domäne des KLC1 nachgewiesen werden. Aufbauend auf diesen Daten und der Lokalisierung des Nesprin-2 SR Fusionsproteins am MTOC (Abb. 3.1.2) vermuten wir, dass KLC1 aufgrund der Rootletin bzw. der Nesprin-2 SR Assoziation eine neue Komponente des Zentrosoms darstellt. Immunfluoreszenzanalysen an murinen Fibroblasten mit einem KLC1 Antikörper unterstützen dies (Abb. 3.1.24). Somit ist KLC1 die erste Untereinheit des Kinesin 1, die am Zentrosom lokalisiert. Neben KLC1 konnte jedoch auch das KIF3B des Kinesin II Motorkomplexes sowie das KIFC5A der Kinesin 14-Familie am Zentrosom detektiert werden (Fan und Beck, 2004; Christodoulou et al., 2006).

In Immunfluoreszenzstudien wurde auch das endogene Nesprin-2 am MTOC beobachtet. Dabei erkennt man nur mit dem gegen den C-Terminus, aber nicht mit dem gegen den N-Terminus gerichteten Nesprin-2 Antikörper ein Fluoreszenzsignal an den Zentrosomen (Abb. 3.1.25). Diese spezifische Färbung mit pAb K1 konnte zudem an Zentrosomen nachgewiesen werden, die mehrere μm vom Zellkern entfernt sind (Abb. 3.1.26 und Abb. 3.1.33). Da Nesprin-2 Giant jedoch nur eine Länge von $\sim 0,6 \mu\text{m}$ aufzeigt, sollte davon ausgegangen werden, dass spezifische KASH-defiziente C-terminale Nesprin-2 Isoformen mit dem Zentrosom assoziiert sind. Die Annahme, dass es sich dabei um KASH-defiziente Isoformen handelt, beruht darauf, dass die KASH-Domäne die Kernhüllen-spezifische Lokalisation vermittelt (Tzur et al., 2006; Starr und Fischer, 2005). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass eine direkte Membranverbindung zwischen Kernmembran und Zentrosom besteht wie in Studien von Lee et al. (2002) in *C. elegans* und Xiong et al. (2008) in *D. discoideum* angenommen wird.

Die zuvor beschriebenen Daten konnten zusätzlich im Rahmen der Überexpression des GFP-markierten Rootletin verifiziert werden. Nur C-terminale Nesprin-2 Isoformen nicht aber N-terminale bzw. KASH-umfassende Nesprin-2 Isoformen lassen sich wie auch das KLC1 an die filamentären Rootletin-Strukturen rekrutieren (Abb. 3.1.28 und Abb. 3.1.29). Obwohl Nesprin-2 Giant im Rahmen dieser Arbeit nicht direkt am Zentrosom nachgewiesen werden konnte, ist sein Einfluss auf die zentrosomale Lage jedoch nicht zu unterschätzen. Sowohl die dominant negative Nesprin-Interferenz als auch der

Nesprin-2 Giant knock down zeigen eindeutige Effekte auf die Positionierung des Zentrosoms (Abb. 3.1.33 und Abb. 3.1.34). Ein vergleichbarer Phänotyp wurde auch von Lüke et al. (2008) in Nesprin-2 knock out Fibroblasten beschrieben. Demnach kann postuliert werden, dass der N-Terminus von Nesprin-2 Giant zwar nicht mit dem Zentrosom assoziiert, dass aber der C-Terminus dieser Isoform das Potential besitzt über KLC1 mit den zentrosomalen Komponenten zu interagieren.

Lüke et al. (2008) zeigten, dass die Abwesenheit des Nesprin-2 Giant sowohl die Expression als auch die Lokalisation der C-terminalen Nesprin-2 Isoformen beeinflusst. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Nesprin-2 Giant mit den C-terminalen Isoformen interagiert und deren Lage an der Kernmembran stabilisiert. Des Weiteren beschreiben Mislaw et al. (2002), dass Nesprin-1 (myne-1) Isoformen anhand ihrer C-Termini dimerisieren können. Daneben bilden auch die SUN-Domänen Proteine im perinukleären Raum Oligomere, die für die Verankerung der KASH-Domänen Proteine entscheidend sind (Lu et al., 2008). Basierend auf diesen Daten wird vermutet, dass die C-Termini von Nesprin-2 Giant und C-terminalen Nesprin-2 KASH-Isoformen wie z.B. Nesprin-2 α , β und γ an der Kernmembran makromolekulare Komplexe ausbilden (s. Abb. 4.3.1 A). Dabei werden diese Komplexe vermutlich von den SUN2 Proteinen, die in Kernmembran-Regionen nahe dem Zentrosom akkumulieren (Abb. 3.1.27), in der nukleären Membran verankert. Kürzlich postulierte King et al. (2008), dass SUN-Protein Komplexe wie „Gewinde“ fungieren, die die „Schrauben“ (KASH-Proteine) an der Kernmembran stabilisieren.

Aufbauend auf diesem Modell können die verschiedenen Phänotypen der dominant negativen Nesprin-Interferenz, des Nesprin-2 und KLC1 Silencings sowie des Nesprin-2 knock outs folgendermaßen erklärt werden (s. Abb. 4.3.1 B-C). Die dominant negative Interferenz führt zu einer Verdrängung der KASH-umfassenden Nesprin Isoformen, wohingegen die SUN-Proteine unverändert entlang der nukleären Membran lokalisieren (Lu, 2007). Aufgrund der Verdrängung der makromolekularen Nesprin Komplexe, kann das Zentrosom nicht länger an der Kernhülle fixiert werden, wodurch sich der Abstand zwischen Zellkern und Zentrosom erhöht (Abb. 3.1.33). Die KASH-defizienten Nesprin-2 Isoformen lassen sich jedoch weiterhin am Zentrosom nachweisen, so dass es zu keiner Trennung der parentalen Zentriolen bzw. der Zentrosomen kommt (s. Abb. 4.3.1 B). Der Nesprin-2 Giant knock down vermittelt einen vergleichbaren Phänotyp wie die dominant negative Interferenz. Aufgrund des Fehlens der Kernmembran-assoziierten Nesprin-2 Komplexe vergrößert sich die Distanz zwischen Kern und MTOC, während die C-terminalen Nesprin-2 Isoformen unverändert am Zentrosom lokalisieren (Abb. 3.1.34).

Dieser zellbiologische Ansatz zeigt somit, dass die zentrosomale Verankerung an der Kernhülle von Nesprin-2 KASH-Isoformen abhängig ist. Auch durch die Überexpression des Nesprin-2 SR Fusionsproteins konnte ein erhöhter Abstand des Zentrosoms zur Kernhülle bestimmt werden (Abb. 3.1.32). Vermutlich funktioniert diese Fusion wie ein dominant negatives Protein, das die Bindestellen des KLC1 an der Kernmembran blockiert und somit das Zentrosom in seiner Assoziation zum Nukleus stört.

Der von Lüke (2008) beschriebene Nesprin-2 Giant knock out zeigt hingegen eine Abweichung zu dem zuvor beschriebenen Phänotyp des Nesprin-2 Giant Silencing. Neben der vergrößerten Distanz zwischen Zellkern und Zentrosom konnte eine Störung in der Zentrosomenamplifikation nachgewiesen werden. Dies beruht womöglich darauf, dass der Nesprin-2 knock out die Expression der C-terminalen Nesprin-2 Isoformen beeinträchtigt (Lüke et al., 2008). Die Abwesenheit des Nesprin-2 beeinflusst zudem die Expressionsmengen des KLC1 (Abb. 3.1.20). Demzufolge lagern sich weniger Nesprin-2 Isoformen und KLC1 Proteine am Zentrosom an. Vermutlich regulieren diese Proteine aufgrund der Assoziation zu Rootletin die zentrosomale Kohäsion (s. Abb. 4.3.1 C). Jedoch stellt sich die Frage, warum lediglich der Nesprin-2 Giant knock out und nicht das Nesprin-2 Giant Silencing von entscheidender Bedeutung für die Zentrosomenamplifikation ist. Möglich ist, dass der Nesprin-2 Giant knock down im Vergleich zum knock out unvollständig ist. Nesprin-2 knock down Lysate weisen zwar eine Reduktion des Nesprin-2 Giant auf, jedoch werden die C-terminalen Isoformen nur wenig beeinflusst (Abb. 3.1.20 C). Zudem konnten in Nesprin-2 shRNA transfizierten humanen Keratinozyten stets die C-terminalen Nesprin-2 Isoformen am Zentrosom dokumentiert werden (Abb. 3.1.34 B). Diese Daten deuten daraufhin, dass ausreichende Mengen an Nesprin-2 und KLC1 Molekülen am Zentrosom lokalisiert sind, so dass die Trennung der parentalen Zentriolen nicht beeinflusst wird. Neue, hier nicht gezeigte Daten zeigen zudem, dass nach Einsatz einer C-terminalen Nesprin-2 spezifischen shRNA die carboxylterminalen Nesprin-2 Isoformen an den zentrosomalen Strukturen abwesend sind, wobei das Fehlen der C-terminalen Nesprin-2 Spleiß-Produkte ein Splitten der Zentriolen induziert.

Für das KLC1 Silencing wurde ein ähnlicher Phänotyp wie für den Nesprin-2 Giant knock out beobachtet. Die Abwesenheit des KLC1 induziert sowohl eine erhöhte Zentrosomen-
distanz zum Nukleus als auch eine Erhöhung der Zentrosomenanzahl (Abb. 3.1.34 und Abb. 3.1.35). Diese Resultate weisen daraufhin, dass KLC1 als eine Art Linker funktioniert, der die Kernhüllen-assoziierten Nesprin-2 Komplexe mit dem Zentrosom verknüpft. Fehlt dieses Bindeglied, so löst sich das Zentrosom von der Kernhülle ab und

transloziert in das Zytoplasma. Da Rootletin-Filamente keinen kontinuierlichen Linker zwischen den benachbarten Zentriolen ausbilden (Bahe et al., 2005), kann zudem vermutet werden, dass KLC1 sowie Nesprin-2 an der Quervernetzung von Rootletin beteiligt sind und somit die zentrosomale Kohäsion beeinflussen (s. Abb. 4.3.1 D). Da das Nesprin-2 SR Fusionsprotein durch die Überexpression von RFP-markiertem Pericentrin an das Zentrosom bzw. die filamentären Pericentrinstrukturen rekrutiert wird (Abb. 3.1.31), ist nicht auszuschließen, dass Nesprin-2 zudem mit weiteren noch nicht bekannten Komponenten der perizentriolären Matrix interagiert.

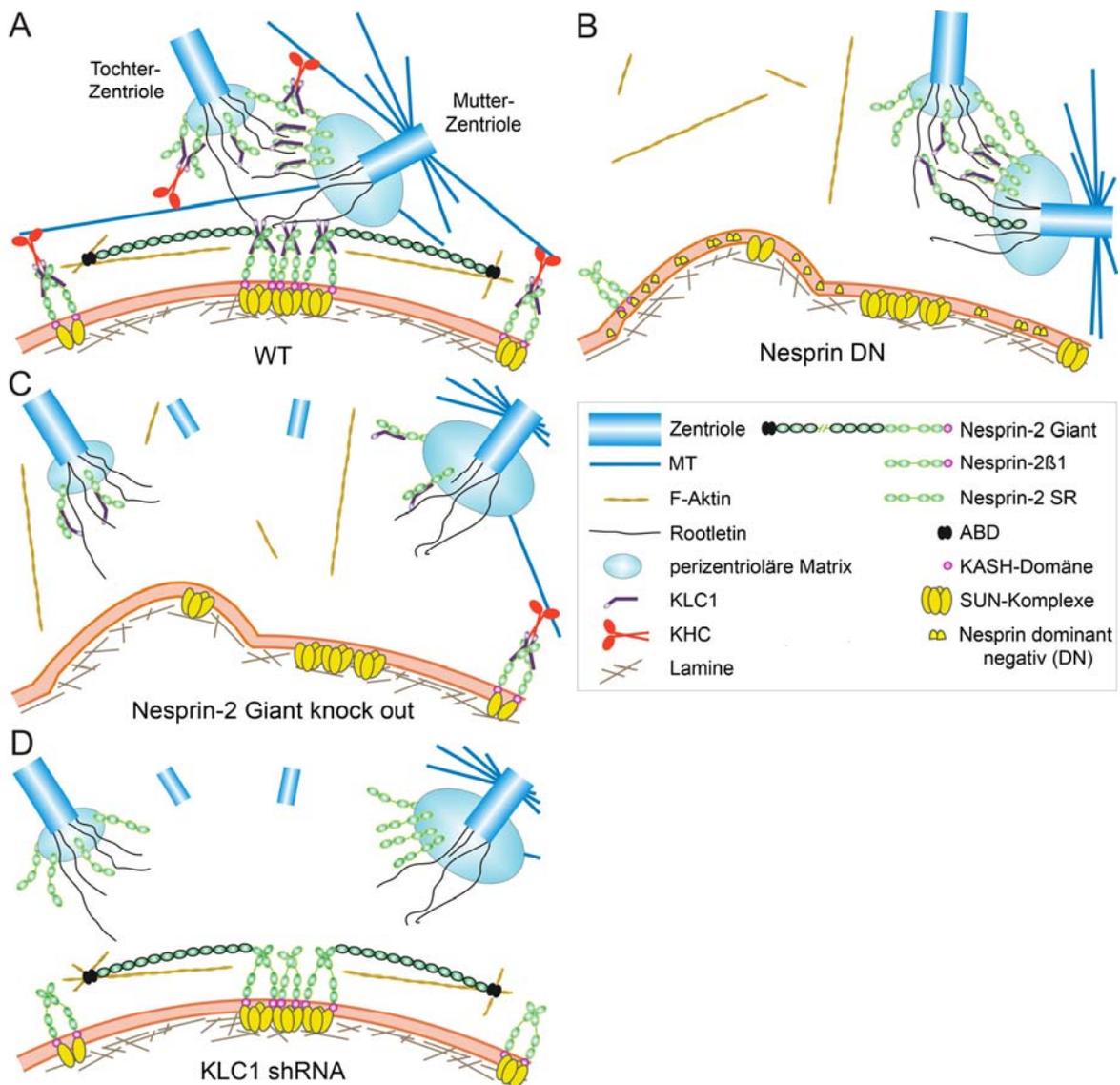


Abb. 4.3.1: Modelle der zentrosomalen Phänotypen in Nesprin-2 und KLC1 Mutanten. Schematische Darstellung der Anlagerung des Zentrosoms an die Kernhülle sowie der zentrosomalen Kohäsion in (A) Wildtyp (WT), (B) dominant negativen (DN) Nesprin, (C) Nesprin-2 knock out sowie in (D) KLC1 knock down Zellen.

4.3.1 Zentrosomale Positionierung

Neben den zuvor postulierten Mechanismen der zentrosomalen Verankerung könnte jedoch auch das Zytoskelett an der zytoplasmatischen Phasengrenzfläche der Kernhülle einen wichtigen Einfluss auf die Positionierung des Zentrosoms haben. Sowohl der dominant negative Nesprin Ansatz, das Nesprin-2 Silencing als auch der Nesprin-2 knock out, führen vermutlich zu einer Destabilisierung des Zytoskeletts rund um den Zellkern. Demzufolge kann das Zentrosom mittels seiner Astral-Mikrotubuli nicht mehr an Kernmembran-gebundene Proteine bzw. molekulare Motoren wie z.B. das Kinesin 1 binden. Motorproteinkomplexe wie das Dynein, das mit der Zellperipherie in *S. pombe* über Num1 verknüpft ist, erzeugen Zugkräfte, indem sie die Mikrotubuli in Richtung Zellkortex ziehen (Wu et al., 2006; Manneville und Etienne-Manneville, 2006). Das Zentrosom könnte aufgrund der veränderten, zytoplasmatischen Phasengrenzfläche entlang der Kernhülle nicht mehr imstande sein diese mechanischen Kräften auszugleichen und wird somit in Richtung des Zellkortex verlagert.

Das in *C. elegans* identifizierte ZYG-12, das über SUN1 in der Kernmembran verankert ist, repräsentiert ein weiteres KASH-Domänen Protein, welches an der zentrosomalen Verankerung beteiligt ist. Dieses Protein weist ähnliche Eigenschaften wie das Nesprin-2 auf, da es sowohl an der Kernhülle als auch am Zentrosom lokalisiert (Malone et al., 2003). Malone et al. (2003) postulierten, dass ZYG-12 mittels Dynein die zentrosomale Positionierung reguliert. Zudem wurde gezeigt, dass auch SUN1 in *C. elegans* als auch in *D. discoideum* die Topologie der Zentrosomen nahe der Kernmembran beeinträchtigt (Malone et al., 2003; Xiong et al., 2008). Darüber hinaus besitzt auch das mit Nesprin-1 und Nesprin-2 assoziierte Emerin, welches mit den Mikrotubuli an der äußeren Kernmembran interagiert, das Potential die Positionierung des Zentrosoms zu beeinflussen (Salpingidou et al., 2007). Demnach ist die zentrosomale Positionierung bzw. Verankerung ein konservierter Mechanismus der KASH/SUN-Proteine, der bislang in Amöben, in Nematoden sowie in Vertebraten nachgewiesen werden konnte.

Weiterhin zeigten Yamashita und Fuller (2008), dass die Positionierung des Zentrosoms für die symmetrische als auch asymmetrische Zellteilung von Bedeutung ist. Der Mechanismus der asymmetrischen Zellteilung ist entscheidend für die funktionelle Entwicklung eines Gewebes bzw. eines Organismus (Morrison und Kimble, 2006).

4.3.2 Zentrosomale Kohäsion

Interessanterweise sind bereits Bestandteile der perizentriolären Matrix wie z.B. das Cep215 bekannt, welche die zentrosomale Kohäsion regulieren (Graser et al., 2007). Zusätzlich beeinflussen auch die Rootletin-interagierenden Komponenten C-Nap1 und Cep68 die Trennung der parentalen Zentriolen (Hames et al., 2005; Graser et al., 2007). Dieser komplexe Prozess ist von einem intakten Mikrotubulinnetzwerk sowie von einem koordinierten Zusammenspiel der Cdc2 und Nek2 Kinase als auch der PP1 α Phosphatase abhängig (Meraldi und Nigg, 2001). Die Kohäsion des Zentrosoms wird somit von einer Vielzahl von unterschiedlichen Faktoren reguliert. Ein wichtiger Aspekt ist, dass eine Störung der zentrosomalen Kohäsion bzw. Separation zur Entstehung von Tumoren führt (Brinkley und Goepfert, 1998; Doxsey, 1998; Salisbury et al., 1999). Folglich können Nesprine sowie das KLC1 in den Prozess der Tumorgenese involviert sein. Für Nesprin-2 konnte dies schon anhand von genetischen Studien gezeigt werden. In einer genetischen Durchmusterung von Brust- sowie kolorektalen Tumoren wies das Nesprin-2 Gen drei verschiedene Mutationen auf (Sjöblom et al., 2006).

4.4 Nesprin-2 und KLC1 bestimmen die Zellpolarität

Die vom Zytoskelett und seinen assoziierten Proteinen regulierte Positionierung des Zentrosoms sowie des Zellkerns sind zelluläre Prozesse, die für die Zellpolarität von entscheidender Bedeutung sind. Ein spezifisches Merkmal einer polarisierten Zelle ist die Lage des Zentrosoms, das sich zwischen dem Zellkern und der Migrationsfront der Zelle positioniert. Dabei ist diese zentrosomale Positionierung in verschiedenen Zelltypen auf unterschiedliche Mechanismen zurückzuführen. In Neuronen und T-Zellen wandert das Zentrosom, während z.B. in Fibroblasten der Zellkern eine rückwärtige Bewegung aufweist, wodurch das Zentrosom zwischen Nukleus und Migrationsfront orientiert wird (Li und Gundersen, 2008). Gomes et al. (2005) zeigten, dass die zentrosomale Verankerung des MTOCs in murinen Fibroblasten-Zelllinien (NIH-3T3) vom MT-assoziierten Dynein abhängig ist, wohingegen die Bewegung des Zellkerns vom Aktinzytoskelett sowie Myosin II bestimmt wird. Demnach wird die nukleäre Migration bzw. Verankerung durch die Kombination von Kräften des Aktin- als auch Mikrotubulinnetzwerkes kontrolliert (Reinsch und Gönczy, 1998; Starr und Han, 2003). In diesem Prozess besitzen die KASH-Proteine eine konservierte Funktion (Starr und Han, 2003; Wilhelmssen et al., 2006). Diese Proteine erlauben die Kommunikation des Zellkerns mit dem Zytoskelett und verschaffen dem Nukleus Mobilität. Anhand des Aktin-bindenden ANC-1 in *C. elegans*, MSP-300 in *D. melanogaster* sowie Nesprin-1 (Syne-1) der Maus

konnte dies bereits gezeigt werden. In ANC-1, MSP-300 und Syne-1 Mutanten wurden Aggregationen der Nuklei beobachtet, die sich im Wildtyp nicht erkennen ließen (Starr, 2007). Zusätzlich weisen auch die Nesprin Orthologe in den Photorezeptoren von Zebrafischen Kern-Positionierungs-Defekte auf (Tsujikawa et al., 2007). Jedoch sind in höheren Vertebraten die KASH-Domänen Proteine primär mit dem Aktin-regulierten Mechanismus der nukleären Migration bzw. Verankerung in Verbindung gebracht worden (Starr und Han, 2003). Die einzige Ausnahme stellt Emerin dar, das nicht nur mit Aktin sondern auch mit β -Tubulin interagiert (Holaska et al., 2004; Salpingidou et al., 2007). Eine vollkommen neue Option eröffnet sich aufgrund der Nesprin-2/KLC1 Assoziation entlang der Kernmembran. Aufgrund dieser Bindung kann der Kern indirekt über Nesprin-2 und Kinesin 1 mit dem Mikrotubulifilamentsystem interagieren. Somit integriert Nesprin-2 sowohl das Aktin- wie auch das Mikrotubulizytoskelett an der Kernmembran. Da ein Nesprin-2 knock out (Lüke et al., 2008) sowie das KLC1 Silencing (Abb. 3.1.36) zu Defekten in der Zellpolarität führt, kann vermutet werden, dass dies auf einer gestörten Kernmigration basiert. Jedoch könnte solch ein Phänotyp auch auf eine defekte zentrosomale Verankerung zurückzuführen sein.

4.5 Weitere Funktionen der Nesprine

4.5.1 Nesprine kontrollieren die TGF- β Signaltransduktion

Nach einer Stimulation von TGF- β („transforming growth factor“), bindet dieser Ligand an einen Plasmamembran-integrierten Typ II Rezeptor, T β RII. Dieser Rezeptor rekrutiert den Typ I Rezeptor T β RI bzw. ALK5, welcher für die Phosphorylierung von einer Vielzahl von verschiedenen Substraten verantwortlich ist. Die TGF- β Rezeptoren regulieren unterschiedliche Signalwege, wobei der Smad Signalweg der am besten charakterisierte ist (Massagué, 2000; Wakefield und Roberts, 2002). Rezeptor-regulierte Smads (R-Smads), Smad 2 und Smad 3 werden direkt über den aktivierten ALK5 Rezeptor phosphoryliert. In Folge dieser Aktivierung bilden die R-Smads mit dem Co- („common mediator“) Smad, Smad 4 zytoplasmatische Komplexe (Massagué, 2000), die daraufhin im Nukleus akkumulieren. Im Zellkern sind die aktivierten Smad Komplexe in Assoziation mit weiteren spezifischen Transkriptionsfaktoren an der Regulation verschiedener Ziel-Gene beteiligt (Massagué und Wotton, 2000). Nach einer Dephosphorylierung und der damit verbundenen Dissoziation des Smad Komplexes im Nukleus erfolgt eine Translokation der Smad-Moleküle zurück in das Zytoplasma, wo sie einen neuen Zyklus durchlaufen können. Demzufolge unterliegen diese Proteine einer permanenten

Bewegung zwischen Zytoplasma und Zellkern (Inman et al., 2002). Batut et al. (2007) zeigten kürzlich, dass der Smad Signalweg von einem intakten Mikrotubulinetzwerk und den Kinesin 1 Motorkomplexen abhängig ist. Sowohl bei der Zerstörung des MT-Zytoskeletts als auch bei der Inhibition des Kinesin 1 Motorkomplexes konnte keine Ansammlung der Smads im Nukleus beobachtet werden. Des Weiteren wurde von Batut et al. (2007) gezeigt, dass der Kinesin 1 Komplex mit Smad 2 assoziiert. Da Kinesin 1 seine Substrate in Richtung Zellperipherie befördert (Verhey und Rapoport, 2001), kann Kinesin 1 für den anterograden Transport der dephosphorylierten Smad Moleküle vom Nukleus zur Plasmamembran verantwortlich gemacht werden. Erfolgt eine Inhibition dieses Transports, können die Smads demzufolge nicht an den Rezeptoren der Plasmamembran phosphoryliert werden (Bate et al., 2007).

Auch Nesprine scheinen eine Funktion während der Smad Signaltransduktion zu besitzen. In der dominant negativen Nesprin-Interferenz konnte im Vergleich zur Kontrolle eine weniger intensive bzw. verzögerte Ansammlung der Smad Moleküle im Kern dokumentiert werden (Abb. 3.1.37). Möglicherweise führt die Verdrängung der Kernmembran-assoziierten Nesprine zu einer Veränderung des an der Zellkernhülle angelagerten Zytoskeletts. Zudem beeinflusst die Verdrängung der Kernmembran-assoziierten Nesprine die Anlagerung des KLC1 am Nukleus (Abb. 3.1.18). Demnach könnten die MT-Motorproteine in ihrem molekularen Transportmechanismus gestört werden. Sowohl das veränderte Zytoskelett an der zytoplasmatischen Seite der Kernhülle als auch die Verdrängung des KLC1 von der Kernmembran, können die Anlagerung der Smad Moleküle am Nukleus sowie den anterograden Transport von der Kernmembran in Richtung der aktiven TGF- β Rezeptoren erschweren. Demnach erfolgt eine zeitlich verzögerte Akkumulation der Smad Komplexe im Zellkern.

In den meisten Zellen mit Ausnahme von manchen Fibroblasten sowie mesenchymalen Zellen ist TGF- β in den Zellzyklus involviert (Alexandrow und Moses, 1995; Laiho et al., 1990). Zudem ist der Verlust der TGF- β Signaltransduktion mit einer direkten Zelltransformation verbunden, die zur Entstehung von Krebs führt (Markowitz und Roberts, 1996; Inagaki et al., 1993). Diese Daten lassen vermuten, dass sowohl die Kinesine als auch die Nesprine in den Zellzyklus und in die Tumorgenese involviert sind.

4.5.2 KASH-Domänen Proteine beeinflussen die mitochondriale Positionierung

Für die Verankerung sowie die Motilität der Mitochondrien ist ein intaktes Mikrotubuli- und Aktin-Zytoskelett von großer Bedeutung. Sowohl die MT-Motorproteine als auch Aktin regulierende Komponenten wie das RhoA bestimmen die Positionierung der

Mitochondrien (Morris und Hollenbeck, 1995; Tanaka et al., 1998; Ligon und Steward, 2000; Minin et al., 2006). Bisherige Studien zeigen, dass die schweren Ketten des Kinesin 1 (KIF5B) für den Plus-End-gerichteten Transport der Mitochondrien verantwortlich sind (Tanaka et al., 1998), wohingegen die retrograde Translokation von Dynein reguliert wird (Pilling et al., 2006). Zudem bewirkt die Abwesenheit des KIF5B eine perinukleäre Akkumulation der Mitochondrien (Tanaka et al., 1998). Glater et al. (2006) sowie Rice und Gelfand (2006) zeigten, dass die schweren Ketten des Kinesin 1 indirekt über Milton und Miro mit den Mitochondrien assoziieren, wodurch der mitochondriale Transport entlang der Mikrotubuli gewährleistet wird. Dabei involviert dieser Komplex nicht die leichten Ketten des Kinesin 1. Bislang ist der mitochondriale sowie der mRNP Partikel Transport der einzige Bewegungsmechanismus des Kinesin 1, der nicht von den TPR-Domänen der leichten Ketten abhängig ist (Glater et al., 2006; Rice und Gelfand, 2006; Kanai et al., 2004; Ling et al., 2004). Die Funktion des KLC1 ist jedoch nicht zu unterschätzen, da KLC mit Milton im Zytoplasma der Zelle direkt um die Bindung zu der KHC konkurriert (Glater et al., 2006; Rice und Gelfand, 2006).

Zudem beeinflusst das Nesprin Ortholog ANC-1 in *C. elegans* die Lage der Mitochondrien, da Mutationen des ANC-1 Gens mitochondriale Positionierungs-Defekte verursachen (Hedgecock und Thomson, 1982; Starr und Han, 2002). Auch im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Nesprine einen entscheidenden Einfluss auf die Organisation bzw. Positionierung der Mitochondrien besitzen (s. Abb. 3.1.39). Durch den Entzug von Serum weisen Mitochondrien eine perinukleäre Akkumulation auf.

Um zu überprüfen, ob die dominant negative Nesprin-Interferenz die Mobilität der Mitochondrien beeinträchtigt, wurden humane Keratinozyten-Zelllinien eine Stunde nach Serumzugabe dokumentiert. Es zeigt sich, dass die Mitochondrien im dominant negativen Nesprin Ansatz, im Vergleich zu den Kontrollzellen, eine defekte, zytoplasmatische Reorganisation aufweisen. Dies könnte darauf beruhen, dass durch die dominant negative Interferenz weniger KLC1 an der Kernmembran gebunden wird und demzufolge im Zytoplasma der Zelle mit Milton um die Assoziation zu den schweren Ketten des Kinesin 1 konkurriert. Es lässt sich vermuten, dass in der dominant negativen Studie mehr KLC1 Moleküle an die schweren Ketten des Kinesin 1 binden können als in der Kontrolle. Demnach sättigt das KLC1 die KHC Bindestellen ab, so dass die Interaktion zu Milton blockiert ist. Aufgrund dessen können die schweren Ketten des Kinesin 1 nicht mit den Mitochondrien interagieren, wodurch die mitochondriale Mobilität und Reorganisation möglicherweise beeinträchtigt sind. Andererseits könnte wiederum das veränderte Kernhüllen-assoziierte Zytoskelett der dominant negativen Zellen für die

Transport- bzw. Positionierungs-Defekte der Mitochondrien von entscheidender Bedeutung sein.

4.6 Neue Mechanismen in der Pathologie von Laminopathien

Laminopathien repräsentieren eine Familie genetischer Erkrankungen, die primär durch Mutationen in dem Lamin A/C (*LMNA*) Gen hervorgerufen werden. Bislang sind über 200 Mutationen bekannt, die mindestens zu 13 verschiedenen Erkrankungen führen (Capell et al., 2006). Zu den systematischen Laminopathien, die sich phänotypisch auf mehrere verschiedene Gewebe zugleich ausprägen, gehören z.B. das Hutchinson-Gilford-Progerie-Syndrom (HGPS; Eriksson et al., 2003) und das atypische Werner-Syndrom (Chen et al., 2003). Während z.B. die Emery-Dreyfuss Muskeldystrophie (EDMD; Bonne et al., 1999), die axonale Charcot-Marie-Tooth Erkrankung (CMT2; De Sandre-Giovannoli et al., 2002) sowie die partielle Lipodystrophie vom Dunnigan Typ (FPLD; Dunnigan et al., 1974) nur ein spezifisches Gewebe beeinflussen.

Obwohl die Positionen der Mutationen im Lamin A/C Gen bekannt sind, ist der genaue pathologische Mechanismus ungeklärt. Es gibt zwei Theorien, die versuchen den Krankheitsverlauf der Laminopathien zu erklären. Die erste, das Strukturmodell, beruht auf der Schwächung der strukturellen Integrität des Zellkerns in mechanisch beanspruchten Geweben wie z.B. dem Skelettmuskel. Nukleäre Defekte beeinflussen die Physiologie der Zellen und demzufolge auch die Histologie eines Gewebes. Die zweite Theorie, das Gen-Regulations-Modell, erklärt die Defekte mit einer gestörten Wechselwirkung zwischen den Laminen und den Transkriptionsregulatoren bzw. dem Chromatin (Worman und Courvalin, 2004). Es ist möglich, dass beide Erklärungen zutreffen.

Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse sowie kürzlicher Studien lässt sich ein drittes hypothetisches Pathologie-Modell der Laminopathien postulieren. Das nukleo-zytoplasmatische-Kommunikations-Modell basiert auf der kontinuierlichen Verknüpfung der Lamine mit dem Zytoskelett bzw. dem Zentrosom über die SUN/KASH-Protein Komplexe. Diese Verbindung könnte zur Folge haben, dass sich die nukleären Defekte nicht nur auf den Zellkern begrenzen, sondern sich darüber hinaus auch auf das Zytoplasma bzw. das Zytoskelett auswirken.

Bislang sind eine Vielzahl von Studien bekannt, die das nukleo-zytoplasmatische-Kommunikations-Modell stützen. Die nukleären Lamine sowie die SUN-Proteine beeinflussen die Topologie der Nesprine (Libotte et al., 2005; Padmakumar et al., 2005; Zhang et al., 2005). Zudem konnte von Muchir et al. (2006) gezeigt werden, dass die

Abwesenheit von Lamin A/C zu einem proteolytischen Verdau des Nesprin-1 führt. Darüber hinaus wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe einer Lamin A/C spezifischen shRNA die Abhängigkeit des Nesprin-2 von Lamin A/C bestätigt (s. Abb. 3.1.21 A). Zusätzliche Daten weisen daraufhin, dass die Abwesenheit des Lamin A/C die Anlagerung des KLC1 an der zytoplasmatischen Seite der Kernhülle beeinträchtigt (s. Abb. 3.1.21 B). Daneben beschreiben Stewart-Hutchinson et al. (2008) und Hale et al. (2008), dass die nukleäre Lamina, die SUN-Proteine sowie die KASH-Proteine für die zytoplasmatische Elastizität bzw. mechanische Festigkeit als auch für die Adhäsion der Zelle verantwortlich sind. Die Laminae sowie die SUN-Proteine und das Nesprin-2 kontrollieren die Lage des Zentrosoms und die Zellpolarität während der Migration (Lee et al., 2007; Lüke et al., 2008; Lüke, 2008; Xiong et al., 2008). Auch in *S. pombe* konnte nachgewiesen werden, dass eine Kommunikation zwischen Chromatin und Mikrotubulizytoskelett existiert (King et al., 2008). Demzufolge wird ersichtlich, dass Laminae über die SUN/KASH-Protein Komplexe in unterschiedlichen Organismen mit dem Zytoskelett bzw. dem Zentrosom kommunizieren.

Sowohl das Zytoskelett als auch das Zentrosom sind in eine Vielzahl von essentiellen zellulären Prozessen involviert, die den Aufbau und den Erhalt eines Gewebes bestimmen. Die symmetrische und asymmetrische Zellteilung, die für die Entwicklung eines Gewebes bzw. eines Organismus ausschlaggebend ist, basiert auf einem funktionellen Zytoskelett, das die Positionierung des Zentrosoms dirigiert (Lechler und Fuchs et al., 2005; Morrison und Kimble, 2006; Yamashita und Fuller, 2008). Folglich könnten solche Defekte wichtige Rollen in der Pathologie der Laminopathien besitzen.

Patienten, die das Hutchinson-Gilford-Progerie-Syndrom aufweisen, zeigen neben einer Vielzahl von klinischen Symptomen eine Wachstumsretardation. Interessanterweise verursachen auch Mutationen des Pericentrin (*PCNT2*) Gens eine Wachstumsstörung, die als mikrozephaler osteodysplastischer primordiale Zwergwuchs des Typs II (MOPD II; „microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism type II“) bezeichnet wird (Majewski und Goecke, 1998; Rauch et al., 2008). HGPS sowie MOPD II weisen ähnliche Wachstumsanomalien auf, wobei die von dem MOPD II betroffenen Menschen zu den kleinsten Menschen der Welt gehören. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Mutationen des Pericentrin Gens zu Zellzyklusdefekten führen, wodurch sich ein Gewebe bzw. Organismus nur bedingt entwickelt. Interessanterweise führt die Deletion des KLC1 Gens in Mäusen zu wesentlich kleineren Tieren (Rahman et al., 1999). Aufgrund dessen kann angenommen werden, dass es auch beim Hutchinson-Gilford-Progerie-Syndrom zu

einer gestörten Zellteilung kommt, wobei Nesprin-2 und KLC1 für diesen Mechanismus entscheidend sein könnten.

4.7 Dynactin (p150 Glued) ein neuer Interaktionspartner für Nesprin-1

Das Dynactin 1 (p150 Glued) Gen, das auch als DCTN1 bezeichnet wird, befindet sich auf Chromosom 2 (2p13) des menschlichen Genoms und umfasst ca. 25 kb mit 32 Exons (Holzbaur und Tokito, 1996; Tokito und Holzbaur, 1998). In bisherigen Studien konnten zwei verschiedene Spleiß-Varianten identifiziert werden. Das DCTN1 kodiert für die größte, ubiquitär exprimierte p150 Glued Isoform (150 kDa) und für eine kleinere, Gehirn-spezifische p150 Glued Isoform (135 kDa), der die N-terminale Mikrotubuli-Bindungsdomäne fehlt (Tokito et al., 1996). Da Nesprin-1-165 mit dem C-Terminus von p150 Glued interagiert (s. Abb. 3.2.3) und beide p150 Glued Isoformen sehr stark im neuronalen Gewebe exprimiert sind (Tokito und Holzbaur, 1998), könnte jede dieser Spleiß-Formen als Nesprin-1-165 Interaktionspartner in Frage kommen. Zudem könnten zwei weitere Nesprin-1 Isoformen aufgrund einer sehr hohen Homologie zu Nesprin-1-165 an Dynactin (p150 Glued) binden. Dabei handelt es sich um die größte Nesprin-1 Giant Isoform, welche den gesamten Sequenzbereich von Nesprin-1-165 enthält (Padmakumar et al., 2004) und CPG2 („candidate plasticity related gene“), eine kleine, Gehirn-spezifische Isoform, der die N-terminale Aktin-Bindungsdomäne von Nesprin-1-165 fehlt (Nedivi et al., 1996). Mit Hilfe dieser verschiedenen Isoformen könnte eine Vielzahl von unterschiedlichen zellulären Komponenten des Zytoskeletts miteinander verbunden werden.

Dynactin (p150 Glued) zeigt eine diffuse subzelluläre Lokalisierung und lässt ein punkartiges zytoplasmatisches Muster erkennen (s. Abb. 3.2.4 B), das sich über die ganze Zelle verteilt (Gill et al., 1991). Ursprünglich wurde angenommen, dass Dynactin nur für die Aktivierung des zytoplasmatischen Dynein verantwortlich ist, wodurch der Transport von Vesikeln und Organellen entlang der Mikrotubuli über sehr lange Distanzen ermöglicht wird (Schroer und Sheetz, 1991). Die derzeitige Literatur belegt jedoch, dass es nicht nur die Fähigkeit besitzt, Motoren zu binden bzw. zu aktivieren, sondern dass es das komplexe Mikrotubulinetzwerk zu organisieren vermag, um somit eine zytoplasmatische Organisation und subzelluläre Beweglichkeit in allen Phasen des Zellzyklus zu gewährleisten (Schroer, 2004).

Dynactin sammelt sich vor allem an den Zentrosomen und den Spindelpolen. An diesen Stellen ist es für die Verankerung der Mikrotubuli verantwortlich (Schroer, 2004).

Außerdem konnte Dynactin an der Peripherie der Zelle lokalisiert werden, wo es von großer Wichtigkeit für die Rotation der mitotischen Spindeln und die direkte Bewegung der Zelle ist (Busson et al., 1998; Skop und White, 1998; Gönczy et al., 1999; Dujardin et al., 2003). In *S. cerevisiae* konnte beobachtet werden, dass die periphere Lokalisation von Dynein bzw. Dynactin die Position des Zellkerns beeinflusst (Carminati und Stearns, 1997; Adames und Cooper, 2000). Der Dynein/Dynactin Komplex reguliert und kontrolliert möglicherweise an der Zellperipherie die Lage des Zellkerns und somit auch die Position der mitotischen Spindeln während der Zellteilung. Aufgrund dieser Annahme lässt die Kolo-kalisation von Nesprin-1-165 und Dynactin (p150 Glued) an der Zellperipherie (s. Abb. 3.2.4) vermuten, dass Nesprin-1 als peripherer Anker Dynactin (p150 Glued) an der Zellmembran befestigt. Dabei wird Nesprin-1 möglicherweise über andere Membranproteine wie z.B. das Ankyrin, das die verwandten Spektrine an der Plasmamembran stabilisiert, an der Zellmembran gehalten. Weiterhin könnte Nesprin-1 als eine Art Bindeglied fungieren, welches das Mikrotubulizytoskelett mit den Aktinfilamenten an der Zellmembran verknüpft.

Dynactin ist ebenfalls an Membranvesikel und zudem in bestimmten Phasen des Zellzyklus an der Zellkernmembran lokalisiert (Salina et al., 2002). Bisher wurde davon ausgegangen, dass Dynactin über Kernporenkomplexe und Vimentin an der Kernoberfläche gebunden wird (Payne et al., 2003). Eine weitere, vollkommen neue Möglichkeit eröffnet sich durch den Befund der Interaktion zwischen Dynactin (p150 Glued) und Nesprin-1 an der Kernmembran. Demzufolge würde eine direkte Bindung von p150 Glued mit der Kernmembran erklären, warum Mutationen im p150 Glued Gen einen Einfluss auf die apikale Migration des Zellkerns in den Rhabdomeren während der Entwicklung von *D. melanogaster* haben (Fan und Ready, 1997). Dementsprechend besteht die Möglichkeit, dass Nesprin-1 neben dem Aktinzytoskelett auch das Mikrotubulizytoskelett mit dem Zellkern verknüpfen kann. Nesprin-1 ist somit potentiell ein wichtiges Verbindungselement, das an der Organisation des Zytoplasmas und an der Beweglichkeit des Zellkerns beteiligt ist.

5 Zusammenfassung

Die in Vertebraten identifizierten Nesprine sind spezifische Gerüstproteine der Kernmembran, die zu den Mitgliedern der KASH- sowie Spektrin-Familie zählen. Evolutionär konservierte KASH-Proteine fungieren als einzigartige Bindeglieder, die den Zellkern in das angrenzende bzw. umlagernde Zytoskelett integrieren, um somit die Positionierung des Nukleus zu vermitteln. Obwohl die nukleäre Positionierung für eine Vielzahl von zellulären Prozessen wie Zellbewegung, Zellpolarität, Zellteilung und Entwicklung eines Gewebes von entscheidender Funktion ist, ist dieser Mechanismus bislang jedoch nur wenig erforscht.

Diese Studie liefert neue Hinweise, dass Nesprinen aufgrund von Assoziationen mit den molekularen Motorprotein Dynein/Dynactin sowie Kinesin 1 eine neue funktionelle Bedeutung an der Kernhülle zukommt. Die Basis dafür haben Hefe-Zwei-Hybrid Durchmusterungen gebildet, mit denen p150 Glued und die leichten Ketten des Kinesin 1 (KLC1) als neue Bindepartner für Nesprin-1 bzw. Nesprin-2 identifiziert werden konnten. Diese Interaktionen wurden *in vitro* sowie *in vivo* durch vielfältige biochemische und zellbiologische Methoden validiert. Darüber hinaus kann die Existenz zweier verschiedener subzellulärer Nesprin-2 Pools vermutet werden, die sich funktionell voneinander unterscheiden.

Die an der äußeren Kernmembran verankerten Nesprin-2 KASH-Isoformen erlauben die spezifische Bindung des KLC1 an der Kernhülle. KLC1 bildet mittels der schweren Kette des Kinesin 1 einen aktiven Mikrotubuli-Motorkomplex, der ein ausgeprägtes Mikrotubulnetzwerk rund um den Nukleus organisiert. Des Weiteren weist dieser Kernhüllen-assoziierte Pool auf das Vorhandensein eines aus C-terminalen Nesprin-2 Isoformen und SUN2 Proteinen bestehenden makromolekularen Komplexes hin, der über KLC1 mit zentrosomalen Proteinen wie dem Rootletin assoziiert. Es konnte gezeigt werden, dass diese Interaktion für die Anbindung des Zentrosoms an die Kernhülle erforderlich ist, da die Abwesenheit des Nesprin-2 sowie des KLC1 zu einer vergrößerten zentrosomalen Distanz zum Nukleus sowie zu einer defekten Zellpolarität führt.

Ein zweiter Pool, der C-terminale KASH-defiziente Nesprin-2 Isoformen umfasst, lokalisiert am Zentrosom und beeinflusst aufgrund der KLC1-Rootletin Assoziation die zentrosomale Kohäsion. Dieser zentrosomale Phänotyp ist auf Nesprin-2 knock out und KLC1 knock down Studien zurückzuführen, in denen eine erhöhte Zentrosomenanzahl nachgewiesen werden konnte. Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass die Nesprin-2 Proteine in eine Vielzahl von essentiellen zellulären Prozessen involviert sind.

Zudem beeinträchtigt die Verdrängung der Kernhüllen-assoziierten Nesprine die Positionierung der Mitochondrien wie auch den TGF- β Signalweg.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die äußere Kernmembran, ähnlich wie die innere Kernmembran, zu einer spezialisierten strukturellen Phasengrenzfläche organisiert ist. Daneben ist ersichtlich, dass die zentrosomale Biologie durch die Abwesenheit des Nesprin-2 verändert wird, wobei diese Veränderungen neue Einblicke in die Pathogenese von humanen degenerativen Erkrankungen erlauben.

6 Abstract

Nesprins are specific nuclear membrane scaffolding proteins that are members of the KASH- and spectrin-family in mammalian cells. Throughout evolution KASH-proteins function as specific tethering devices that integrate the nucleus with the surrounding cytoskeleton to warrant nuclear positioning. While nuclear positioning is a vital process, which governs a wide variety of cellular processes like cell motility, cell polarity, cell division and tissue morphogenesis, it still remains a poorly understood mechanism.

The current study provides evidence that Nesprins mediate important associations with the Dynein/Dynactin and Kinesin 1 based motor protein apparatus and shed insights into nuclear envelope affiliated functions. Using the yeast-two-hybrid screen the p150 Glued and Kinesin light chain 1 (KLC1) proteins are identified as Nesprin-1 and Nesprin-2 binding partners, respectively. These interactions are validated both *in vivo* and *in vitro* using a wide variety of biochemical and cell biological techniques. In addition, evidence is provided which favors the existence of two functionally distinct Nesprin-2 isoform pools.

Outer nuclear membrane (ONM) Nesprin-2 KASH-domain isoforms tether KLC1 specifically at the nuclear envelope (NE). The latter associates with Kinesin heavy chain and facilitates the distinct organization of the microtubule network around the nuclear surface. Furthermore, the existence of specific Nesprin-2 C-terminal isoform and SUN2 protein macromolecular assemblies is demonstrated that associate through KLC1 with centrosomal structural proteins such as Rootletin. We show that these associations are required for centrosomal tethering to the NE and when absent result in defective cell polarity.

A second pool of Nesprin-2 C-terminal KASH-deficient isoforms resides at the centrosome itself where it interacts with KLC1 and Rootletin to warrant centrosome cohesion. Intriguingly, the Nesprin-2 knock out and KLC1 silencing resulted in increased centrosomal numbers in mutant cells. These results suggest multiple and important functions for the Nesprin-2 proteins. Such thoughts are in agreement with our findings that Nesprins function in mitochondrial positioning and the TGF- β signaling pathway.

Collectively these data indicate that the ONM, similar to the inner nuclear membrane is organized as a specific structural interface. More importantly, the fact that major aspects of the centrosomal biology are affected in Nesprin-2 mutant cells paves the way to explore novel mechanisms in degenerative human diseases.

7 Literatur

- Adames, N.R. & Cooper, J.A. (2000). Microtubule interactions with the cell cortex causing nuclear movements in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **149**, 863-874.
- Alexandrow, M.G. & Moses, H.L. (1995). Transforming growth factor beta and cell cycle regulation. *Cancer Res.* **55**, 1452-1457.
- Apel, E.D., Lewis, R.M., Grady, R.M. & Sanes, J.R. (2000). Syne-1, a dystrophin- and Klarsicht-related protein associated with synaptic nuclei at the neuromuscular junction. *J. Biol. Chem.* **275**, 31986-31995.
- Askham, J.M., Vaughan, K.T., Goodson, H.V. & Morrison, E.E. (2002). Evidence that an interaction between EB1 and p150Glued is required for the formation and maintenance of a radial microtubule array anchored at the centrosome. *Mol. Biol. Cell* **13**, 3627-3645.
- Azimzadeh, J. & Bornens, M. (2004). The centrosome in evolution. *Centrosomes in Development and Disease* (ed. E. A. Nigg), **93-122**, Weinheim: Wiley-VCH.
- Azimzadeh, J. & Bornens, M. (2007). Structure and duplication of the centrosome. *J. Cell Sci.* **120**, 2139-2142. Review.
- Bahe, S., Stierhof, Y.D., Wilkinson, C.J., Leiss, F. & Nigg, E.A. (2005). Rootletin forms centriole-associated filaments and functions in centrosome cohesion. *J. Cell Biol.* **171**, 27-33.
- Batut, J., Howell, M. & Hill, C.S. (2007). Kinesin-mediated transport of Smad2 is required for signaling in response to TGF-beta ligands. *Dev. Cell* **12**, 261-274.
- Bengtsson, L. & Otto, H. (2008). LUMA interacts with emerin and influences its distribution at the inner nuclear membrane. *J. Cell Sci.* **121**, 536-548.
- Bettencourt-Dias, M., Rodrigues-Martins, A., Carpenter, L., Riparbelli, M., Lehmann, L., Gatt, M., Carmo, N., Balloux, F., Callaini, G. & Glover, D. (2005). SAK/PLK4 is required for centriole duplication and flagella development. *Curr. Biol.* **15**, 2199-2207.
- Biamonti, G., Giacca, M., Perini, G., Contreas, G., Zentilin, L., Weighardt, F., Guerra, M., Della Valle, G., Saccone, S. & Riva, S. (1992). The gene for a novel human lamin maps at a highly transcribed locus of chromosome 19 which replicates at the onset of S-phase. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 3499-3506.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Blagden, S.P. & Glover, D.M. (2003). Polar expeditions: provisioning the centrosome for mitosis. *Nat. Cell Biol.* **5**, 505-511.
- Blasius, T.L., Cai, D., Jih, G.T., Toret, C.P. & Verhey, K.J. (2007). Two binding partners cooperate to activate the molecular motor Kinesin-1. *J. Cell Biol.* **176**, 11-17.
- Blatch, G.L. & Lässle, M. (1999). The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* **21**, 932-939. Review.
- Blum, H., Beier, H. & Gross, H.J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- Bonne, G., Di Barletta, M.R., Varnous, S., Bécane, H.M., Hammouda, E.H., Merlini, L., Muntoni, F., Greenberg, C.R., Gary, F., Urtizberea, J.A., Duboc, D., Fardeau, M., Toniolo, D. & Schwartz, K. (1999). Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat. Genet.* **21**, 285-288.
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. & Fusenig, N.E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* **106**, 761-771.

- Braune, S. (2001). Identifizierung und Charakterisierung von Enaptin, einem neuen Protein vom α -Aktinin Typ. Dissertation. Universität zu Köln.
- Brinkley, B.R. & Goepfert, T.M. (1998). Supernumerary centrosomes and cancer: Boveri's hypothesis resurrected. *Cell Motil. Cytoskeleton* **41**, 281-288. Review.
- Broers, J.L., Ramaekers, F.C., Bonne, G., Yaou, R.B. & Hutchison, C.J. (2006). Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing. *Physiol. Rev.* **86**, 967-1008. Review.
- Busson, S., Dujardin, D., Moreau, A., Dompierre, J. & De Mey, J.R. (1998). Dynein and dynactin are localized to astral microtubules and at cortical sites in mitotic epithelial cells. *Curr. Biol.* **8**, 541-544.
- Cai, D., Hoppe, A.D., Swanson, J.A. & Verhey, K.J. (2007). Kinesin-1 structural organization and conformational changes revealed by FRET stoichiometry in live cells. *J. Cell Biol.* **176**, 51-63.
- Capell, B.C. & Collins, F.S. (2006). Human laminopathies: nuclei gone genetically awry. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 940-952. Review.
- Carminati, J.L. & Stearns, T. (1997). Microtubules orient the mitotic spindle in yeast through dynein-dependent interactions with the cell cortex. *J. Cell Biol.* **138**, 629-641.
- Chen, L., Lee, L., Kudlow, B.A., Dos Santos, H.G., Sletvold, O., Shafeghati, Y., Botha, E.G., Garg, A., Hanson, N.B., Martin, G.M., Mian, I.S., Kennedy, B.K. & Oshima, J. (2003). LMNA mutations in atypical Werner's syndrome. *Lancet* **362**, 440-445.
- Chretien, D., Buendia, B., Fuller, S.D. & Karsenti, E. (1997). Reconstruction of the centrosome cycle from cryoelectron micrographs. *J. Struct. Biol.* **120**, 117-133.
- Christodoulou, A., Lederer, C.W., Surrey, T., Vernos, I. & Santama, N. (2006). Motor protein KIFC5A interacts with Nubp1 and Nubp2, and is implicated in the regulation of centrosome duplication. *J. Cell Sci.* **119**, 2035-2047.
- Cottrell, J.R., Borok, E., Horvath, T.L. & Nedivi, E. (2004). CPG2: a brain- and synapse-specific protein that regulates the endocytosis of glutamate receptors. *Neuron* **44**, 677-690.
- Coy, D.L., Hancock, W.O., Wagenbach, M. & Howard, J. (1999). Kinesin's tail domain is an inhibitory regulator of the motor domain. *Nat. Cell Biol.* **1**, 288-292.
- Crisp, M., Liu, Q., Roux, K., Rattner, J.B., Shanahan, C., Burke, B., Stahl, P.D. & Hodzic, D. (2006). Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *J. Cell Biol.* **172**, 41-53.
- Crisp, M. & Burke, B. (2008). The nuclear envelope as an integrator of nuclear and cytoplasmic architecture. *FEBS Lett.* **582**, 2023-2032. Review.
- Dammermann, A. & Merdes, A. (2002). Assembly of centrosomal proteins and microtubule organization depends on PCM-1. *J. Cell Biol.* **159**, 255-266.
- Delgehyr, N., Sillibourne, J. & Bornens, M. (2005). Microtubule nucleation and anchoring at the centrosome are independent processes linked by ninein function. *J. Cell Sci.* **118**, 1565-1575.
- De Matteis, M.A. & Morrow, J.S. (2000). Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway. *J. Cell Sci.* **113**, 2331-2343. Review.
- Desai, A. & Mitchison, T.J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 83-117. Review.
- De Sandre-Giovannoli, A., Chaouch, M., Kozlov, S., Vallat, J.M., Tazir, M., Kassouri, N., Szepietowski, P., Hammadouche, T., Vandenberghe, A., Stewart, C.L., Grid, D. & Lévy, N. (2002). Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. *Am. J. Hum. Genet.* **70**, 726-736.

- Diefenbach, R.J., Mackay, J.P., Armati, P.J. & Cunningham, A.L. (1998). The C-terminal region of the stalk domain of ubiquitous human kinesin heavy chain contains the binding site for kinesin light chain. *Biochemistry* **37**, 16663-16670.
- Djinovic-Carugo, K., Gautel, M., Ylänne, J. & Young, P. (2002). The spectrin repeat: a structural platform for cytoskeletal protein assemblies. *FEBS Lett.* **513**, 119-123. Review.
- Downing, K.H. (2000). Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 89-111. Review.
- Doxsey, S. (1998). The centrosome--a tiny organelle with big potential. *Nat. Genet.* **20**, 104-106.
- Dreger, M., Bengtsson, L., Schöneberg, T., Otto, H. & Hucho, F. (2001). Nuclear envelope proteomics: novel integral membrane proteins of the inner nuclear membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 11943-11948.
- Dujardin, D.L., Barnhart, L.E., Stehman, S.A., Gomes, E.R., Gundersen, G.G. & Vallee, R.B. (2003). A role for cytoplasmic dynein and LIS1 in directed cell movement. *J. Cell Biol.* **163**, 1205-1211.
- Duncan, J.E. & Warrior, R. (2002). The cytoplasmic dynein and kinesin motors have interdependent roles in patterning the *Drosophila* oocyte. *Curr. Biol.* **12**, 1982-1991.
- Dunnigan, M.G., Cochrane, M.A., Kelly, A. & Scott, J.W. (1974). Familial lipotrophic diabetes with dominant transmission. A new syndrome. *Q. J. Med.* **43**, 33-48.
- Dutcher, S.K. (2001). The tubulin fraternity: alpha to eta. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 49-54. Review.
- Dutcher, S.K. (2003). Long-lost relatives reappear: identification of new members of the tubulin superfamily. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 634-640.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. & Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-498.
- Eriksson, M., Brown, W.T., Gordon, L.B., Glynn, M.W., Singer, J., Scott, L., Erdos, M.R., Robbins, C.M., Moses, T.Y., Berglund, P., Dutra, A., Pak, E., Durkin, S., Csoka, A.B., Boehnke, M., Glover, T.W. & Collins, F.S. (2003). Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* **423**, 293-298.
- Fan, J. & Amos, L.A. (1994). Kinesin light chain isoforms in *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* **240**, 507-512.
- Fan, J. & Beck, K.A. (2004). A role for the spectrin superfamily member Syne-1 and kinesin II in cytokinesis. *J. Cell Sci.* **117**, 619-629.
- Fan, S.S. & Ready, D.F. (1997). Glued participates in distinct microtubule-based activities in *Drosophila* eye development. *Development* **124**, 1497-1507.
- Fishkind, D.J. & Wang, Y.L. (1995). New horizons for cytokinesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 23-31.
- Fridkin, A., Mills, E., Margalit, A., Neufeld, E., Lee, K.K., Feinstein, N., Cohen, M., Wilson, K.L. & Gruenbaum, Y. (2004). Matefin, a *Caenorhabditis elegans* germ line-specific SUN-domain nuclear membrane protein, is essential for early embryonic and germ cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 6987-6992.
- Fry, A.M., Mayor, T., Meraldi, P., Stierhof, Y.D., Tanaka, K. & Nigg, E. A. (1998). C-Nap1, a novel centrosomal coiled-coil protein and candidate substrate of the cell cycle-regulated protein kinase Nek2. *J. Cell Biol.* **141**, 1563-1574.
- Fuchs, E. & Karakesisoglou, I. (2001). Bridging cytoskeletal intersections. *Genes Dev.* **15**, 1-14.

- Furukawa, K. & Hotta, Y. (1993). cDNA cloning of a germ cell specific lamin B3 from mouse spermatocytes and analysis of its function by ectopic expression in somatic cells. *EMBO J.* **12**, 97-106.
- Garcia, M.L. & Cleveland, D.W. (2001). Going new places using an old MAP: tau, microtubules and human neurodegenerative disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 41-48. Review.
- Gerace, L. & Burke, B. (1988). Functional organization of the nuclear envelope. *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**, 335-374. Review.
- Gill, S.R., Schroer, T.A., Szilak, I., Steuer, E.R., Sheetz, M.P. & Cleveland, D.W. (1991). Dynactin, a conserved, ubiquitously expressed component of an activator of vesicle motility mediated by cytoplasmic dynein. *J. Cell Biol.* **115**, 1639-1650.
- Gillingham, A.K. & Munro, S. (2000). The PACT domain, a conserved centrosomal targeting motif in the coiled-coil proteins AKAP450 and pericentrin. *EMBO Rep.* **1**, 524-529.
- Gindhart, J.G. Jr. & Goldstein, L.S. (1996). Tetratricopeptide repeats are present in the kinesin light chain. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 52-53.
- Glater, E.E., Megeath, L.J., Stowers, R.S. & Schwarz, T.L. (2006). Axonal transport of mitochondria requires Milton to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent. *J. Cell Biol.* **173**, 545-557.
- Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**, 175-182.
- Goldman, R.D., Gruenbaum, Y., Moir, R.D., Shumaker, D.K. & Spann, T.P. (2002). Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *Genes Dev.* **16**, 533-547. Review.
- Gomes, E.R., Jani, S. & Gundersen, G.G. (2005). Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells. *Cell* **121**, 451-463.
- Gönczy, P., Pichler, S., Kirkham, M. & Hyman, A.A. (1999). Cytoplasmic dynein is required for distinct aspects of MTOC positioning, including centrosome separation, in the one cell stage *Caenorhabditis elegans* embryo. *J. Cell Biol.* **147**, 135-150.
- Grady, R.M., Starr, D.A., Ackerman, G.L., Sanes, J.R. & Han, M. (2005). Syne proteins anchor muscle nuclei at the neuromuscular junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 4359-4364.
- Graser, S., Stierhof, Y.D. & Nigg, E.A. (2007). Cep68 and Cep215 (Cdk5rap2) are required for centrosome cohesion. *J. Cell Sci.* **120**, 4321-4331.
- Gruenbaum, Y., Goldman, R.D., Meyuhas, R., Mills, E., Margalit, A., Fridkin, A., Dayani, Y., Prokocimer, M. & Enosh, A. (2003). The nuclear lamina and its functions in the nucleus. *Int. Rev. Cytol.* **226**, 1-62. Review.
- Gruenbaum, Y., Margalit, A., Goldman, R.D., Shumaker, D.K. & Wilson, K.L. (2005). The nuclear lamina comes of age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 21-31. Review.
- Gyoeva, F.K., Bybikova, E.M. & Minin, A.A. (2000). An isoform of kinesin light chain specific for the Golgi complex. *J. Cell Sci.* **113**, 2047-2054.
- Habedanck, R., Stierhof, Y., Wilkinson, C.J. & Nigg, E.A. (2005). The Polo kinase Plk4 functions in centriole duplication. *Nat. Cell Biol.* **7**, 1140-1146.
- Hagan, I. & Yanagida, M. (1995). The product of the spindle formation gene *sad1+* associates with the fission yeast spindle pole body and is essential for viability. *J. Cell Biol.* **129**, 1033-1047.
- Hale, C.M., Shrestha, A.L., Khatau, S.B., Stewart-Hutchinson, P.J., Hernandez, L., Stewart, C.L., Hodzic, D. & Wirtz, D. (2008). Dysfunctional connections between the nucleus and the actin and microtubule networks in laminopathic models. *Biophys. J.* **95**, 5462-5475.

- Hames, R.S., Crookes, R.E., Straatman, K.R., Merdes, A., Hayes, M.J., Faragher, A.J. & Fry, A.M. (2005). Dynamic recruitment of Nek2 kinase to the centrosome involves microtubules, PCM-1, and localized proteasomal degradation. *Mol. Biol. Cell* **16**, 1711-1724.
- Haque, F., Lloyd, D.J., Smallwood, D.T., Dent, C.L., Shanahan, C.M., Fry, A.M., Trembath, R.C. & Shackleton, S. (2006). SUN1 interacts with nuclear lamin A and cytoplasmic nesprins to provide a physical connection between the nuclear lamina and the cytoskeleton. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 3738-3751.
- Haraguchi, K., Hayash, T., Jimbo, T., Yamamoto, T. & Akiyama, T. (2006). Role of the kinesin-2 family protein, KIF3, during mitosis. *J. Biol. Chem.* **281**, 4094-4099.
- Harborth, J., Elbashir, S.M., Bechert, K., Tuschl, T. & Weber, K. (2001). Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J. Cell Sci.* **114**, 4557-4565.
- Hedgecock, E.M. & Thomson, J.N. (1982). A gene required for nuclear and mitochondrial attachment in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cell* **30**, 321-330.
- Helps, N.R., Luo, X., Barker, H.M. & Cohen, P.T. (2000). NIMA-related kinase 2 (Nek2), a cell-cycleregulated protein kinase localized to centrosomes, is complexed to protein phosphatase 1. *Biochem. J.* **349**, 509-518.
- Herrmann, H. & Aebi, U. (1998). Structure, assembly, and dynamics of intermediate filaments. *Subcell. Biochem.* **31**, 319-362. Review.
- Herrmann, H. & Aebi, U. (2004). Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 749-789. Review.
- Hinchcliffe, E.H., Li, C., Thompson, E.A., Maller, J.L. & Sluder, G. (1999). Requirement of Cdk2-cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in *Xenopus* egg extracts. *Science* **283**, 851-854.
- Hirokawa, N. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* **279**, 519-526. Review.
- Hodzic, D.M., Yeater, D.B., Bengtsson, L., Otto, H. & Stahl, P.D. (2004). Sun2 is a novel mammalian inner nuclear membrane protein. *J. Biol. Chem.* **279**, 25805-25812.
- Hoffner, G. & Djian, P. (2002). Protein aggregation in Huntington's disease. *Biochimie* **84**, 273-278. Review.
- Holaska, J.M., Kowalski, A.K. & Wilson, K.L. (2004). Emerin caps the pointed end of actin filaments: evidence for an actin cortical network at the nuclear inner membrane. *PLoS Biol.* **2**, E231.
- Holleran, E.A., Ligon, L.A., Tokito, M., Stankewich, M.C., Morrow, J.S. & Holzbaur, E.L. (2001). beta III spectrin binds to the Arp1 subunit of dynactin. *J. Biol. Chem.* **276**, 36598-36605.
- Holmer, L. & Worman, H.J. (2001). Inner nuclear membrane proteins: functions and targeting. *Cell Mol. Life Sci.* **58**, 1741-1747. Review.
- Holzbaur, E.L. & Tokito, M.K. (1996). Localization of the DCTN1 gene encoding p150Glued to human chromosome 2p13 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* **31**, 398-399.
- Howard, J. (1996). The movement of kinesin along microtubules. *Annu. Rev. Physiol.* **58**, 703-729. Review.
- Inagaki, M., Moustakas, A., Lin, H.Y., Lodish, H.F. & Carr, B.I. (1993). Growth inhibition by transforming growth factor beta (TGF-beta) type I is restored in TGF-beta-resistant hepatoma cells after expression of TGF-beta receptor type II cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 5359-5363.

- Inman, G.J., Nicolás, F.J. & Hill, C.S. (2002). Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF-beta receptor activity. *Mol. Cell* **10**, 283-294.
- Januschke, J., Gervais, L., Dass, S., Kaltschmidt, J.A., Lopez-Schier, H., St Johnston, D., Brand, A.H., Roth, S. & Guichet, A. (2002). Polar transport in the Drosophila oocyte requires Dynein and Kinesin I cooperation. *Curr. Biol.* **12**, 1971-1981.
- Jaspersen, S.L., Martin, A.E., Glazko, G., Giddings, T.H. Jr, Morgan, G., Mushegian, A. & Winey, M. (2006). The Sad1-UNC-84 homology domain in Mps3 interacts with Mps2 to connect the spindle pole body with the nuclear envelope. *J. Cell Biol.* **174**, 665-675.
- Junco, A., Bhullar, B., Tarnasky, H.A. & van der Hoorn, F.A. (2001). Kinesin light-chain KLC3 expression in testis is restricted to spermatids. *Biol. Reprod.* **64**, 1320-1330.
- Kanai, Y., Dohmae, N. & Hirokawa, N. (2004). Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* **43**, 513-525.
- Kandert, S., Lüke, Y., Kleinhenz, T., Neumann, S., Lu, W., Jaeger, V.M., Munck, M., Wehnert, M., Müller, C.R., Zhou, Z., Noegel, A.A., Dabauvalle, M.C. & Karakesisoglou, I. (2007). Nesprin-2 giant safeguards nuclear envelope architecture in LMNA S143F progeria cells. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 2944-2959.
- Kennedy, C., Sebire, K., de Kretser, D.M. & O'Bryan, M.K. (2004). Human sperm associated antigen 4 (SPAG4) is a potential cancer marker. *Cell Tissue Res.* **315**, 279-283.
- Ketelaar, T., Faivre-Moskalenko, C., Esseling, J.J., de Ruijter, N.C., Grierson, C.S., Dogterom, M. & Emons, A.M. (2002). Positioning of nuclei in Arabidopsis root hairs: an actin-regulated process of tip growth. *Plant Cell* **14**, 2941-2955.
- Ketema, M., Wilhelmsen, K., Kuikman, I., Janssen, H., Hodzic, D. & Sonnenberg, A. (2007). Requirements for the localization of nesprin-3 at the nuclear envelope and its interaction with plectin. *J. Cell Sci.* **120**, 3384-3394.
- Khodjakov, A., Lizunova, E.M., Minin, A.A., Koonce, M.P. & Gyoeva, F.K. (1998). A specific light chain of kinesin associates with mitochondria in cultured cells. *Mol. Biol. Cell* **9**, 333-343.
- King, M.C., Drivas, T.G. & Blobel, G. (2008). A network of nuclear envelope membrane proteins linking centromeres to microtubules. *Cell* **134**, 427-438.
- King, S.J. & Schroer, T.A. (2000). Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor. *Nat. Cell Biol.* **2**, 20-24.
- King, S.M. (2000). The dynein microtubule motor. *Biochim. Biophys. Acta* **1496**, 60-75. Review.
- Konecna, A., Frischknecht, R., Kinter, J., Ludwig, A., Steuble, M., Meskenaite, V., Indermühle, M., Engel, M., Cen, C., Mateos, J.M., Streit, P. & Sonderegger, P. (2006). Calsyntenin-1 docks vesicular cargo to kinesin-1. *Mol. Biol. Cell* **17**, 3651-3663.
- Koonce, M.P. & Samsó, M. (2004). Of rings and levers: the dynein motor comes of age. *Trends Cell Biol.* **14**, 612-619. Review.
- Kracklauer, M.P., Banks, S.M., Xie, X., Wu, Y. & Fischer, J.A. (2007). Drosophila klaroid encodes a SUN domain protein required for klarsicht localization to the nuclear envelope and nuclear migration in the eye. *Fly (Austin)* **1**, 75-85.
- Kubo, A., Sasaki, H., Yuba-Kubo, A., Tsukita, S. & Shiina, N. (1999). Centriolar satellites: molecular characterization, ATP-dependent movement toward centrioles and possible involvement in ciliogenesis. *J. Cell Biol.* **147**, 969-980.
- Kwok, B.H., Yang, J.G. & Kapoor, T.M. (2004). The rate of bipolar spindle assembly depends on the microtubule-gliding velocity of the mitotic kinesin Eg5. *Curr. Biol.* **14**, 1783-1788.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

- Laiho, M., DeCaprio, J.A., Ludlow, J.W., Livingston, D.M. & Massagué, J. (1990). Growth inhibition by TGF-beta linked to suppression of retinoblastoma protein phosphorylation. *Cell* **62**, 175-185.
- Lamb, J.R., Tugendreich, S. & Hieter, P. (1995). Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends Biochem. Sci.* **20**, 257-259.
- Langford, G.M. (1995). Actin- and microtubule-dependent organelle motors: interrelationships between the two motility systems. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 82-88. Review.
- Lawrence, C.J., Dawe, R.K., Christie, K.R., Cleveland, D.W., Dawson, S.C., Endow, S.A., Goldstein, L.S., Goodson, H.V., Hirokawa, N., Howard, J., Malmberg, R.L., McIntosh, J.R., Miki, H., Mitchison, T.J., Okada, Y., Reddy, A.S., Saxton, W.M., Schliwa, M., Scholey, J.M., Vale, R.D., Walczak, C.E. & Wordeman, L. (2004). A standardized kinesin nomenclature. *J. Cell Biol.* **167**, 19-22.
- Lechler, T. & Fuchs, E. (2005). Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature* **437**, 275-280.
- Lee, K.K., Starr, D., Cohen, M., Liu, J., Han, M., Wilson, K.L. & Gruenbaum, Y. (2002). Lamin-dependent localization of UNC-84, a protein required for nuclear migration in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell* **13**, 892-901.
- Lee, J.S., Hale, C.M., Panorchan, P., Khatau, S.B., George, J.P., Tseng, Y., Stewart, C.L., Hodzic, D. & Wirtz, D. (2007). Nuclear lamin A/C deficiency induces defects in cell mechanics, polarization, and migration. *Biophys. J.* **93**, 2542-2552.
- Leidel, S., Delattre, M., Cerutti, L., Baumer, K. & Gonczy, P. (2005). SAS-6 defines a protein family required for centrosome duplication in *C. elegans* and in human cells. *Nat. Cell Biol.* **7**, 115-125.
- Lenz-Böhme, B., Wismar, J., Fuchs, S., Reifegerste, R., Buchner, E., Betz, H. & Schmitt, B. (1997). Insertional mutation of the *Drosophila* nuclear lamin Dm0 gene results in defective nuclear envelopes, clustering of nuclear pore complexes, and accumulation of annulate lamellae. *J. Cell Biol.* **137**, 1001-1016.
- Li, R. & Gundersen, G.G. (2008). Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds a polarized cell. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 860-873. Review.
- Libotte, T. (2004). Charakterisierung von NUANCE, einem Protein der α -Aktinin Superfamilie. Dissertation. Universität zu Köln.
- Libotte, T., Zaim, H., Abraham, S., Padmakumar, V.C., Schneider, M., Lu, W., Munck, M., Hutchison, C., Wehnert, M., Fahrenkrog, B., Sauder, U., Aebi, U., Noegel, A.A. & Karakesisoglou, I. (2005). Lamin A/C-dependent localization of Nesprin-2, a giant scaffold at the nuclear envelope. *Mol. Biol. Cell* **16**, 3411-3424.
- Ligon, L.A. & Steward, O. (2000). Role of microtubules and actin filaments in the movement of mitochondria in the axons and dendrites of cultured hippocampal neurons. *J. Comp. Neurol.* **427**, 351-361.
- Lin, F. & Worman, H.J. (1995). Structural organization of the human gene (LMNB1) encoding nuclear lamin B1. *Genomics* **27**, 230-236.
- Ling, S.C., Fahrner, P.S., Greenough, W.T. & Gelfand, V.I. (2004). Transport of *Drosophila* fragile X mental retardation protein-containing ribonucleoprotein granules by kinesin-1 and cytoplasmic dynein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 17428-17433.
- Liu, J., Rolef Ben-Shahar, T., Riemer, D., Treinin, M., Spann, P., Weber, K., Fire, A. & Gruenbaum, Y. (2000). Essential roles for *Caenorhabditis elegans* lamin gene in nuclear organization, cell cycle progression, and spatial organization of nuclear pore complexes. *Mol. Biol. Cell* **11**, 3937-3947.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Darnell, J.E. (1999). Molecular Cell Biology. Edition 67, New York, W. H. Freeman & Co.

- Lu, W. (2007). SUN proteins in higher eukaryotes, „structural bridges“ connecting the nuclear interior with the cytoskeleton. Dissertation. Universität zu Köln.
- Lu, W., Gotzmann, J., Sironi, L., Jaeger, V.M., Schneider, M., Lüke, Y., Uhlén, M., Szigyarto, C.A., Brachner, A., Ellenberg, J., Foisner, R., Noegel, A.A. & Karakesisoglou, I. (2008). Sun1 forms immobile macromolecular assemblies at the nuclear envelope. *Biochim. Biophys. Acta* **1783**, 2415-2426.
- Lüke, Y., Zaim, H., Karakesisoglou, I., Jaeger, V.M., Sellin, L., Lu, W., Schneider, M., Neumann, S., Beijer, A., Munck, M., Padmakumar, V.C., Gloy, J., Walz, G. & Noegel, A.A. (2008). Nesprin-2 Giant (NUANCE) maintains nuclear envelope architecture and composition in skin. *J. Cell Sci.* **12**, 1887-1898.
- Lüke, Y. (2008). Charakterisierung der Nesprin-2 Giant Funktionen bei der Kernmembranarchitektur und in Laminopathien. Dissertation. Universität zu Köln.
- Machiels, B.M., Zorenc, A.H., Endert, J.M., Kuijpers, H.J., van Eys, G.J., Ramaekers, F.C. & Broers, J.L. (1996). An alternative splicing product of the lamin A/C gene lacks exon 10. *J. Biol. Chem.* **271**, 9249-9253.
- Main, E.R., Xiong, Y., Cocco, M.J., D'Andrea, L. & Regan, L. (2003). Design of stable alpha-helical arrays from an idealized TPR motif. *Structure* **11**, 497-508.
- Majewski, F. & Goecke, T.O. (1998). Microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism type II: report of three cases and review. *Am. J. Med. Genet.* **80**, 25-31. Review.
- Malone, C.J., Fixsen, W.D., Horvitz, H.R. & Han, M. (1999). UNC-84 localizes to the nuclear envelope and is required for nuclear migration and anchoring during *C. elegans* development. *Development* **126**, 3171-3181.
- Malone, C.J., Misner, L., Le Bot, N., Tsai, M.C., Campbell, J.M., Ahringer, J. & White, J.G. (2003). The *C. elegans* hook protein, ZYG-12, mediates the essential attachment between the centrosome and nucleus. *Cell* **115**, 825-836.
- Mandelkow, E. & Mandelkow, E.M. (1995). Microtubules and microtubule-associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 72-81. Review.
- Mandelkow, E. & Mandelkow, E.M. (2002). Kinesin motors and disease. *Trends Cell Biol.* **12**, 585-591. Review.
- Manneville, J.B. & Etienne-Manneville, S. (2006). Positioning centrosomes and spindle poles: looking at the periphery to find the centre. *Biol. Cell* **98**, 557-565. Review.
- Markowitz, S.D. & Roberts, A.B. (1996). Tumor suppressor activity of the TGF-beta pathway in human cancers. *Cytokine Growth Factor Rev.* **7**, 93-102. Review.
- Massagué, J. (2000). How cells read TGF-beta signals. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **1**, 169-178. Review.
- Massagué, J. & Wotton, D. (2000). Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.* **19**, 1745-1754. Review.
- Matthews, P.B. (1981). Evolving views on the internal operation and functional role of the muscle spindle. *J. Physiol.* **320**, 1-30. Review.
- Mattout, A., Dechat, T., Adam, S.A., Goldman, R.D. & Gruenbaum, Y. (2006). Nuclear lamins, diseases and aging. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 335-341. Review.
- McCart, A.E., Mahony, D. & Rothnagel, J.A. (2003). Alternatively spliced products of the human kinesin light chain 1 (KNS2) gene. *Traffic* **4**, 576-580.
- Meraldi, P., Lukas, J., Fry, A.M., Bartek, J. & Nigg, E.A. (1999). Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk2-cyclin A. *Nat. Cell Biol.* **1**, 88-93.
- Meraldi, P. & Nigg, E.A. (2001). Centrosome cohesion is regulated by a balance of kinase and phosphatase activities. *J. Cell Sci.* **114**, 3749-3757.
- Miki, H., Setou, M., Kaneshiro, K. & Hirokawa, N. (2001). All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 7004-7011.

- Minin, A.A., Kulik, A.V., Gyoeva, F.K., Li, Y., Goshima, G. & Gelfand, V.I. (2006). Regulation of mitochondria distribution by RhoA and formins. *J. Cell Sci.* **119**, 659-670.
- Mislow, J.M., Holaska, J.M., Kim, M.S., Lee, K.K., Segura-Totten, M., Wilson, K.L. & McNally, E.M. (2002). Nesprin-1alpha self-associates and binds directly to emerin and lamin A in vitro. *FEBS Lett.* **525**, 135-140.
- Mogensen, M., Malik, A., Piel, M., Bouckson-Castaing, V. & Bornens, M. (2000). Microtubule minus-end anchorage at centrosomal and non-centrosomal sites: the role of ninein. *J. Cell Sci.* **113**, 3013-3023.
- Moir, R.D., Yoon, M., Khuon, S. & Goldman, R.D. (2000). Nuclear lamins A and B1: different pathways of assembly during nuclear envelope formation in living cells. *J. Cell Biol.* **151**, 1155-1168.
- Moritz, M., Braunfeld, M.B., Guénebaut, V., Heuser, J. & Agard, D.A. (2000). Structure of the gamma-tubulin ring complex: a template for microtubule nucleation. *Nat. Cell Biol.* **2**, 365-370.
- Morris, R.L. & Hollenbeck, P.J. (1995). Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons. *J. Cell Biol.* **131**, 1315-1326.
- Morris, N.R., Efimov, V.P. & Xiang, X. (1998). Nuclear migration, nucleokinesis and lissencephaly. *Trends Cell Biol.* **8**, 467-470. Review.
- Morris, N.R. (2000). Nuclear migration. From fungi to the mammalian brain. *J. Cell Biol.* **148**, 1097-1101. Review.
- Morrison, S.J. & Kimble, J. (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* **441**, 1068-1074. Review.
- Muchir, A., van Engelen, B.G., Lammens, M., Mislow, J.M., McNally, E., Schwartz, K. & Bonne, G. (2003). Nuclear envelope alterations in fibroblasts from LGMD1B patients carrying nonsense Y259X heterozygous or homozygous mutation in lamin A/C gene. *Exp. Cell Res.* **291**, 352-362.
- Muchir, A., Massart, C., van Engelen, B.G., Lammens, M., Bonne, G. & Worman, H.J. (2006). Proteasome-mediated degradation of integral inner nuclear membrane protein emerin in fibroblasts lacking A-type lamins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **351**, 1011-1017.
- Murphy, D.B. (1991). Functions of tubulin isoforms. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**, 43-51. Review.
- Nedivi, E., Fieldust, S., Theill, L.E. & Hevron, D. (1996). A set of genes expressed in response to light in the adult cerebral cortex and regulated during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 2048-2053.
- Newport, J.W., Wilson, K.L. & Dunphy, W.G. (1990). A lamin-independent pathway for nuclear envelope assembly. *J. Cell Biol.* **111**, 2247-2259.
- Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R.A. & Downing, K.H. (1999). High-resolution model of the microtubule. *Cell* **96**, 79-88.
- Oakley, B.R. (2000). An abundance of tubulins. *Trends Cell Biol.* **10**, 537-542. Review.
- Paddison, P.J., Caudy, A.A., Bernstein, E., Hannon, G.J. & Conklin, D.S. (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.* **16**, 948-958.
- Padmakumar, V.C. (2004). Characterisation of Enaptin and Sun1, two novel mammalian nuclear envelope proteins. Dissertation. Universität zu Köln.
- Padmakumar, V.C., Abraham, S., Braune, S., Noegel, A.A., Tunggal, B., Karakesisoglou, I. & Korenbaum, E. (2004). Enaptin, a giant actin-binding protein, is an element of the nuclear membrane and the actin cytoskeleton. *Exp. Cell Res.* **295**, 330-339.
- Padmakumar, V.C., Libotte, T., Lu, W., Zaim, H., Abraham, S., Noegel, A.A., Gotzmann, J., Foisner, R. & Karakesisoglou, I. (2005). The inner nuclear membrane protein Sun1

- mediates the anchorage of Nesprin-2 to the nuclear envelope. *J. Cell Sci.* **118**, 3419-3430.
- Paintrand, M., Moudjou, M., Delacroix, H. & Bornens, M. (1992). Centrosome organization and centriole architecture: their sensitivity to divalent cations. *J. Struct. Biol.* **108**, 107-128.
- Patterson, K., Molofsky, A.B., Robinson, C., Acosta, S., Cater, C. & Fischer, J.A. (2004). The functions of Klarsicht and nuclear lamin in developmentally regulated nuclear migrations of photoreceptor cells in the *Drosophila* eye. *Mol. Biol. Cell* **15**, 600-610.
- Payne, C., Rawe, V., Ramalho-Santos, J., Simerly, C. & Schatten, G. (2003). Preferentially localized dynein and perinuclear dynactin associate with nuclear pore complex proteins to mediate genomic union during mammalian fertilization. *J. Cell Sci.* **116**, 4727-4738.
- Piel, M., Meyer, P., Khodjakov, A., Rieder, C. L. & Bornens, M. (2000). The respective contributions of the mother and daughter centrioles to centrosome activity and behavior in vertebrate cells. *J. Cell Biol.* **149**, 317-329.
- Pierre, P., Scheel, J., Rickard, J.E. & Kreis, T.E. (1992). CLIP-170 links endocytic vesicles to microtubules. *Cell* **70**, 887-900.
- Pilling, A.D., Horiuchi, D., Lively, C.M. & Saxton, W.M. (2006). Kinesin-1 and Dynein are the primary motors for fast transport of mitochondria in *Drosophila* motor axons. *Mol. Biol. Cell* **17**, 2057-2068.
- Quintyne, N.J. & Schroer, T.A. (2002). Distinct cell cycle-dependent roles for dynactin and dynein at centrosomes. *J. Cell Biol.* **159**, 245-254.
- Rahman, A., Kamal, A., Roberts, E.A. & Goldstein, L.S. (1999). Defective kinesin heavy chain behavior in mouse kinesin light chain mutants. *J. Cell Biol.* **146**, 1277-1288.
- Rauch, A., Thiel, C.T., Schindler, D., Wick, U., Crow, Y.J., Ekici, A.B., van Essen, A.J., Goecke, T.O., Al-Gazali, L., Chrzanowska, K.H., Zweier, C., Brunner, H.G., Becker, K., Curry, C.J., Dallapiccola, B., Devriendt, K., Dörfler, A., Kinning, E., Megarbane, A., Meinecke, P., Semple, R.K., Spranger, S., Toutain, A., Trembath, R.C., Voss, E., Wilson, L., Hennekam, R., de Zegher, F., Dörr, H.G. & Reis, A. (2008). Mutations in the pericentrin (PCNT) gene cause primordial dwarfism. *Science* **319**, 816-819.
- Reinsch, S. & Gönczy, P. (1998). Mechanisms of nuclear positioning. *J. Cell Sci.* **111**, 2283-2295. Review.
- Rice, S.E. & Gelfand, V.I. (2006). Paradigm lost: miton connects kinesin heavy chain to miro on mitochondria. *J. Cell Biol.* **173**, 459-461. Review.
- Rickard, J.E. & Kreis, T.E. (1996). CLIPs for organelle-microtubule interactions. *Trends Cell Biol.* **6**, 178-183.
- Rodrigues-Martins, A., Riparbelli, M., Callaini, G., Glover, D.M. & Bettencourt-Dias, M. (2007). Revisiting the role of the mother centriole in centriole biogenesis. *Science* **316**, 1046-1050.
- Rolls, M.M., Stein, P.A., Taylor, S.S., Ha, E., McKeon, F. & Rapoport, T.A. (1999). A visual screen of a GFP-fusion library identifies a new type of nuclear envelope membrane protein. *J. Cell Biol.* **146**, 29-44.
- Rosenberg-Hasson, Y., Renert-Pasca, M. & Volk, T. (1996). A *Drosophila* dystrophin-related protein, MSP-300, is required for embryonic muscle morphogenesis. *Mech. Dev.* **60**, 83-94.
- Röber, R.A., Weber, K. & Osborn, M. (1989). Differential timing of nuclear lamin A/C expression in the various organs of the mouse embryo and the young animal: a developmental study. *Development* **105**, 365-378.
- Salina, D., Bodoor, K., Eckley, D.M., Schroer, T.A., Rattner, J.B. & Burke, B. (2002). Cytoplasmic dynein as a facilitator of nuclear envelope breakdown. *Cell* **108**, 97-107.

- Salisbury, J.L., Whitehead, C.M., Lingle, W.L. & Barrett, S.L. (1999). Centrosomes and cancer. *Biol. Cell* **91**, 451-460. Review.
- Salpingidou, G., Smertenko, A., Hausmanowa-Petrucewicz, I., Hussey, P.J. & Hutchison, C.J. (2007). A novel role for the nuclear membrane protein emerlin in association of the centrosome to the outer nuclear membrane. *J. Cell Biol.* **178**, 897-904.
- Sambrook, J., Russell, D. & Russell, D.W. (2001). Molecular cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring, NY.
- Schiebel, E. (2000). Two new tubulins differ in a split decision. *Nat. Cell Biol.* **2**, 3-4.
- Schief, W.R. & Howard, J. (2001). Conformational changes during kinesin motility. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 19-28. Review.
- Schindler, M., Holland, J.F. & Hogan, M. (1985). Lateral diffusion in nuclear membranes. *J. Cell Biol.* **100**, 1408-1414.
- Schirmer, E.C., Florens, L., Guan, T., Yates, J.R., 3rd & Gerace, L. (2003). Nuclear membrane proteins with potential disease links found by subtractive proteomics. *Science* **301**, 1380-1382.
- Schliwa, M. & Woehlke, G. (2003). Molecular motors. *Nature* **422**, 759-765. Review.
- Schneider, M. (2005). Ermittlung neuer NUANCE und Enaptin bindender Proteine mittels des Zwei-Hybrid-Systems. Diplomarbeit. Universität zu Köln.
- Schneider, M., Noegel, A.A. & Karakesisoglou, I. (2008). KASH-domain proteins and the cytoskeletal landscapes of the nuclear envelope. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 1368-1372.
- Schreiner, T. (2000). Untersuchungen zur in vivo Funktion von Comitin einem Aktin bindenden Membranprotein aus Dictyostelium discoideum. Dissertation. Universität zu Köln.
- Schroer, T.A. & Sheetz, M.P. (1991). Two activators of microtubule-based vesicle transport. *J. Cell Biol.* **115**, 1309-1318.
- Schroer, T.A. (2004). Dynactin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 759-779. Review.
- Shimanuki, M., Miki, F., Ding, D.Q., Chikashige, Y., Hiraoka, Y., Horio, T. & Niwa, O. (1997). A novel fission yeast gene, kms1+, is required for the formation of meiotic prophase-specific nuclear architecture. *Mol. Gen. Genet.* **254**, 238-249.
- Simpson, J.G. & Roberts, R.G. (2008). Patterns of evolutionary conservation in the nesprin genes highlight probable functionally important protein domains and isoforms. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 1359-1367.
- Sjöblom, T., Jones, S., Wood, L.D., Parsons, D.W., Lin, J., Barber, T.D., Mandelker, D., Leary, R.J., Ptak, J., Silliman, N., Szabo, S., Buckhaults, P., Farrell, C., Meeh, P., Markowitz, S.D., Willis, J., Dawson, D., Willson, J.K., Gazdar, A.F., Hartigan, J., Wu, L., Liu, C., Parmigiani, G., Park, B.H., Bachman, K.E., Papadopoulos, N., Vogelstein, B., Kinzler, K.W. & Velculescu, V.E. (2006). The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* **314**, 268-274.
- Skop, A.R. & White, J.G. (1998). The dynactin complex is required for cleavage plane specification in early *Caenorhabditis elegans* embryos. *Curr. Biol.* **8**, 1110-1116.
- Starr, D.A. & Han, M. (2002). Role of ANC-1 in tethering nuclei to the actin cytoskeleton. *Science* **298**, 406-409.
- Starr, D.A. & Han, M. (2003). ANChors away: an actin based mechanism of nuclear positioning. *J. Cell Sci.* **116**, 211-216. Review.
- Starr, D.A. & Fischer, J.A. (2005). KASH 'n Karry: the KASH domain family of cargo-specific cytoskeletal adaptor proteins. *Bioessays* **27**, 1136-1146. Review.
- Starr, D.A. (2007). Communication between the cytoskeleton and the nuclear envelope to position the nucleus. *Mol. Biosyst.* **3**, 583-589.
- Stenoien, D.L. & Brady, S.T. (1997). Immunochemical analysis of kinesin light chain function. *Mol. Biol. Cell* **8**, 675-689.

- Stewart-Hutchinson, P.J., Hale, C.M., Wirtz, D. & Hodzic, D. (2008). Structural requirements for the assembly of LINC complexes and their function in cellular mechanical stiffness. *Exp. Cell Res.* **314**, 1892-1905.
- Stuurman, N., Heins, S. & Aebi, U. (1998). Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J. Struct. Biol.* **122**, 42-66. Review.
- Svitkina, T.M., Verkhovsky, A.B. & Borisy, G.G. (1996). Plectin sidearms mediate interaction of intermediate filaments with microtubules and other components of the cytoskeleton. *J. Cell Biol.* **135**, 991-1007.
- Tanaka, Y., Kanai, Y., Okada, Y., Nonaka, S., Takeda, S., Harada, A. & Hirokawa, N. (1998). Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria. *Cell* **93**, 1147-1158.
- Technau, M. & Roth, S. (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**, 82-91.
- Todaró, G.J. & Green, H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell Biol.* **17**, 299-313.
- Tokito, M.K., Howland, D.S., Lee, V.M. & Holzbaur, E.L. (1996). Functionally distinct isoforms of dynactin are expressed in human neurons. *Mol. Biol. Cell* **7**, 1167-1180.
- Tokito, M.K. & Holzbaur, E.L. (1998). The genomic structure of DCTN1, a candidate gene for limb-girdle muscular dystrophy (LGMD2B). *Biochim. Biophys. Acta* **1442**, 432-436.
- Towbin, H., Staechelin, T. & Gordon, J. (1997). Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 4350-4354.
- Tsujikawa, M., Omori, Y., Biyanwila, J. & Malicki, J. (2007). Mechanism of positioning the cell nucleus in vertebrate photoreceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 14819-14824.
- Tzur, Y.B., Wilson, K.L. & Gruenbaum, Y. (2006). SUN-domain proteins: 'Velcro' that links the nucleoskeleton to the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **7**, 782-788.
- Vale, R.D. (2003). The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* **112**, 467-480. Review.
- Vallee, R.B. & Shpetner, H.S. (1990). Motor proteins of cytoplasmic microtubules. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 909-932. Review.
- Vallee, R.B. & Tsai, J.W. (2006). The cellular roles of the lissencephaly gene LIS1, and what they tell us about brain development. *Genes Dev.* **20**, 1384-1393. Review.
- Vaughan, K.T. & Vallee, R.B. (1995). Cytoplasmic dynein binds dynactin through a direct interaction between the intermediate chains and p150Glued. *J. Cell Biol.* **131**, 1507-1516.
- Vergnes, L., Péterfy, M., Bergo, M.O., Young, S.G. & Reue, K. (2004). Lamin B1 is required for mouse development and nuclear integrity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 10428-10433.
- Verhey, K.J., Lizotte, D.L., Abramson, T., Barenboim, L., Schnapp, B.J. & Rapoport, T.A. (1998). Light chain-dependent regulation of Kinesin's interaction with microtubules. *J. Cell Biol.* **143**, 1053-1066.
- Verhey, K.J. & Rapoport, T.A. (2001). Kinesin carries the signal. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 545-550. Review.
- Volk, T. (1992). A new member of the spectrin superfamily may participate in the formation of embryonic muscle attachments in Drosophila. *Development* **116**, 721-730.
- Wakefield, L.M. & Roberts, A.B. (2002). TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 22-29. Review.

- Wang, Q., Du, X., Cai, Z. & Greene, M.I. (2006). Characterization of the structures involved in localization of the SUN proteins to the nuclear envelope and the centrosome. *DNA Cell Biol.* **25**, 554-562.
- Warren, D.T., Zhang, Q., Weissberg, P.L. & Shanahan, C.M. (2005). Nesprins: intracellular scaffolds that maintain cell architecture and coordinate cell function? *Expert. Rev. Mol. Med.* **7**, 1-15. Review.
- Washburn, M.P., Wolters, D. & Yates, J.R. 3rd. (2001). Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.* **19**, 242-247.
- Weber, K.L., Sokac, A.M., Berg, J.S., Cheney, R.E. & Bement, W.M. (2004). A microtubule-binding myosin required for nuclear anchoring and spindle assembly. *Nature* **431**, 325-329.
- Wilhelmsen, K., Litjens, S.H., Kuikman, I., Tshimbalanga, N., Janssen, H., van den Bout, I., Raymond, K. & Sonnenberg, A. (2005). Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin. *J. Cell Biol.* **171**, 799-810.
- Wilhelmsen, K., Ketema, M., Truong, H. & Sonnenberg, A. (2006). KASH-domain proteins in nuclear migration, anchorage and other processes. *J. Cell Sci.* **119**, 5021-5029. Review.
- Wolters, D.A., Washburn, M.P. & Yates, J.R. 3rd. (2001). An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal. Chem.* **73**, 5683-5690.
- Worman, H.J. & Courvalin, J.C. (2004). How do mutations in lamins A and C cause disease? *J. Clin. Invest.* **113**, 349-351. Review.
- Worman, H.J. & Gundersen, G.G. (2006). Here come the SUNs: a nucleocytoskeletal missing link. *Trends Cell Biol.* **16**, 67-69.
- Woźniak, M.J. & Allan, V.J. (2006). Cargo selection by specific kinesin light chain 1 isoforms. *EMBO J.* **25**, 5457-5468.
- Wu, X., Xiang, X. & Hammer, J.A. 3rd. (2006). Motor proteins at the microtubule plus-end. *Trends Cell Biol.* **16**, 135-143. Review.
- Xiong, H., Rivero, F., Euteneuer, U., Mondal, S., Mana-Capelli, S., Larochele, D., Vogel, A., Gassen, B. & Noegel, A.A. (2008). Dictyostelium Sun-1 connects the centrosome to chromatin and ensures genome stability. *Traffic* **9**, 708-724.
- Yamamoto, A. & Hiraoka, Y. (2003). Cytoplasmic dynein in fungi: insights from nuclear migration. *J. Cell Sci.* **116**, 4501-4512.
- Yamashita, Y.M. & Fuller, M.T. (2008). Asymmetric centrosome behavior and the mechanisms of stem cell division. *J. Cell Biol.* **180**, 261-266. Review.
- Yan, X., Habedanck, R. & Nigg, E.A. (2006). A complex of two centrosomal proteins, CAP350 and FOP, cooperates with EB1 in microtubule anchoring. *Mol. Biol. Cell* **17**, 634-644.
- Yang, J., Liu, X., Yue, G., Adamian, M., Bulgakov, O. & Li, T. (2002). Rootletin, a novel coiled-coil protein, is a structural component of the ciliary rootlet. *J. Cell Biol.* **159**, 431-440.
- Yang, J., Gao, J., Adamian, M., Wen, X.H., Pawlyk, B., Zhang, L., Sanderson, M.J., Zuo, J., Makino, C.L. & Li, T. (2005). The ciliary rootlet maintains long-term stability of sensory cilia. *Mol. Cell Biol.* **25**, 4129-4137.
- Yang, J. & Li, T. (2005). The ciliary rootlet interacts with kinesin light chains and may provide a scaffold for kinesin-1 vesicular cargos. *Exp. Cell Res.* **309**, 379-389.
- Yang, J., Adamian, M. & Li, T. (2006). Rootletin interacts with C-Nap1 and may function as a physical linker between the pair of centrioles/basal bodies in cells. *Mol. Biol. Cell* **17**, 1033-1040.

- Yang, J. & Li, T. (2006). Focus on molecules: rootletin. *Exp. Eye Res.* **83**, 1-2.
- Yildiz, A., Tomishige, M., Vale, R.D. & Selvin, P.R. (2004). Kinesin walks hand-over-hand. *Science* **303**, 676-678.
- Young, K.G., Pinheiro, B. & Kothary, R. (2006). A Bpag1 isoform involved in cytoskeletal organization surrounding the nucleus. *Exp. Cell Res.* **312**, 121-134.
- Young, K.G. & Kothary, R. (2008). Dystonin/Bpag1 is a necessary endoplasmic reticulum/nuclear envelope protein in sensory neurons. *Exp. Cell Res.* **314**, 2750-2761.
- Yu, H., Toyoshima, I., Steuer, E.R. & Sheetz, M.P. (1992). Kinesin and cytoplasmic dynein binding to brain microsomes. *J. Biol. Chem.* **267**, 20457-20464.
- Yu, J., Starr, D.A., Wu, X., Parkhurst, S.M., Zhuang, Y., Xu, T., Xu, R. & Han, M. (2006). The KASH domain protein MSP-300 plays an essential role in nuclear anchoring during *Drosophila* oogenesis. *Dev. Biol.* **289**, 336-345.
- Zaim, H. (2005). Analyse von Nesprin-2 defizienten Mäusen. Dissertation. Universität zu Köln.
- Zastrow, M.S., Vlcek, S. & Wilson, K.L. (2004). Proteins that bind A-type lamins: integrating isolated clues. *J. Cell Sci.* **117**, 979-987. Review.
- Zhang, Q., Skepper, J.N., Yang, F., Davies, J.D., Hegyi, L., Roberts, R.G., Weissberg, P.L., Ellis, J.A. & Shanahan, C.M. (2001). Nesprins: a novel family of spectrin-repeat-containing proteins that localize to the nuclear membrane in multiple tissues. *J. Cell Sci.* **114**, 4485-4498.
- Zhang, Q., Ragnauth, C., Greener, M.J., Shanahan, C.M. & Roberts, R.G. (2002). The nesprins are giant actin-binding proteins, orthologous to *Drosophila melanogaster* muscle protein MSP-300. *Genomics* **80**, 473-481.
- Zhang, Q., Ragnauth, C.D., Skepper, J.N., Worth, N.F., Warren, D.T., Roberts, R.G., Weissberg, P.L., Ellis, J.A. & Shanahan, C.M. (2005). Nesprin-1 and -2 are involved in the pathogenesis of Emery Dreifuss muscular dystrophy and are critical for nuclear envelope integrity. *J. Cell Sci.* **118**, 673-687.
- Zhang, Q., Bethmann, C., Worth, N.F., Davies, J.D., Wasner, C., Feuer, A., Ragnauth, C.D., Yi, Q., Mellad, J.A., Warren, D.T., Wheeler, M.A., Ellis, J.A., Skepper, J.N., Vorgerd, M., Schlotter-Weigel, B., Weissberg, P.L., Roberts, R.G., Wehnert, M. & Shanahan, C.M. (2007). Nesprin-1 and -2 are involved in the pathogenesis of Emery Dreifuss muscular dystrophy and are critical for nuclear envelope integrity. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 2816-2833.
- Zhen, Y.Y. (2001). Identifizierung und Charakterisierung von NUANCE, einem neuen Protein vom α -Aktinin Typ. Dissertation. Universität zu Köln.
- Zhen, Y.Y., Libotte, T., Munck, M., Noegel, A.A. & Korenbaum, E. (2002). NUANCE, a giant protein connecting the nucleus and actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **115**, 3207-3222.
- Zhu, C., Zhao, J., Bibikova, M., Levenson, J.D., Bossy-Wetzell, E., Fan, J.B., Abraham, R.T. & Jiang, W. (2005). Functional analysis of human microtubule-based motor proteins, the kinesins and dyneins, in mitosis/cytokinesis using RNA interference. *Mol. Biol. Cell* **16**, 3187-3199.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABD	Aktinbindungsdomäne
AD	Aktivierungsdomäne
Ade	Adenin
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BD	Bindungsdomäne
Btf	Bcl-2-assoziiierender Transkriptionsfaktor
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
cDNA	komplementäre DNA (durch reverse Transkription von mRNA)
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<i>C. reinhardtii</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Cy	Cytochrom
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
<i>D. discoideum</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
d.h.	das heißt
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enhanced Chemiluminescence
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FBS	Fötale Kälber Serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
g	Gramm
Gcl	Transkriptionsfaktor germ cell-less
GDT	Guanosindiphosphat
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
ggf.	gegebenenfalls
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
His	Histidin
IgG	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KHC	schwere Ketten des Kinesin
KLC	leichte Kette des Kinesin
l	Liter
Leu	Leucin

Lsg.	Lösung
M	Molar
mAb	monoklonaler Antikörper
MDa	Megadalton
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mRNA	Boten-RNA
Myne	myocyte nuclear envelope protein
µF	Mikrofarad
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
nm	Nanometer
NUANCE	nucleus and actin connecting element
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAb	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung
Pc	Pericentrin
PCR	Polymerase Kettenreaktion
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
s.	siehe
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SEM	Standard error of the mean
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
Smad	Sma- and Mad- verwandtes Protein
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SR	Spektrindomäne
Syne	synaptic nuclear envelope protein
TGF	transforming growth factor
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp	Tryptophan
ü.N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
WB	Westernblot
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indazol-β-D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.4.1:	KASH-Domänen Proteine verknüpfen das Zytoskelett mit der Kernhülle	5
Abb. 1.4.2:	Die Oligomerisierung von SUN-Domänen sowie Nesprin Proteinen ermöglicht die Bildung von höher geordneten und multifunktionalen Komplexen an der äußeren Kernmembran	7
Abb. 1.6.1:	Domänenarchitektur des konventionellen Kinesin (Kinesin 1) Motorkomplexes	11
Abb. 1.6.2:	Aufbau des Dyneins und Dynactins.....	13
Abb. 1.7.1:	Schematische Repräsentation der Bildung, Duplikation und Dissoziation des Zentrosoms während des Zellzyklus	15
Abb. 3.1.1:	Domänenstruktur von Nesprin-2 Giant und Nesprin-2 SR	33
Abb. 3.1.2:	Lokalisierung des KASH-Domänen defizienten Nesprin-2 SR in COS7-Zellen	34
Abb. 3.1.3:	KLC1 interagiert mit Nesprin-2 SR	35
Abb. 3.1.4:	Eingrenzung der KLC1/Nesprin-2 SR Interaktionsdomänen mittels des Hefe-Zwei-Hybrid Systems	36
Abb. 3.1.5:	Eingrenzung der Nesprin-2 SR Bindungsdomäne in vitro.....	37
Abb. 3.1.6:	Eingrenzung der KLC1 Bindungsdomäne in vitro.....	38
Abb. 3.1.7:	Ektopisch exprimierte Nesprin-2/KLC1 Fusionsproteine kolokalisieren in COS7-Zellen	39
Abb. 3.1.8:	Die Nesprin-2 SR 2+3 und SR 2-3 Peptide kolokalisieren mit KLC1 in kotransfizierten COS7-Zellen.....	40
Abb. 3.1.9:	Überexprimiertes Nesprin-2 SR beeinflusst die Lokalisation von KLC1 TPR-Fusionsproteinen.....	41
Abb. 3.1.10:	Die Kernmembran-spezifische Lokalisation des endogenen KLC1 wird nicht durch die Überexpression von Nesprin-2 SR beeinträchtigt.....	42
Abb. 3.1.11:	Endogene Nesprin-2 und KLC1 Proteine kolokalisieren an der Zellkernmembran in HaCaT- und NIH-3T3-Zellen sowie im murinen Kleinhirn.....	43
Abb. 3.1.12:	Endogenes KLC1 lokalisiert entlang der Kernmembran in Muskelspindeln der Maus.....	44
Abb. 3.1.13:	Ektopisch exprimierte KLC1 und KHC (KIF5B) Fusionsproteine kolokalisieren mit Nesprin-2 an der Kernmembran	45

Abb. 3.1.14: Mikrotubuli und KLC1 in COS7-Zellen und primären Fibroblasten	46
Abb. 3.1.15: Nesprin-2 assoziiert mit dem Kinesin 1 Komplex in vitro und in vivo	47
Abb. 3.1.16: Mikrotubuli-unabhängige Verteilung von GFP-KLC1 an der Kernmembran	49
Abb. 3.1.17: Nesprin-2 abhängige Lokalisation des KLC1 in NIH-3T3-Zellen.....	50
Abb. 3.1.18: Die dominant negative Interferenz von KASH-Domänen umfassenden Nesprin Isoformen beeinflussen die Anlagerung des KLC1 entlang der Kernmembran	51/52
Abb. 3.1.19: Zusätzliche Mechanismen bestimmen die Anlagerung von KLC1 entlang der Kernmembran.....	53
Abb. 3.1.20: Nesprin-2 Giant Silencing in HaCaT- und NIH-3T3-Zellen beeinflusst die Lokalisation und das Expressionsprofil von KLC1.....	55
Abb. 3.1.21: Lamin A/C abhängige Lokalisierung von Nesprin-2 und KLC1	56
Abb. 3.1.22: Nesprin-2 und KLC1 abhängige Verteilung der Mikrotubuli in NIH-3T3-Zellen	58
Abb. 3.1.23: Nesprin-2 sowie KLC1 Silencing beeinflusst die Anlagerung der Mikrotubuli an die Kernmembran.....	59
Abb. 3.1.24: Anlagerung des KLC1 am Zentrosom in NIH-3T3-Fibroblasten.....	60
Abb. 3.1.25: Kolokalisation von Nesprin-2 und KLC1 am Zentrosom in murinen NIH-3T3-Fibroblasten.....	61
Abb. 3.1.26: C-terminale Nesprin-2 Isoformen lokalisieren am Zentrosom in der humanen Keratinozyten-Zelllinie HaCaT.....	62/63
Abb. 3.1.27: SUN-Proteine, Komponenten der inneren Kernmembran, akkumulieren an Regionen nahe dem Zentrosom	65
Abb. 3.1.28: Überexprimiertes Rootletin organisiert KLC1 entlang von filamentären Strukturen, wohingegen die subzelluläre Verteilung des Nesprin-2 Giant bzw. der N-terminalen Nesprin-2 Isoformen unverändert bleibt.....	67
Abb. 3.1.29: Ektopisch exprimierte Rootletinfilamente führen zu einer Veränderung der Verteilung des KLC1 und der C-terminalen Nesprin-2 Isoformen in NIH-3T3-Fibroblasten und COS7-Zellen	68
Abb. 3.1.30: Rootletin und Nesprin-2 kolokalisieren partiell entlang des Mikrotubulizytoskeletts.....	70
Abb. 3.1.31: RFP-Pericentrin und Myc-SR kolokalisieren an filamentären Strukturen.....	71

Abb. 3.1.32: Nesprin-2 SR beeinflusst die Anheftung des Zentrosoms an die Kernmembran	73
Abb. 3.1.33: Die dominant negative Interferenz von KASH-Domänen umfassenden Proteinen führt zu einer Dissoziation des Zentrosoms vom Zellkern	74
Abb. 3.1.34: Nesprin-2 sowie KLC1 Silencing beeinflusst die Lage der Zentrosomen.....	76
Abb. 3.1.35: KLC1 Silencing in NIH-3T3-Fibroblasten erhöht die Zentrosomenzahl und die Distanz zum Nukleus	78/79
Abb. 3.1.36: Der Verlust von KLC1 in HaCaT-Zellen beeinträchtigt die Zellpolarisierung	80
Abb. 3.1.37: Die ektopische Expression von GFP-SP-SUN1-CT führt zu einer verringerten bzw. zeitlich verzögerten Akkumulation der Smad Proteine im Nukleus	81
Abb. 3.1.38: KLC1 kolokalisiert partiell mit den Mitochondrien in COS7-Zellen	82
Abb. 3.1.39: Die Kernhüllen-spezifischen Nesprine beeinflussen die Positionierung von Mitochondrien in HaCaT-Zellen	83
Abb. 3.2.1: Domänenstruktur von Nesprin-1 Giant und Nesprin-1-165	84
Abb. 3.2.2: p150 Glued ⁶³⁸⁻¹²⁷⁸ assoziiert mit Nesprin-1-165	84
Abb. 3.2.3: Eingrenzung der p150 Glued/Nesprin-1-165 Bindungsdomänen in vivo	85
Abb. 3.2.4: Kolokalisierung von GFP-Nesprin-1-165 und p150 Glued in COS7-Zellen	87
Abb. 4.2.1: Modell der verschiedenen Nesprin Interaktionen an der äußeren Kernmembran	91
Abb. 4.3.1: Modelle der zentrosomalen Phänotypen in Nesprin-2 und KLC1 Mutanten.....	95

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Oligonukleotide mit zugehöriger Sequenz und Verwendungszweck.....	20
Tabelle 2.2: Verwendete und klonierte Konstrukte für das Hefe-Zwei-Hybrid System	22
Tabelle 2.3: Verwendete und klonierte Konstrukte für die Überexpression in Säugerzellen.....	23
Tabelle 2.4: Verwendete und klonierte Konstrukte für die Bakterienexpression.....	25

ERKLÄRUNG

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

Köln, im Dezember 2008, _____

VERÖFFENTLICHUNGEN:

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

Lüke, Y., Zaim, H., Karakesisoglou, I., Jaeger, V.M., Sellin, L., Lu, W., **Schneider, M.**, Neumann, S., Beijer, A., Munck, M., Padmakumar, V.C., Gloy, J., Walz, G. & Noegel, A.A. (2008). Nesprin-2 Giant (NUANCE) maintains nuclear envelope architecture and composition in skin. *J. Cell Sci.* **121**, 1887-1898.

Lu, W., Gotzmann, J., Sironi, L., Jaeger, V.M., **Schneider, M.**, Lüke, Y., Uhlén, M., Al-Khalili Szigyarto, C., Brachner, A., Ellenberg, J., Foisner, R., Noegel, A. A. & Karakesisoglou, I. (2008). Sun1 forms immobile macromolecular assemblies at the nuclear envelope. *Biochim. Biophys. Acta* **1783**, 2415-2426.

Schneider, M., Noegel, A. A. & Karakesisoglou, I. (2008). KASH-domain proteins and the cytoskeletal landscapes of the nuclear envelope. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 1368-1372.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Maria Schneider
Geburtsdatum	18. November, 1979
Geburtsort	Düren

SCHULISCHE AUSBILDUNG

1986 - 1990	Grundschule in Kreuzau - Obermaubach
1990 - 1999	Sankt Angela Schule, Gymnasium in Düren
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

STUDIUM

Okt. 1999 - April 2005	Studiengang: Bioingenieurwesen Studienschwerpunkt: Biotechnologische Verfahren Fachhochschule Aachen, Abteilung Jülich
Nov. 2003 - Mai 2004	Praxissemester Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin an der Deutschen Sporthochschule Köln Betreuer: Prof. Dr. W. Bloch Thema: <i>Ko-Kultivierung von Stamm- und Endothelzellen</i>
Juni 2004 - April 2005	Diplomarbeit Institut für Biochemie I der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln Betreuer: Prof. Dr. M. Baumann und Prof. Dr. A. A. Noegel Thema: <i>Ermittlung neuer NUANCE und Enaptin bindender Proteine mittels des Zwei-Hybrid-Systems</i>
Mai 2005 - Dez. 2008	Promotion Institut für Biochemie I der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln Betreuer: Prof. Dr. A. A. Noegel Thema: <i>Nesprine: Makromolekulare Bindeglieder zwischen Kernhülle und Zytoskelett</i>
April 2008 - Dez. 2008	Auslandsaufenthalt School of Biological and Biomedical Sciences Universität Durham, England Arbeitsgruppe: Dr. I. Karakesisoglou