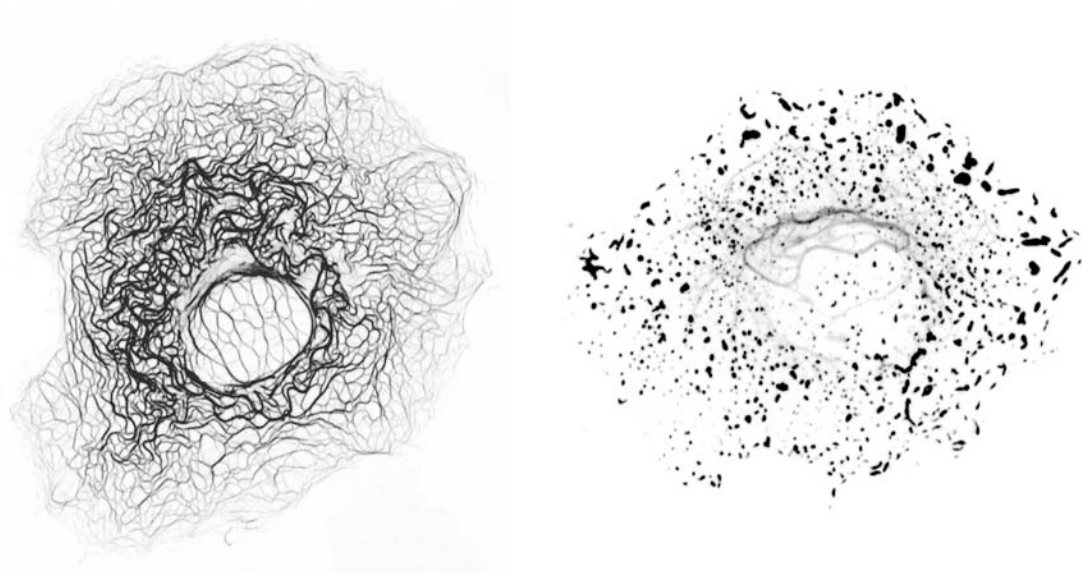


„Untersuchungen des Keratinfilament- Turnovers in lebenden Zellen“



Anne Christine Kölsch

Institut für Anatomie und Zellbiologie

Johannes Gutenberg-Universität Mainz

„Untersuchungen des Keratinfilament- Turnovers in lebenden Zellen“

Dissertation
zur Erlangung des Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

vorgelegt von
Anne Christine Kölsch
geboren in München

Mainz, 3. November 2008

Anmerkung:

Die Filme können online unter

<http://www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/Leube/publications.html>

oder

<http://www.moca.rwth-aachen.de/publications.html>

angesehen und heruntergeladen werden.

Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Teile der vorliegenden Dissertation wurden auf internationalen Kongressen vorgestellt und in folgenden Zeitschriften veröffentlicht:

Publikationen

Kölsch, A.*, Windoffer, R.*, Wöll, S. and Leube, R. E. (2008). The Keratin-Treadmill. Eingereicht bei *J. Cell Biol.* 18.09.2008

Windoffer R.*, Kölsch, A.*, Wöll, S. and Leube, R. E. (2006). Focal adhesions are hotspots of keratin filament precursor formation. *J. Cell Biol.* 173: 341-348

* Beide Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen.

Kongressbeiträge

Windoffer, R., Kölsch A., Wöll, S., Würflinger, T., Aach, T. and R. E. Leube. 09/2008. In vivo imaging and quantification of the continuous keratin filament network turnover. 14th European Microscopy Congress, Aachen.

Kölsch, A., Würflinger T., Aach T., Windoffer R. and R. E. Leube. 06/2008. The Keratin Treadmill. FEBS/ECF Workshop on "Mechanics and Dynamics of the Cytoskeleton", Potsdam (Vortrag und Poster).

Kölsch, A., Leube R. E. and R. Windoffer. 12/2007. The keratin treadmill. ASCB 47th Annual Meeting, Washington, DC (Poster).

Kölsch, A., Windoffer, R. and R. E. Leube. 09/2007. The continuous network cycle of keratin filaments. 5th European Workshop on "Intermediate Filaments", Durham, UK (Poster).

Windoffer, R. Kölsch, A., and R. E. Leube. 09/2007. Formation and turnover of the keratin network in migrating epithelial cells. International Symposium on INTERMEDIATE FILAMENT PROTEINS: Emerging Trends in Keratin Biology, Navi, Mumbai, India.

Kölsch, A., Wöll, S., Windoffer, R. and R. E. Leube. 03/2007. Focal Adhesion-dependent Formation of Keratin Filament Precursors. 30. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Frankfurt. (Poster)

Kölsch, A., Windoffer, R., Wöll, S., and R. E. Leube. 12/2006. Focal adhesions: structural and signalling platforms for keratin filament precursor formation. ASCB, 46th Annual Meeting. San Diego.

Kölsch, A., Wöll, S., Windoffer, R. and R. E. Leube. 11/2006. Focal Adhesion-dependent Formation of Keratin Filament Precursors. 21st European Cytoskeleton Forum Meeting, Singapore (Vortrag).

Leube, R.E., Kölsch, A., Wöll, S. and R. Windoffer. 09/2006. Imaging of novel properties of the keratin filament network by multidimensional live cell microscopy. The 16th International Microscopy Congress. Sapporo.

Windoffer, R., Kölsch, A., Wöll, S. and R. E. Leube. 07/2006. Focal adhesion-dependent keratin filament formation. Gordon Research Conference.

Kölsch, A., Wöll, S., Windoffer, R. and R. E. Leube. 05/2006. Focal Adhesions and the Formation of Keratin Filaments. IAK Mainz "Neurons, Glia and Molecular Cell Biology", Mainz (Vortrag).

Windoffer, R., Wöll, S., Kölsch, A., and R. E. Leube. 05/2006. Imaging the Dynamics of Granular Keratin Aggregates in Living Cells Third. IPCC Symposium, Philadelphia.

Windoffer, R., Kölsch, A., and R. E. Leube. Focal contacts and the formation of keratin filaments. 12/2005. ASCB, 45th Annual Meeting. San Francisco.

Kölsch, A., Wöll, S., Windoffer, R. and R. E. Leube. 10/2005. Formation of keratin filament precursors in the vicinity of focal adhesion sites. 4th European Workshop on Intermediate Filaments, Bonn (Poster).

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1 Das Zytoskelett	3
2.1.1 Mikrotubuli	5
2.1.2 Aktinfilamente.....	6
2.1.3 Extrazelluläre Matrix und Adhäsionskomplexe	8
2.1.4 Intermediärfilamente.....	10
2.1.4.1 Unterteilung und Vorkommen der Intermediärfilamente	11
2.1.4.2 Aufbau und Struktur der zytoplasmatischen Intermediärfilamente	13
2.1.4.3 Zusammenbau der Intermediärfilamente	14
2.1.4.4 Dynamik von Intermediärfilamenten	16
2.1.4.5 Funktionen von Intermediärfilamenten	17
2.1.5 Intermediärfilament-assoziierte Proteine	18
2.1.6 Typ I und II Intermediärfilamente: Keratine	20
2.1.6.1 Bildung und Dynamik von Keratinfilamenten.....	21
2.1.6.2 Regulation und Modifikation von Keratinfilamenten	23
2.1.7 Typ III Intermediärfilamente	25
2.2 Epidermale Keratinopathien	27
2.2.1 <i>Epidermolysis bullosa simplex</i>	27
2.2.2 <i>Pachyonychia congenita</i>	28
2.3 Zielsetzungen	30
3. Material und Methoden	31
3.1 Material	31
3.1.1 Geräte und Chemikalien.....	35
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	36
3.1.3 Software	36
3.1.4 Kits	36
3.1.5 Enzyme	37
3.1.6 Antibiotika	37
3.1.7 Drogen und Reagenzien	38
3.1.8 Antikörper	39
3.1.9 Oligonukleotide und Nukleinsäuren.....	41
3.1.10 Bakterienstämme	42
3.1.11 Zelllinien	42
3.1.12 Plasmide und Vektorkonstrukte.....	42
3.1.13 Medien und Puffer	34
3.1.14 Molekulargewichtsstandards	44

3.2	Methoden	45
3.2.1	Molekularbiologische und gentechnische Methoden.....	45
3.2.1.1	Isolierung von RNA aus Zelllinien	45
3.2.1.2	Isolierung von DNA aus Zelllinien	45
3.2.1.3	Reverse Transkriptase-PCR zur cDNA-Synthese	46
3.2.1.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	46
3.2.1.5	Phusion-PCR für Klonierungsexperimente	47
3.2.1.6	Real-Time-Polymerasekettenreaktion (Real-Time PCR)	48
3.2.1.7	Quantifizierung von Nukleinsäurelösungen mittels Absorptionsspektrometrie	49
3.2.1.8	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	49
3.2.1.9	In vitro-Rekombination von DNA-Konstrukten.....	50
3.2.1.9.1	Restriktion von DNA	50
3.2.1.9.2	Ethanol-fällung von Nukleinsäuren	51
3.2.1.9.3	Agarosegel-Elektrophorese	51
3.2.1.9.4	Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	52
3.2.1.9.5	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA	52
3.2.1.9.6	Auffüllen von 5' bzw 3' Enden durch das Klenow- Fragment der DNA-Polymerase	52
3.2.1.9.7	Ligation von DNA	53
3.2.1.9.8	Herstellung kompetenter Bakterien	53
3.2.1.9.9	Transformation durch Hitzeschock.....	53
3.2.1.9.10	Kultivierung von Bakterien in Flüssigkulturen	54
3.2.1.9.11	Isolierung von Plasmid-DNA (Plasmid Mini-Präparation)	54
3.2.1.9.12	Maxi-Präparation von Plasmid-DNA.....	55
3.2.1.9.13	Sequenzierung	55
3.2.1.9.14	Erstellung von Nukleotidsäurealignments.....	56
3.2.1.10	Design und Annealing von shRNA-Einzelsträngen.....	56
3.2.2	Proteinbiochemische Methoden	57
3.2.2.1	Herstellung von Gesamtzellextrakten	57
3.2.2.2	Keratinisolierung aus Zellkultur-Epithelzellen	57
3.2.2.3	SDS-Poly-Acrylamid-Gel Elektrophorese	58
3.2.2.4	Nachweis von Proteinen auf Membranen: Western Blot (Immunoblot)	59
3.2.2.5	Immundetektion von Proteinen	60
3.2.2.6	Detektion von Proteinen durch Färbung.....	62
3.2.2.6.1	Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von SDS-Gelen.....	62
3.2.2.6.2	Ponceau-S-Färbung von Proteinen auf Membranen.....	62
3.2.3	Zellkulturmethoden	63
3.2.3.1	Kultivierung von Säugerzellen	63
3.2.3.1.1	Passagieren von adhärenenten Zellen.....	63
3.2.3.1.2	Kryokonservierung von Säugerzellen	63
3.2.3.1.3	Zellzahlbestimmung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer	64
3.2.3.1.4	Aussäen von Säugerzelllinien	64
3.2.3.2	Transfektion von Säugerzelllinien.....	64
3.2.3.2.1	Transfektion mittels Elektroporation	65
3.2.3.2.2	Transfektion mittels Lipofektion	65
3.2.3.2.3	Calcium-Phosphat-Transfektion	65
3.2.3.3	Generierung von stabilen Zellklonen.....	66
3.2.3.3.1	Herstellung von stabilen Zellklonen mittels Lipofektion	66
3.2.3.3.2	Herstellung von stabilen Zellklonen mittels retroviralem Gentransfer	66

3.2.3.3.2.1	Transfektion mittels Lipofektion	68
3.2.3.3.2.2	Transfektion mittels Calcium-Phosphat	68
3.2.3.4	Hemmung der Proteinbiosynthese durch Puromycin und Cycloheximid	68
3.2.3.5	Hemmung der Aktin-abhängigen Transportvorgängen durch Latrunculin B..... und Cytochalasin D	69
3.2.3.6	Hemmung der Mikrotubuli-abhängigen Transportvorgänge durch Nocodazol	69
3.2.3.7	Markierung von Mikrofilamenten durch fluoreszenzmarkiertes Phalloidin.....	69
3.2.3.8	Zellfusion mittels Polyethylenglykol	70
3.2.3.9	Wundheilungsversuche (Scratch-Assay).....	70
3.2.4	Histologische Methoden	70
3.2.4.1	Fixierung von kultivierten Zellen	70
3.2.4.1.1	Methanol und Aceton-Fixierung.....	71
3.2.4.1.2	Paraformaldehyd-Fixierung	71
3.2.4.2	Immunzytochemische Markierung durch Antikörper	71
3.2.4.3	Einbetten von Zellen und DAPI-Kernfärbung.....	72
3.2.4.3.1	Herstellung von Elvanol und DAPI	72
3.2.5	Mikroskopische Methoden	72
3.2.5.1	Fluoreszenzmikroskopie	72
3.2.5.2	Lebendzellmikroskopie.....	73
3.2.5.3	Konfokale Laserscanning-Mikroskopie	74
3.2.5.3.1	Fluoreszenz-Rückkehr nach Photobleichen	75
3.2.5.3.2	Photoaktivierung durch Verwendung von photoaktivierbarem GFP	75
3.2.6	Elektronische Datenverarbeitung.....	76
3.2.6.1	Computergestützte 3D-Datenanalyse	76
4.	Ergebnisse	77
4.1	Dynamik von IF-Netzwerken	77
4.1.1	Das Keratinfilament-Netzwerk wird in Lamellipodien von migrierenden Epithelzellen ständig erneuert	77
4.1.2	KFPs bilden sich in der Nachbarschaft zu fokalen Adhäsionen	81
4.1.3	Talin shRNA reduziert die Bildung von KFPs.....	84
4.1.4	FA-abhängige KFP-Bildung ist unabhängig von Zelltyp und der Keratinisoform	86
4.1.5	FAs bestimmen die Bildung von pathologischen EBS-Aggregaten	88
4.1.6	FAs bestimmen die Bildung von pathologischen PC-Aggregaten	94
4.1.7	KFPs werden in einem Aktin-abhängigen Prozeß zentripetalwärts transportiert....	100
4.1.8	Keratinfilamentabbau trägt zur Keratinfilamentbildung bei	104
4.2	Regulation und Modulation der Dynamik von IF-Netzwerken.....	112
4.2.1	Spezifische Plectinisoformen ko-lokalisieren mit naszierenden KFPs	112
4.2.2	Modulation der FAK-Aktivität beeinflusst die KF-Netzwerkorganisation.....	120
4.2.3	p38-Aktivität und Proteasomen-Aktivität beeinflussen die Neubildung und den Abbau von Keratin-Aggregaten	123
4.3	Typ III-Intermediärfilament-Netzwerke werfen Ähnlichkeiten und Unterschiede zur Dynamik von Keratinfilament-Netzwerken auf	129
4.4	Das dynamische Ko-Translations-Modell konnte nicht bestätigt werden	131

5. Diskussion	135
5.1 Fokale Adhäsionen sind die Nukleationsorte der Keratinfilamentvorläufer.....	135
5.2 Keratinfilamente unterliegen einem ständigen Auf- und Abbau: Das Keratin-Tretmühlen-Modell.....	140
5.3 Mutationen im Keratingen K6a verursachen die Bildung von Keratinaggregaten.....	147
6. Literaturverzeichnis	153
7. Anhang	170
7.1 Abbildungsverzeichnis.....	170
7.2 Abkürzungsverzeichnis.....	172
7.3 Filmverzeichnis und Filmlegenden	176
7.4 Firmenverzeichnis	180
7.5 Tabellenverzeichnis.....	181
7.6 Alignments	183
7.6.1 Alignment der Plectin-Isoformen 1, 1E und 1 F	183
7.6.2 Alignment der ersten 200 bp der Plectinisoformen IE und 1F inklusive Primerbindestellen	184
7.7 Schmelzkurvendaten der RT-PCR-Profile	185
7.7 Bezeichnung und Klonierung der hergestellten Plasmide.....	186
Danksagung	187
Lebenslauf	188
Eidesstattliche Erklärung.....	189

1. Zusammenfassung

Das Zytoskelett eukaryotischer Zellen besteht aus drei verschiedenen Protein-Netzwerken: den Aktinfilamenten, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten. Intermediärfilamente wurden ursprünglich als statische Strukturen angesehen, die die mechanische Stabilisierung der Zellen übernehmen. In den letzten Jahren hat sich dieses Bild jedoch geändert: Intermediärfilament-Netzwerke sind hochdynamisch und unterliegen kontinuierlichen Veränderungen, welche durch Phosphorylierungen reguliert werden. Sie interagieren mit anderen Zytoskelett-Proteinen und greifen in die Regulation von Schlüsselsignalwegen, die Zellwachstum und Zellteilung sowie Apoptose und Stressantwort bestimmen, ein. Die Mechanismen der Filamentplastizität konnten bisher jedoch nicht vollständig aufgeklärt werden. So ist beispielsweise unklar, wo Auf- und Abbau der Filamente stattfindet und welche Faktoren an der Netzwerkmodulation beteiligt sind. Ziel meiner Arbeit war es, einen Beitrag zur Aufklärung dieser Mechanismen am Beispiel der epithelialen Keratin-Intermediärfilamente zu leisten.

Mit Hilfe von mikroskopischen Zeitrafferaufnahmen von fluoreszenzmarkierten Zellklonen wurden Nukleationszentren in der Zellperipherie identifiziert, in denen Keratinfilamentvorläufer gebildet werden. Es handelt sich dabei um fokale Adhäsionskomplexe, die als Anheftungsstellen zwischen der extrazellulären Matrix und dem intrazellulären Aktinfilament-System dienen. Es konnte gezeigt werden, dass diese Filamentvorläufer-Entstehung für alle untersuchten Keratinisoformen gültig ist und in epithelialen als auch nicht-epithelialen Zelltypen abläuft. Knock-Down der Adhäsionskomponente Talin verhinderte die Keratinfilamentbildung. Modulation der fokalen Adhäsionskinase, die den Auf- und Abbau der Adhäsionskomplexe koordiniert, beeinflusste ebenso die Bildung der Keratinfilamentnetzwerke. Es konnte weiterhin beobachtet werden, dass die N-terminalen Isoformen IE und IF des Zytolinkers Plectin in fokalen Adhäsionen lokalisieren und damit möglicherweise an der Vernetzung von Keratinfilamentvorläufern, Zelladhäsionen und Aktinfilamenten beteiligt sind. Letztlich stellte sich heraus, dass die Bildung der Keratinfilamentvorläufer unabhängig von Proteintranslation ist.

In den mikroskopischen Zeitrafferaufnahmen wurde im Anschluss an die Keratinfilamentbildung ein kontinuierlicher zentripetaler Transport der wachsenden Vorläuferpartikel beobachtet. An Hand von pharmakologischen Experimenten konnte gezeigt werden, dass dieser Transport Aktinfilament-abhängig ist. Zeitgleich kommt es zu Partikelfusion und Integration in das periphere Netzwerk, das sich weiterhin in Richtung auf das Zellzentrum bewegt. Mit Hilfe von Photoaktivierungsversuchen und Zellfusionsexperimenten konnte die Hypothese bestätigt werden, dass der Abbau der einwandernden Keratinfilamente in lösliche, rasch diffusible Zwischenstufen den kontinuierlichen peripheren Neuaufbau ermöglicht.

Aus den Beobachtungen und bereits bekannten Ergebnissen wurde ein Modell des Keratin-Zyklus entwickelt, das die folgenden Stadien umfasst: Nukleation von Keratinfilamentvorläufern an fokalen

Adhäsionen in der Zellperipherie, Elongation und Fusion der Keratinfilamentvorläufer bei zeitgleichem Aktinfilament-abhängigem zentripetalen Transport, Integration der Keratinfilamentvorläufer in das periphere Netzwerk, Bündelung der Filamente, Filamentabbau in lösliche Untereinheiten und Neubeginn des Zyklus in der Zellperipherie. Eine Störung dieses Zyklus liegt bei mutierten Keratinen vor, welche die Ursache von Blasen-bildenden Hauterkrankungen sind. In der vorliegenden Arbeit wurde am Beispiel von Keratin 6a-Mutanten, welche die Hauterkrankung *Pachyonychia congenita* verursachen, gezeigt, dass bei diesen Keratinen die Nukleation zwar im Bereich der Adhäsionskomplexe regelrecht abläuft, die anschließende Elongation und Netzwerkbildung aber gestört ist, so dass statt dessen kurzlebige, hyperphosphorylierte Granula entstehen. Der resultierende frustrane Keratin-Zyklus in der Zellperipherie ist stark beschleunigt und kann durch p38-Inhibierung gestoppt werden. Bei Proteasomeninhibierung wird der Zyklus in Richtung der Granulabildung verschoben.

In dieser Arbeit wird erstmals das Keratin-Tretmühlen-Modell vorgestellt, das den regulierbaren Auf- und Abbau-Zyklus des Keratinnetzwerks beschreibt. Damit liegen testbare Hypothesen für die Aufklärung der Keratinfilament-Plastizität in physiologischen und pathologischen Situationen vor, die nach unseren ersten Ergebnissen auch von Relevanz für andere Intermediärfilamenttypen sind.

1. Einleitung

Die Haut ist mehr als nur eine Hülle des menschlichen Körpers. Mit einer Fläche von 1,5 bis 1,8 m² und einem Anteil von 16% des Körpergewichtes ist sie das größte und schwerste Organ des Menschen. Als Grenzorgan des Organismus zur Umgebung dient die Haut vor allen dem Schutz des Körperinneren. Um ihre mechanische Schutzfunktion gegenüber den täglichen Belastungen ausüben zu können, müssen intrazelluläre Stabilisierungselemente vorhanden sein, welche die Kraftübertragung auf benachbarte Zellen gewährleisten. Die Epithelzellen besitzen drei Proteinfasersysteme, die als Zytoskelett zusammengefasst werden und hauptsächlich für die mechanische Stabilität verantwortlich sind.

2.1 Das Zytoskelett

Pflanzen-, Pilz- und Bakterienzellen schützen sich vor mechanischer Einwirkung und dem damit verbundenen Zellstress von außen durch feste Zellwände aus Glyko- und Proteinpolymeren. Um die Beweglichkeit ihrer Zellen zu gewährleisten, besitzen tierische Organismen dagegen nur eine dünne Plasmamembran und keine Zellwand. Sie bilden aber zusätzlich zu den in allen Zellen vorhandenen Aktin- oder Mikrofilamenten (MF) und Mikrotubuli (MT) weitere Proteinfasern aus, die sich durch das gesamte Zytoplasma erstrecken (Abb. 1). Diese werden als Intermediärfilamente (IFs) bezeichnet, da ihr Durchmesser (~ 8 nm) zwischen dem von Aktinfilamenten (~6 nm) und Mikrotubuli (~25 nm) liegt.

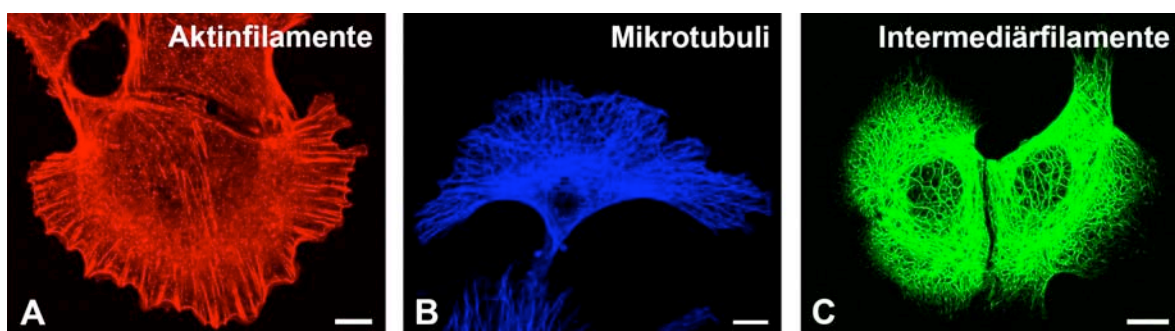


Abb. 1: Das Zytoskelett epithelialer Zellen. (A) Anfärbung von Aktinfilamenten, (B) Mikrotubuli, und (C) Intermediärfilamenten. Alle drei Systeme bilden filamentöse und das gesamte Zytoplasma umfassende Netzwerke. Die Größenbalken entsprechen 10 µm.

Das Zytoskelett verleiht tierischen Zellen ihre Form und ist für die mechanische Stabilisierung verantwortlich. Es organisiert die aktiven Bewegungen der Zelle als Ganzes durch assoziierte Motorproteine und verbindet verschiedene Zellstrukturen miteinander. Des Weiteren stellt das Zytoskelett eine Transportmatrix für Proteine dar und organisiert somit zielgerichtete Bewegungen und Transportvorgänge innerhalb der Zelle. Außerdem wird die Übertragung von Signalen zwischen Zellen koordiniert (PALLARI und ERIKSSON, 2006). Sämtliche zellulären Bewegungsvorgänge sind nur

durch ein koordiniertes Zusammenspiel aller drei Zytoskelett-Komponenten möglich (GODSEL *et al.*, 2008). Die drei filamentösen Komponenten bestehen aus drei-dimensionalen Proteinpolymeren, deren Aufbau durch spezifische Kontrollfaktoren reguliert wird. Proteine der Plakin-Genfamilie verknüpfen die verschiedenen Zytoskelett-Komponenten (Abb. 2). Die zytoplasmatischen IFs sind an die Kernmembran angeheftet; im Kern befinden sich ebenfalls IFs. (Abb. 2).

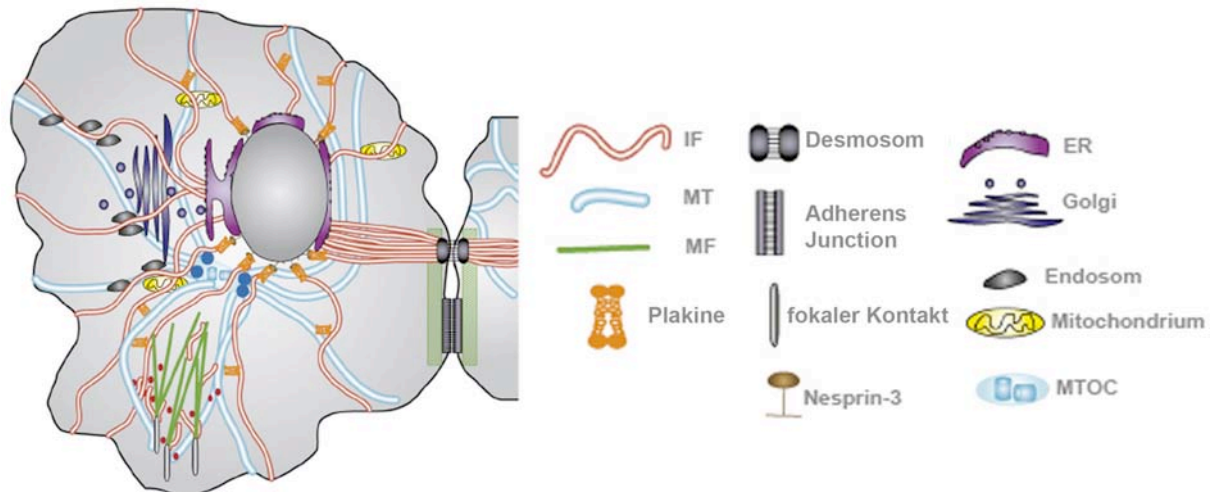


Abb. 2: Schematische Darstellung einer Epithelzelle. Die drei Schlüsselfilamentsysteme Mikrofilamente (MF, grün), Mikrotubuli (MT, blau) und Intermediärfilamente (IFs, rot), sind über Plakine wie Plectin oder Bullous Pemphigoid Antigen (BPAG1) miteinander verknüpft. Diese Interaktionen werden zusätzlich von MF- und MT-assoziierten Proteinen sowie Motorproteinen verstärkt. IFs sind an Desmosomen über Desmoplakin und an Hemidesmosomen über Plectin und BPAG1 verankert. Die Transmembranproteine, die den Kontakt zwischen benachbarten Zellen und der extrazellulären Matrix herstellen, sind die desmosomalen Cadherine und Integrine. IFs sind weiterhin an die äußere Kernhülle (ONM) über Plectin und Nesprin-3 gekoppelt; Nesprin-2 verbindet das MF-System mit dem Nucleus. An der inneren Seite der Kernhülle sind die Lamine, die nukleären IF, an die inneren Kernmembran (INM) angeheftet. Verändert nach Godsel *et al.*, 2008.

IFs unterscheiden sich fundamental von den MF und MT. Sie besitzen im Gegensatz zu MF und MT eine apolare biochemische Struktur, d. h. beide Enden der Filamente sind strukturell identisch (HERRMANN und AEBI, 2004). IF-Proteine binden im Gegensatz zu MF und MT nicht direkt an oder metabolisieren Nukleotide. Aufgrund ihrer unpolaren Struktur können sie nicht wie MT und MF als Proteintransportmatrix dienen, sie assoziieren allerdings mit Motorproteinen. *In vitro* polymerisieren IFs spontan (STRELKOV *et al.*, 2003; HERRMANN *et al.*, 2007). Es ist bis jetzt allerdings unklar, wie die Bildung der Filamente *in vivo* genau abläuft. Ob hierbei Polymerisations- oder Nukleationsfaktoren wie z. B. bei der Polymerisation von MF eine Rolle spielen, ist ebenfalls unbekannt. Es existieren unterschiedliche Daten, welche verschiedene Nukleationsorte für die Bildung von IFs vorschlagen (siehe 2.1.6.1). Ein definierter Bildungsort, wie z. B. das MTOC (*microtubule organizing center*), an dem Mikrotubuli-Polymerisation stattfindet, ist bis jetzt nicht bekannt. IFs zeigen im Gegensatz zu den hoch konservierten MT und MF eine hohe molekulare Vielfalt. Sie werden Zelltyp- und entwicklungspezifisch hergestellt, so dass verschiedene Zellen und Gewebe ein ganz individuelles Muster an IF-Proteinen besitzen.

2.1.1 Mikrotubuli

Mikrotubuli (MT) bestehen aus röhrenförmigen Proteinkomplexen, die aus zwei Untereinheiten zusammengesetzt sind, den α - und β -Tubulinen. Diese bilden Dimere, welche Kopf- zu Schwanz angeordnet sind und unter GTP-Verbrauch zu kurzen Protofilamenten polymerisieren (Abb. 3). 13 Protofilamente bilden die MT-Hohlröhren mit einem Durchmesser von etwa 25 nm (Abb. 3). Mikrotubuli sind essentiell für die Zellteilung, die Zellmigration, die Zellpolarisierung, den intrazellulären Vesikeltransport sowie Cilien- und Geißelbewegungen (EVANS und BRIDGMAN, 1995; ROSENBAUM, 2000; VAUGHAN, 2005). Sie bilden den Spindelapparat sich teilender Zellen aus, welcher die Chromatiden zu den Polen in den beiden Tochterzellen zieht. Die Minus-Enden der Mikrotubuli sind am MTOC angeheftet, die Plus-Enden befinden sich im Zytoplasma. Die Nukleation der MT findet innerhalb des MTOCs statt, gefolgt von der Addition von Untereinheiten am Wachstumsende. *In vitro* erfolgt das Wachstum an beiden Enden - am Plus-Ende schneller als am Minus-Ende. *In vivo* erfolgt das Wachstum innerhalb des MTOC am Plus-Ende. Das Plus-Ende ist hauptsächlich mit weiteren Proteinen assoziiert, die regulatorische Funktionen besitzen (MAPs, Mikrotubuli assoziierte Proteine, (WADE und HYMAN, 1997). Die Depolymerisation der Mikrotubuli findet bevorzugt am Minus-Ende statt.

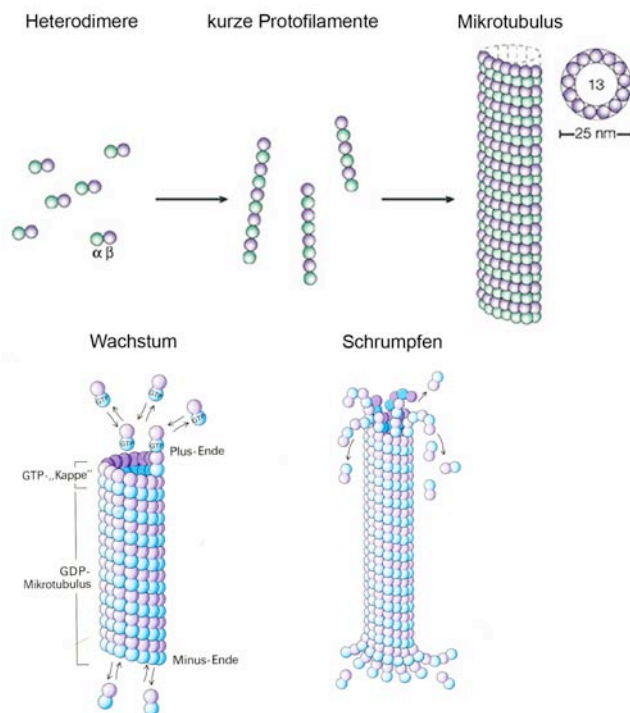


Abb.3: Bildung der Mikrotubuli.

α - und β -Tubulin-Dimere lagern sich zu kurzen Protofilamenten zusammen, welche den röhrenförmigen Mikrotubulus bilden. Das Wachstum von Filamenten wird durch Anlagerung von GTP-haltigen Untereinheiten primär am Plus-Ende erreicht. Nach Einbau erfolgt die Hydrolyse zu GDP. Wenn die Polymerisation schneller erfolgt als die GTP-Hydrolyse, ist eine GTP-„Kappe“ vorhanden. Das Schrumpfen der Mikrotubuli-Filamente wird durch Depolymerisation erreicht.

Verändert nach Westermann und Weber, 2003 und H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. Zipursky, P. Matsudaira und J. Darnell, Molekulare Zellbiologie, 2. Auflage (1996).

Transportvorgänge entlang der Mikrotubuli werden durch die assoziierten Motorproteine Kinesin und Dynein bewerkstelligt. Die Kinesine sind für den anterograden Transport zum Plus-Ende der MT zuständig, die Dyneine für den retrograden Transport zum Minus-Ende (PORTER *et al.*, 1999).

Während der Zellmigration findet ein ständiger Wechsel zwischen Wachstums- und Schrumpfungsphasen statt, der die Zelle nach vorn treibt (KIRSCHNER und MITCHISON, 1986). Im Lamellipodium entstehen MT durch die Polymerisierung ihrer Plus-Enden und interagieren mit Adhäsionskontakten (KAVERINA *et al.*, 1998).

2.1.2 Aktinfilamente

Zelluläre Bewegungsvorgänge, die zur Ausbreitung und Migration führen, sind vor allem abhängig von der Polymerisation von Aktin- oder Mikrofilamenten (MF). Diese Polypeptide zählen zu den evolutionär am stärksten konservierten Proteinen von den Protozoen bis zu den Vertebraten und sind essentielle Zellbestandteile. MF besitzen einen Durchmesser von etwa 6 nm und dienen der Stabilisierung der äußeren Zellform sowie dem intrazellulären Transport z. B. von Vesikeln (EVANS und BRIDGMAN, 1995). Die am besten beschriebene Funktion ist wohl die Aktin-Myosin-abhängige Kontraktion der Skelettmuskulatur. Weitere Funktionen erfüllen MF in den Mikrovilli von Epithelzellen (BERSHADSKY *et al.*, 2003). Durch Verknüpfung mit fokalen Adhäsionen, Adhärens- und Verschluss-Kontakten gewährleisten sie die mechanische Stabilität der Zellen (SMALL *et al.*, 2002). Des Weiteren sind sie für die Etablierung der Zellpolarität verantwortlich (LOUVARD, 1996). Einzelne Aktinmoleküle werden als globuläres Aktin (G-Aktin) bezeichnet, Aktinfilamente als F-Aktin (filamentöses Aktin). Die globulären Aktin-Untereinheiten sind stets Kopf- zu Schwanz angeordnet und verleihen damit den Filamenten eine Polarität. Die Polymerisierung von G-Aktin ist ATP-abhängig und führt zur Bildung der Helix (Abb. 4).

Während der Ausbreitung und Migration von Zellen tastet sich das vordere Ende der Zelle bzw. die Zellfront (*leading edge*) nach vorn. Hier findet die Aktinpolymerisierung und Filamentverzweigung statt (Abb. 4), welche für die Ausdehnung der Zelle verantwortlich ist (THERIOT und MITCHISON, 1992; POLLARD und BORISY, 2003). Abb. 4 zeigt die Polymerisierung von G-Aktin durch Bindung und Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) am Plus-Ende der MF. Am Minus-Ende erfolgt die Hydrolyse des ATPs zu ADP (Adenosindiphosphat) schneller als die Anlagerung eines neuen ATP-gebundenen G-Aktins, so dass die ADP-gebundenen Aktine abdissoziieren. Am G-Aktin erfolgt wieder die schnelle Bildung von ATP und damit wieder die Bindung ans Plus-Ende (POLLARD, 1986; POLLARD und BORISY, 2003). Verschiedene Aktin-bindende Proteine beeinflussen die Polymerisation und dienen somit als Regulationsfaktoren. Cofilin bindet am Minus-Ende und fördert die Dissoziation von G-Aktin. Profilin agiert als Antagonist zu Cofilin, indem es Aktin am Plus-Ende bindet und die Polymerisation durch die Förderung des Nukleotid-Austauschs begünstigt. Weiterhin verhindert Profilin die Nukleation. Der Aktin-Depolymerisierungs-Faktor (ADF) bindet an Aktin-Monomere und inhibiert den Nukleotid-Austausch. Capping-Proteine verhindern nach Bindung die weitere Polymerisation am Plus-Ende (AMANN und POLLARD, 2001; SMALL *et al.*, 2002).

Der *Actin-related protein* (Arp) 2/3-Proteinkomplex initiiert die Bildung von MF-Verzweigungen und schiebt somit die Zellfront beweglicher Zellen nach vorne und verankert weiterhin neue Filamente an

das bereits existierende Netzwerk (POLLARD und BORISY, 2003). Die Arp 2/3-abhängige Aktinpolymerisation wird durch die Bindung der fokalen Adhensionskinase (FAK) an Arp3 reguliert (SERRELS *et al.*, 2007).

Nukleations-fördernde Faktoren (NPFs) wie WASp (Wiskott-Aldrich syndrome protein) sind ebenfalls regulatorische Proteine. Sie initiieren Verzweigungen, indem sie den Arp 2/3-Komplex und Aktin-Monomere auf einem Seitenarm des Filaments in Verbindung bringen. Das Plus-Ende des Seitenastes wächst bis zur Termination durch Capping-Proteine. Das Tochterfilament wird am Minus-Ende des Mutterfilamentes verankert (WELCH und MULLINS, 2002). Aktinfilamente werden zu Bündeln und Netzwerken durch quervernetzende Proteine wie Filamin, Frimbrin, Villin, Spektrin und α -Actinin z. B. in Stressfasern verknüpft (SMALL *et al.*, 2002).

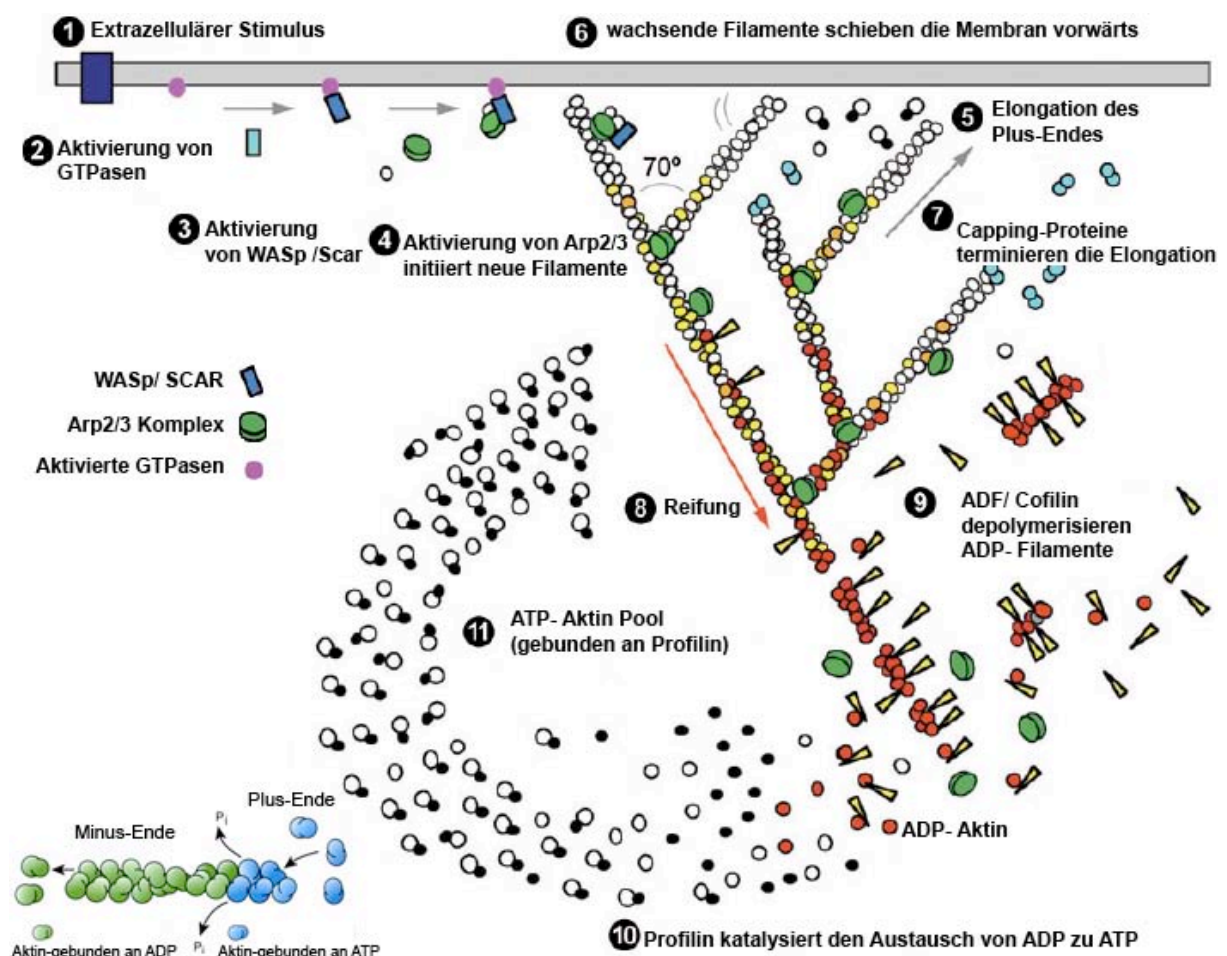


Abb. 4 Aktin-treadmilling-Model. (1-2) Extrazelluläre Stimuli aktivieren Membranrezeptoren, welche GTPasen aktivieren. (3-4) Anschließend erfolgt die Anschaltung der Nukleationsfaktoren WASp (Wiskott-Aldrich syndrome protein) und Scar, die den Arp 2/3-Komplex aktivieren und an G-Aktin binden. (5-6) Schnelles Wachstum am Plus-Ende der neuen Verzweigung schieben die Membran vorwärts. (7-8) Capping-Proteine beenden das Wachstum, während die fertigen Filamente durch APT-Hydrolyse reifen. (9) Die Depolymerisation wird durch die Dissoziation von ADP-Aktin am Minus-Ende, initiiert durch die Anbindung von ADF und Cofilin, erreicht (10-11). Profilin katalysiert den Austausch von ADP mit ATP und liefert damit ATP-G-Aktin-Untereinheiten an den Aktin-Pool, die für einen neuen Turnover-Zyklus zur Verfügung stehen. Verändert nach Pollard, 2007 und <http://anatomy.iupui.edu/courses/histo/lecture/cell/html>.

2.1.3 Extrazelluläre Matrix und Adhäsionskomplexe

Aktin-Stressfasern interagieren über transmembrane fokale Adhäsionskomplexe mit der extrazellulären Matrix (ECM; siehe Abb. 5 A und C; CAMPBELL, 2008). Auch Interaktionen zum MT-Netzwerk sind möglich (siehe Abb. 5 D). Die Ausbreitung und Migration von Zellen ist abhängig von diesen sich selbst zusammenbauenden, dynamisch regulierbaren Zelladhäsions-Strukturen, welche schon vor 30 Jahren beschrieben worden sind (ABERCROMBIE und DUNN, 1975; Abb. 5 A und B).

Die Adhäsionskomplexe sind höchst dynamische Strukturen, welche sich zusammenbauen, auflösen und wieder regenerieren (Turnover), je nachdem ob die Zelle sich bewegt und/oder sich teilt. Entstehende, punktförmige Adhäsionen in sich ausbreitenden Lamellipodien werden fokale Kontakte (FK) genannt (ZAIDEL-BAR *et al.*, 2004). Sie können durch Bindung weiterer Proteine zu fokalen Adhäsionen (FAs) reifen, so dass die Zelle stabil in der Matrix angeheftet wird und eine Kraftübertragung auf den Aktin-Myosin-Komplex stattfinden kann, welcher für die Zellbewegung verantwortlich ist. Weiterhin agieren FAs als Kommunikationsplattform zwischen Zellinnerem und Zelläußeren, da zahlreiche Signalwege, z. B. für das Zellwachstum- und überleben, von FAs ausgehen und reguliert werden (ZAMIR und GEIGER, 2001).

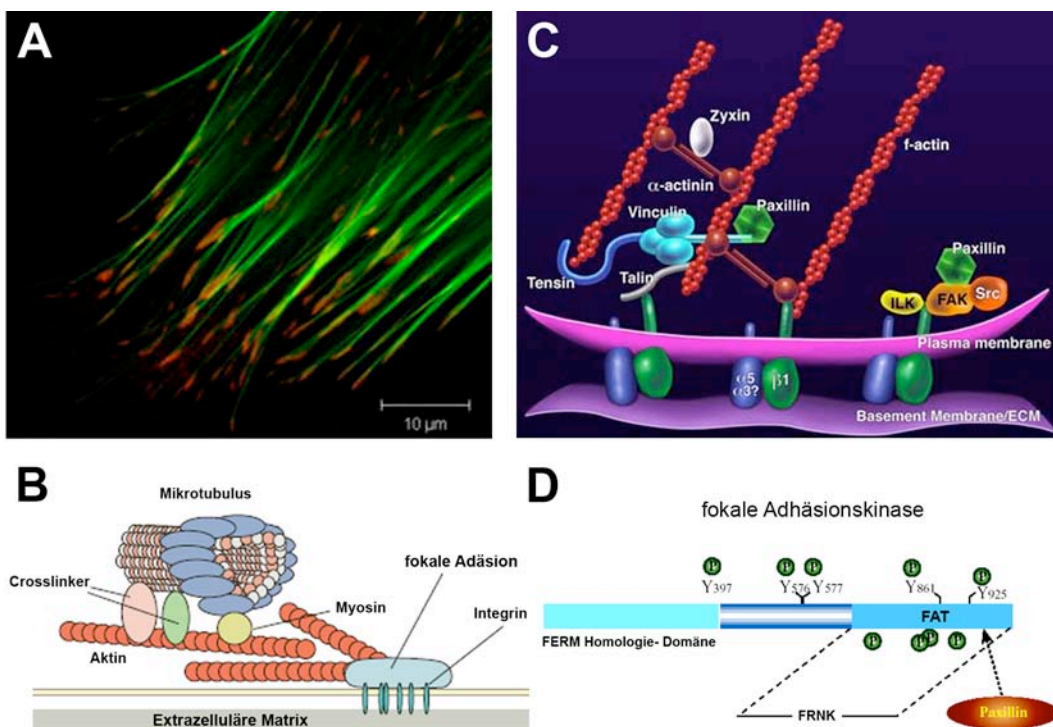


Abb. 5: Fokale Adhäsionen und fokale Adhäsionskinase. (A) Fokale Adhäsionen (FA, rot) lokalisieren an der Spitze von Aktin-Stressfasern (grün) und sind über Integrine mit der extrazellulären Matrix verbunden (B). (C) Zahlreiche Proteine bauen den Adhäsionskomplex auf. (D) Die fokale Adhäsionskinase besitzt N-terminal eine FERM- (*erythrocyte band 4.1 ezrin-radixin-moesin*) Homologie-Domäne und C-terminal eine FAT- (*focal adhesion targeting*) Domäne mit zahlreichen Phosphorylierungsstellen. Von J. Wehland (A, ECF-Meeting Potsdam) und E. Fuchs zur Verfügung gestellt (B, <http://www.rockefeller.edu/labheads/fuchs/php>); (C) verändert nach Watanabe *et al.*, 2005; (D) nach Parsons, 2003.

Hunderte von Molekülen sind an der Bildung von Adhäsionskomplexen beteiligt (ZAIDEL-BAR *et al.*, 2007; www.adhesome.org). Unterschieden werden zytoskeletale Proteine wie Tensin, Vinculin, Paxillin, α -Actinin, und Talin, sowie Tyrosin-Kinasen wie z. B. Src (*Rous sarcoma oncogene* Kinase) und die FAK (Abb. 5 C). Vinculin, Tensin, α -Aktinin und das Vasodilator-stimulierende Phosphoprotein (VASP) binden direkt oder bündeln Aktinfilamente. Andere Proteine, wie z. B. Talin, Tensin und die FAK, binden an das zytoplasmatische Ende der Integrine; (Abb. 5 C).

Je nach Bewegungszustand der Zelle sind unterschiedliche Adhäsionsmoleküle, Signalmoleküle und Adaptormoleküle, welche den intrazellulären Komplex bilden, am Aufbau der FAs beteiligt. Die meisten dieser Moleküle können mit mehreren Proteinen gleichzeitig interagieren, so dass zahlreiche alternative Kombinationsmöglichkeiten im Aufbau der Adhäsionskomplexe bestehen. Die Regulation erfolgt hauptsächlich über Phosphorylierungen, aber auch durch Rho-GTPasen, welche an Integrine sowie an MF und MT binden (ZAMIR und GEIGER, 2001; ZAIDEL-BAR *et al.*, 2004; ZAIDEL-BAR *et al.*, 2007). Die zentralen transmembranen ECM-Rezeptormoleküle gehören zur Integrin-Genfamilie (WOODS und COUCHMAN, 1994). Integrine bestehen aus α - und β -Heterodimeren, die lange extrazelluläre Domänen, zytoplasmatische Domänen und Transmembrandomänen enthalten (SCHWARTZ *et al.*, 1995). Zunächst binden die Integrine an ECM-Proteine (beispielsweise Fibronectin). Die Phosphorylierung der Tyrosine führt zur Bindung von Talin und Paxillin an die Integrine, gefolgt von FAK und Vinculin. Zyxin und Tensin binden nur an reife FAs (Abb. 5 C). Solange das Lamellipodium fortschreitet, bilden sich an der Vorderkante ständig neue Komplexe. Wenn das Lamellipodium sich nicht mehr nach vorne bewegt oder sich zurückzieht, lösen sich die meisten FKs wieder auf, einige wachsen durch Bindung weitere Proteine, wie z. B. Zyxin, zu reifen FAs und stabilisieren damit die Zellfront (ZAIDEL-BAR *et al.*, 2003).

Interessanterweise werden viele Komponenten der FAs über Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK) reguliert. ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) phosphoryliert beispielsweise FAK und reguliert damit die Interaktion mit Paxillin (HUNGER-GLASER *et al.*, 2003). Die p38-Mitogen aktivierte Proteinkinase (p38) phosphoryliert Paxillin am Serin83; die Jun N-terminale Kinase (JNK) ist ebenfalls an FAs lokalisiert (ALMEIDA *et al.*, 2000; HUANG *et al.*, 2004).

Auch MT beeinflussen die Entwicklung und den Turnover von FAs. Der Abbau der Adhäsionen wird über die Rho-GTPase Dynamin induziert, welche mit der FAK interagiert (KAVERINA *et al.*, 1999; EZRATTY *et al.*, 2005).

Die Serin-Threonin-Kinase FAK nimmt eine zentrale regulatorische Rolle bei der Kontrolle der Signalweiterleitung zwischen Zellinnerem und Zelläußeren sowie beim Auf- und Abbau der FAs ein. Die 125 kDa große Proteinkinase besitzt eine zentrale katalytische Kinasedomäne, die von nicht-katalytischen Domänen am N- und C-Terminus flankiert wird (Abb. 5 D). Der N-Terminus zeigt Ähnlichkeiten zu FERM-Homologie-Domänen (erythrocyte band four.1 ezrin-radixin-moesin) und induziert Interaktionen mit Integrin, Aktin, sowie membranassoziierten Adaptorproteinen und Wachstumsfaktoren (GIRAULT *et al.*, 1999; SUN *et al.*, 2002).

Die zentrale katalytische Kinasedomäne ist für multiple Protein-Protein Interaktionen verantwortlich. Das Tyrosin Y₃₉₇ ist die Haupt-Autophosphorylierungsstelle und interagiert mit der SH2- (Src-Homologie 2) Domäne von Src. Am C-Terminus befindet sich die FAT-Domäne (*focal adhesion targeting*), welche für das Targeting der FAK an FAs verantwortlich ist. In der FAT-Domäne befinden sich unter anderem Bindestellen für Paxilin und Talin, sowie für Rho-GTPasen (HILDEBRAND *et al.*, 1993).

FAK^{-/-} Mäuse sind embryonal lethal (FURUTA *et al.*, 1995); FAK^{-/-} Fibroblasten besitzen interessanterweise ungewöhnlich große und funktionelle FAs, weisen allerdings eine beeinträchtigte Migration und Defekte im FA-Turnover auf, da der Abbau der Adhäsionen gestört ist (ILIC *et al.*, 1995; SCHLAEPFER *et al.*, 2004; WEBB *et al.*, 2004; MITRA *et al.*, 2005).

Die Aktivierung der FAK erfolgt entweder durch extrazelluläre Stimuli am N-Terminus wie z. B. durch die Bindung von Wachstumsfaktoren, durch Integrin-Clustering (Dimerisierung) oder durch die Aktivierung von Src mittels Autophosphorylierung an mehreren Stellen (z. B. Tyr³⁹⁷). Anschließend werden weitere FA-Proteine angebinden und phosphoryliert (SCHALLER, 2001; ZAMIR und GEIGER, 2001; ZAIDEL-BAR *et al.*, 2004). In zahlreichen Tumoren und Krebszellen ist die FAK überexprimiert, welches sie zu einem interessanten Objekt in der Tumorbekämpfung macht (GABARRA-NIECKO *et al.*, 2003). Weiterhin beeinflusst die FAK über Bindung an den Arp 2/3-Proteinkomplex die Aktinpolymerisation und damit die Ausbreitung von Lamellipodien sowie die Migration von Zellen (SERRELS *et al.*, 2007).

Die FAK-related-non-kinase (FRNK) ist eine Isoform der FAK, die durch alternatives Spleißen generiert und autonom hergestellt wird. Ihr Promotor befindet sich innerhalb eines Introns der FAK. FRNK ist identisch mit dem C-Terminus der FAK, besitzt aber keinerlei Kinaseaktivität und fungiert somit als Negativ-Regulator der FAK. Durch Inhibierung der Kinsase-Aktivität werden nachgeschaltete Proteine wie Paxillin nicht mehr phosphoryliert und somit die Migration und Ausbreitung der Zelle verhindert. Die Expression der FRNK ist gewebespezifisch reguliert (SCHALLER *et al.*, 1993).

Durch Ersatz von Lysin am Tyr 576 durch Glutamin induzierten Gabarra-Niecko und Kollegen eine Punktmutation in der Kinase-Domäne der FAK. Die entstandene dominant-aktive Form wird als Super-FAK bezeichnet, da sie die katalytische Aktivität der FAK erhöht. Auch nachgeschaltete Substrate wie Paxillin und Tensin werden hyperphosphoryliert, wodurch sich die FAs schnell wieder auflösen und somit die Motilität von Epithelzellen erhöht wird (GABARRA-NIECKO *et al.*, 2002).

2.1.4. Intermediärfilamente

Grundvoraussetzung für die Entstehung von komplexen Organismen ist der Zusammenhalt und die Kommunikation zwischen Zellen, welche wiederum die Differenzierung von Zellen zu spezialisierten Geweben und Organen bedingt. Folglich entwickelten sich z. B. spezialisierte Muskeln für die autonome Körperbewegung, Atmung oder Verdauung. Die hieraus resultierenden Kräfte, welche auf die Zellverbände wirken, bedeuten einen immensen mechanischer Stress und belasten die

Gewebeintegrität. Arthropoden lösten dieses Problem durch die Ausprägung eines stabilen Exoskelettes aus Chitin. Alle anderen Metazoen entwickelten verschiedene inter- und intrazelluläre Komponenten zur Stabilisierung von Zell- und Gewebeverbänden: IFs bilden ein festes, aber dennoch flexibles und hochdynamisches Netzwerk, welches sich durch das gesamte Zytoplasma erstreckt und über Zell-Zell-Verbindungen wie Desmosomen und Zell-Matrix Kontakte (Hemidesmosomen, FAs) miteinander verbunden ist. Diese extensiven Netzwerke aus flexiblen Proteinfasern sind über zahlreiche weitere assoziierte Proteine miteinander und mit den anderen Komponenten des Zytoskelettes verknüpft (Abb. 2).

Mindestens 71 menschliche Gene codieren für funktionale IF-Proteine; damit ist diese Genfamilie eine der größten des humanen Genoms (KIM und COULOMBE, 2007; GODSEL *et al.*, 2008). Sie statten jeden Zelltyp mit einer einzigartigen Architektur aus, welche diesem die optimalen mechanischen Eigenschaften für dessen individuelle Bedürfnisse verleiht. Die meisten Metazoen besitzen zwei verschiedene IF-Systeme: eines innerhalb des Nukleus, welches an die innere Kernmembran angeheftet ist, und ein weiteres im Zytoplasma (HERRMANN und AEBI, 2004; siehe Abb. 2).

2.1.4.1 Unterteilung und Vorkommen der Intermediärfilamente

Die verschiedenen Proteine der IFs sind aufgrund ihrer Genstruktur, ihres Aufbaus und ihrer Gewebeverteilung in fünf distinkte Typen oder Sequenz-Homologie-Klassen (SHC, *sequence homology classes*) eingeordnet (FUCHS, E. und WEBER, 1994), welche in Tabelle 1 aufgelistet sind.

Typ I und Typ II beinhalten die IF-Proteine epithelialer Zellen, die Keratine (K). Typ I enthält die sauren Keratine K9-K28 und die Haarkeratine K31-40, Typ II die basischen Keratine K1-K8, K71-74 und die Haarkeratine K81-K86 (SCHWEIZER *et al.*, 2006). Jeweils ein saures und ein basisches Keratin bilden ein Heteropolymer. Die als Typ III zusammengefassten IFs Vimentin, Desmin, GFAP (*glial fibrillar acidic protein*), Synemin und Peripherin bilden hingegen Homopolymere. Die Neurofilamente (NF-L, NF-M, NF-H), Nestin, Syncoilin und α -Internexin werden als Typ IV IF bezeichnet. Typ V beinhaltet die nukleären IFs, die Lamine (A, B, C), welche die Kernhülle und das Karyoplasma organisieren. Eine weitere Einteilung der verschiedenen IFs richtet sich nach ihrem Aufbau-Modus; hier werden nur drei Gruppen unterschieden (siehe 2.1.3; HERRMANN und AEBI, 2004).

71 humane IF-kodierende Gene sind bisher bekannt, die in 74 Proteine translatiert werden (PEKKNY und LANE, 2007). Die Proteingrößen variieren von 40 bis 240 kDa (KIM und COULOMBE, 2007). Sie werden in unterschiedlichen Zelltypen spezifisch hergestellt und besitzen verschiedene Funktionen, so dass unterschiedliche Zellen und Gewebe entsprechend ihrer Anforderung Unterschiede in ihrer Zytoarchitektur aufweisen. Während der Embryonalentwicklung werden IFs ebenfalls in komplexen Mustern unterschiedlich transkribiert, so dass verschiedene Gewebetypen anhand ihrer IF-Muster voneinander unterschieden werden können (HERRMANN *et al.*, 2003). Keratine werden vor allen in Epithelien gebildet, Vimentin in Zellen mesenchymalen Ursprungs. Desmin ist in den Z-Scheiben aller Muskeln lokalisiert; GFAP in Gliazellen und Peripherin im peripheren Nervensystem. Die

Neurofilamente kommen hauptsächlich in Neuronen vor, und die Lamine werden in allen Zellen im Nukleus exprimiert (HERRMANN *et al.*, 2007).

Tabelle 1: IFs sind in fünf verschiedene Typen unterteilt (verändert nach Herrmann und Aebi, 2000 sowie Kim und Coulombe, 2007)

Typ	Proteine	Größe (kDa)	hauptsächlich Vorkommen	Beispiele assoziierter Krankheiten
I	saure Keratine K9-K28, K31-40	40-64	Epithelien, Haare Nägel	EBS (K14) PC-I (K16) PC-II (K17)
II	basische Keratine K1-K8, K71-74 K81-K86	52-68	Epithelien, Haare Nägel	EBS (K5) PC-I (K6a) PC-II (K6b)
III	Vimentin	55	Mesenchym	Cardiomyopathien Alexander Disease Amyotrophe Lateralsklerose
	Desmin	53	Muskel	
	GFAP	52	Gliazellen, Astrozyten	
	Peripherin	54k	periphere Neurone	
IV	Neurofilamente	61-110	ZNS Neurone	ALS, Parkinson
	α -Internexin	66	ZNS Neurone	
	Nestin	177	Neuroepithel	
	Syncoilin	54	Muskel	
	Synemin	182	Muskel	
V	Lamine	62-78	ubiquitär (nuleäre Lamina)	Muskeldystrophien, vorzeitiges Altern
-	Phakinin (CP 49)	47	Linse	Grauer Star
	Filensin (CP 115)	83	Linse	Grauer Star

Über 75 bekannte IF-assoziierte Erkrankungen verdeutlichen die Bedeutung der IF-Proteine für die Zell- und Gewebeintegrität (OMARY *et al.*, 2004). Störungen im IF-System bewirken Zell- und Gewebefragilität und verursachen äußerst unterschiedliche Syntome (Tabelle 1). Die „*human intermediate database*“ verzeichnet 2000 Mutationen in IF-Genen (<http://www.interfil.org>). Punktmutationen in Keratingenen verursachen Hautkrankheiten, die zu schweren Zellschäden, -fragilität und Blasenbildung in der Haut von betroffenen Patienten führen (IRVINE und MCLEAN, 1999; TAKAHASHI *et al.*, 1999); siehe 2.5 sowie Abb. 11 und 12). Mutationen in Desmin- und Lamin-Genen führen zu Muskeldystrophie und Kardiomyopathien (BONNE *et al.*, 1999; GOLDFARB *et al.*, 2004). Verschiedene Mutationen in Lamin A verursachen vorzeitiges Altern (Hutchinson-Gilford Progeria Syndrom, Werner-Syndrom (MOUNKES, L. *et al.*, 2003; MOUNKES, L. C. und STEWART, 2004). Eine

Mutation in GFAP verursacht Alexander's Krankheit mit verhängnisvollen Fehlsteuerungen im zentralen Nervensystem (Li *et al.*, 2002). Die durch Mutationen in IF-Genen verursachten Krankheiten manifestieren sich meist zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Herzkrankheiten treten vorwiegend erst in der zweiten oder dritten Lebenshälfte auf, Hautkrankheiten fast immer schon bei Geburt, verschlechtern sich aber meist im Laufe der Lebenszeit.

Im Gegensatz zu den hochkonservierten MT und MF existieren IF-freie humane Zelllinien (SW-13) (VENETIANER *et al.*, 1983) und Organismen, die keine zytoplasmatischen IFs besitzen (*Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae* und sessile Lebensformen wie *Hydra* (ERBER *et al.*, 1998). Allerdings besitzt *Drosophila melanogaster* zwei Gene, die für nukleäre Lamine kodieren. Daraus folgend wurde vorgeschlagen, dass das ancestrale Ur-IF-Gen wahrscheinlich durch ein Lamin-ähnliches Kern-Gen kodiert wurde (ERBER *et al.*, 1998). Anschließend könnten die Exone, welche für die nukleäre Zielfindung verantwortlich sind, verloren gegangen sein, so dass ein zytoplasmatisches Proteinprodukt entstand. Dieses könnte in Organismen, die kein schützendes Außenskelett besitzen, positiv selektioniert worden sein. Anschließend funktionale Spezialisierung könnten zu massiven Genduplikationen geführt haben, welches die Vielfalt der IF-Gene erklären würde.

In dem Prokaryont *Caulobacter crescentus* wurde das Protein Crescentin als IF-Homolog identifiziert, welches für die halbmondförmige Zellform verantwortlich scheint (AUSMEES *et al.*, 2003). Crescentin weist teilweise eine hohe AS-Übereinstimmung mit eukaryotischen IF-Proteinen wie Keratin und Lamin auf. (HERRMANN und AEBI, 2004). Der Invertebrat *Caenorhabditis elegans* besitzt 11 IF-codierende Gene, davon ein Lamin-ähnliches, die unter anderem im Darm synthetisiert werden. Diese werden in drei Filamentgruppen-Systeme unterteilt (IF-A, IF-B/C, und IF-D/E). Die IF-Gene der Gruppe IF-B/C bilden untereinander Heterodimere (KARABINOS *et al.*, 2001). Der Zebrafisch (*Danio rerio*) zeigt ähnliche Komplexität wie Säugetiere in seinen IF-Genen, es wurden sogar Homologe der Keratine 8 und 18 identifiziert (SCHAFFELD *et al.*, 2003). In Vertebraten existieren ganz im Gegensatz zu den MF und den MT extrem viele IF-Gene, welches auf eine funktionale Spezialisierung hindeutet.

2.1.4.2 Aufbau und Struktur der zytoplasmatischen Intermediärfilamente

Trotz der großen Diversität aller IF-Proteine teilen sie einen ähnlichen Strukturbauplan. Die Sekundärstruktur ist dreigeteilt und besteht aus einer zentralen, ~ 48 nm langen alpha-helikalen, hochkonservierten Stabdomäne, welche von globulären, nicht α -helikalen Domänen variabler Größe und Sequenz flankiert wird (Kopf- und Schwanzdomäne, Abb. 7 A und Abb. 6). Posttranslationale Modifikation wie z. B. Phosphorylierungen, welche der IF-Regulation dienen (siehe 2.1.6.2), finden bevorzugt an den Kopf- und Schwanzdomänen statt.

Die helikale Stabdomäne der IFs besteht aus den vier Abschnitten 1A, 1B, 2A und 2B, welche als *coiled coils* bezeichnet werden und von den drei kurzen Linkern L1, L2 und L12 unterbrochen werden (BURKHARD *et al.*, 2001; Abb. 6). Sie besitzen eine Substruktur aus heptaden Wiederholungen, deren

1. und 4. Position von hydrophoben Aminosäuren besetzt sind (FUCHS, E. und WEBER, 1994; PARRY und STEINERT, 1999; STRELKOV *et al.*, 2002; HERRMANN und AEBI, 2004; HERRMANN *et al.*, 2007).

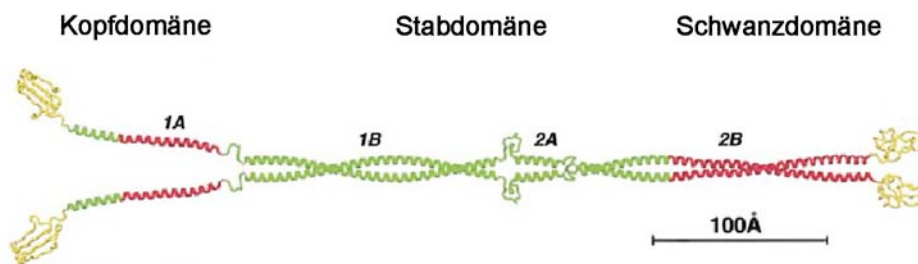


Abb. 6: Atom-Modell eines Vimentin-Dimers. Kopf- und Schwanzdomäne umgeben die aus vier Abschnitten bestehende Stabdomäne. Verändert nach Strelkov *et al.*, 2002.

Die Stabdomäne der zytoplasmatischen IF-Proteine der Vertebraten besteht aus etwa 310 AS, die Längen der einzelnen Segmente sind konserviert. Das Segment 1B der nukleären Lamine und der IFs primitiver Invertebraten ist allerdings sechs Heptaden länger. Dies könnte erklären, dass Lamine nur mit sich selbst polymersieren können (HERRMANN *et al.*, 2007). Zwei Segmente der Stabdomäne, die 1A-Subdomäne, welche in der aminoterminalen Region lokalisiert ist, und die 2B-Subdomäne am carboxyterminalen Ende, sind die am höchsten konservierten Regionen aller IF-Typen.

Die beiden nicht alpha-helikalen Kopf- und Schwanz-Domänen haben wenige Gemeinsamkeiten und zeigen eine hohe Variabilität in Länge, Sequenz und Substruktur (PARRY und STEINERT, 1999). Variationen in der Kopf- und Schwanzdomäne sind für die große Heterogenität in der Proteingröße der IF verantwortlich (Molekulargewicht ~ 40 - 240 kDa) und erklären die hohe Strukturvariabilität und die sich daraus ergebenden zell- und gewebespezifischen Funktionen. Die variablen Domänen besitzen ein großes Spektrum an Interaktionsmöglichkeiten, welche die weitreichenden biochemischen und physiologischen Eigenschaften unterstreichen.

Der Aufbau der IFs wird hauptsächlich durch die Interaktionen der verschiedenen Stabdomänen bestimmt. Transfektionsexperimente haben gezeigt, dass außerdem die aminoterminalen Domänen essentiell für den IF-Aufbau sind. Die carboxyterminalen Domänen tragen ebenfalls über laterale Interaktionen zur Netzwerkorganisation bei (HERRMANN *et al.*, 2003).

2.1.4.3 Zusammenbau der Intermediärfilamente

Bei der Polymerisation der IFs assoziieren zunächst zwei individuelle Polypeptidketten (Monomere, Abb. 7 A) parallel und bilden damit das *coiled coil*-Dimer (Abb. 7 B), welches den elementaren Baustein der IFs darstellt. Die Dimere verknüpfen sich versetzt entlang ihrer lateralen Oberflächen in anti-paralleler Anordnung zu apolaren Tetrameren (Abb. 7 C). Soellner und Kollegen (1985) konnten Tetramere als lösliche Einheiten *ex vivo* isolieren. *In vitro* werden Tetramere bei niedrigen Ionenkonzentrationen und physiologischen pH-Werten gebildet. Der Zusammenbau der IFs *in vitro*

ist nicht abhängig von Ko-Faktoren; *in vivo* werden ihr Zusammenbau sowie die dynamischen Eigenschaften allerdings durch kombinierte Interaktionen von Kinasen, Phosphatasen und Chaperonen bedingt (SOELLNER *et al.*, 1985; IZAWA und INAGAKI, 2006).

Tetramere assoziieren *in vitro* lateral und sehr schnell zu höher geordneten Oligomeren, sogenannten „unit length filaments“ (ULF) von 16 nm Durchmesser und 60 nm Länge. Anschließend longitudinale End- zu End-Anlagerungen führen zu lose gepackten Filamenten, die einige 100 nm lang sind. In einem weiteren Schritt werden die Filamente intrafilamentös reorganisiert, wodurch der Durchmesser auf 10–12 nm schrumpft (HERRMANN *et al.*, 1999; STRELKOV *et al.*, 2003).

Je nach IF-Typ werden die Tetramere unterschiedlich zu Protofilamenten und anschließend zu reifen Filamenten zusammgebaut (Abb. 7 D und E). Ein IF-Polymer besteht im Querschnitt aus 16 *coiled coils*-Dimeren, die aus vier ineinander verflochtenen Protofibrillen zusammengesetzt sind (HERRMANN und AEBI, 2000).

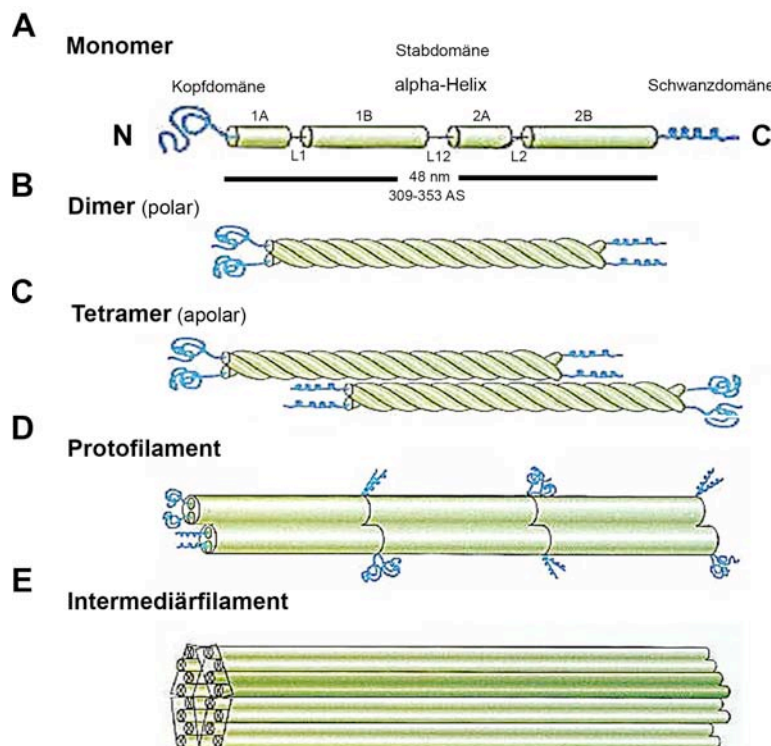


Abb. 7:
Schematisches Modell des IF-Zusammenbaus.

(A) IF-Monomere besitzen eine dreiteilige Struktur, bestehend aus einer 48 nm langen, α -helikalen Stabdomäne, die von einer N-terminalen Kopf- und einer C-terminalen Schwanzdomäne flankiert wird. (B) Zwei Monomere bilden umeinander gewundene Dimere (*coiled coils*), die sich antiparallel und halb überlappend zu einem apolaren Tetramer formen (C). Tetramere schließen sich je nach *assembly group* zunächst zu einem Protofilament (D), und schließlich zum IF (E) zusammen. Verändert nach: <http://cytochemistry.net>.

Herrmann und Kollegen (2000) beschreiben drei „assembly groups“, welche die IFs nach ihrem Aufbaumodus in drei unabhängige Gruppen unterteilen. Die *assembly group I* beinhaltet Typ I und II IFs, die Keratine. Diese bilden obligate Heterodimere. *Assembly group II* besteht aus Typ III und Typ IV-artigen IFs; *assembly group III* aus den Laminen, den Typ V IFs (Abb. 8). *In vitro* lagern sich Desmin und Vimentin (*assembly group II*) sehr schnell bei bestimmten Ionenkonzentrationen (100 mM NaCl oder KCl) zusammen. Durch Zugabe des gleichen Volumens an 0,2% Glutaraldehyd kann dieser Prozess gestoppt und nach Fixierung der Proben am EM ausgewertet werden. Nach einer Sekunde können kurze, einheitliche Filamente mit einem Durchmesser von 16 nm und einer Länge von etwa

60 nm beobachtet werden; sie werden als ULFs bezeichnet und bestehen aus 8 - 11 Tetrameren (Abb. 8 G, (HERRMANN *et al.*, 1996; HERRMANN und AEBI, 2000). Diese erste Phase des IF-Zusammenbaus wird durch laterale Assoziation von Tetrameren durchgeführt. In der zweiten Phase findet vor allem ein longitudinales Anlagern (*annealing*) der ULFs statt; welches in Filamenten von 250 nm Länge und etwa 15 nm Durchmesser resultiert (nach 60 s). Durch eine radiale Kompaktierung in der dritten Phase vermindert sich der Durchmesser auf etwa 11 nm.

Keratine, Mitglieder der *assembly group I*, zeigen einen anderen Ablauf beim Filament-Zusammenbau. ULFs können nur bei sehr niedriger Proteinkonzentration (0,1 mg/ml) und ebenfalls niedriger Ionenkonzentration (10 mM Tris-HCl) beobachtet werden. Der Zusammenbau von K8 und K18 zu Filamenten erfolgt schon innerhalb von 10 s, wobei der laterale und der longitudinale Zusammenbau fast zeitgleich ablaufen (HERRMANN *et al.*, 1999).

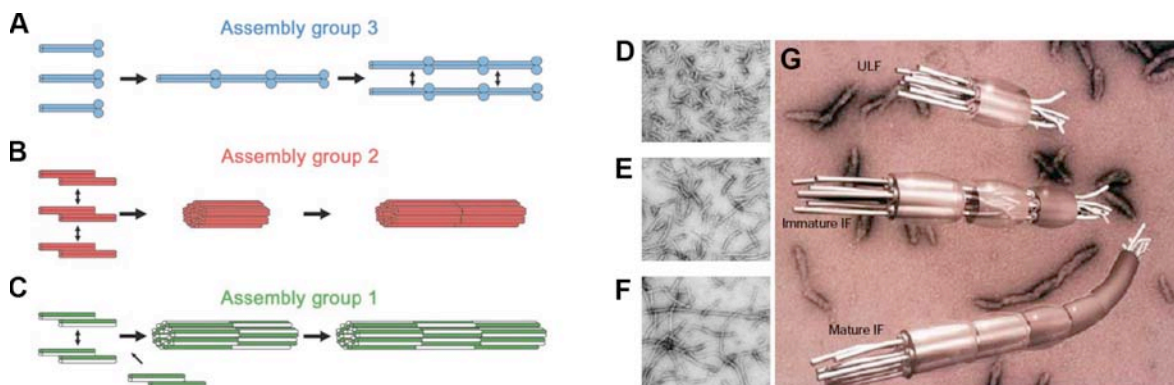


Abb. 8: Schematisches Modell der verschiedenen IF-assembly groups. (A) Lamin-Dimere, welche der *assembly group III* angehören, bilden hintereinanderliegende Kopf-Schwanz-Filamente, die anschließend lateral assoziieren. (B) Vimentin, ein IF-Protein der *assembly group II*, bildet aus Tetrameren ULFs, die wiederum longitudinal zu IFs assemblieren. (C) Die *assembly group I* besteht aus den sauren und basischen Keratinen, die jeweils obligate Heterodimere formen. Die anschließend gebildeten Tetramere assemblieren nahezu gleichzeitig lateral und longitudinal zu Filamenten. (D-F) Negativ-gefärbte EM Bilder zeigen ULFs (D), lose gepackte sowie kurze und unreife IFs (E) und kompakte, reife IFs (F). (G) Das Modell fasst den Vimentin-Zusammenbau *in vitro* zusammen. (A-C) aus Herrmann und Aebi, 2004; (D-F) aus Herrmann und Aebi, 1998.

2.1.4.4 Dynamik von Intermediärfilamenten

Obwohl die IF-Polypeptide lange Halbwertszeiten besitzen und biochemisch sehr stabil sind, durchlaufen die IF-Netzwerke regelmäßig Umgestaltungen, welche den Abbau und Wiederaufbau des Netzwerkes mit einschließen. Solche Neuordnungen finden z. B. während der Zellteilung, Zellwanderung und der Wundheilung statt. Da IFs apolar sind, wurde lange Zeit vermutet, dass die Umorganisation durch intrafilamentären Austausch erfolgt. Erste Versuche zeigten die Inkorporation von mikroinjizierten Keratinen in IFs von Epithelzellen (ALBERS und FUCHS, 1987; VIKSTROM *et al.*, 1989; MILLER *et al.*, 1991; MILLER *et al.*, 1993). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die IFs zu nicht-filamentösen Aggregaten während der Prometaphase abgebaut und nach der Zellteilung in den Tochterzellen wieder zusammgebaut werden (FRANKE *et al.*, 1982; LANE *et al.*, 1982). FRAP- (*Fluorescence-Recovery after Photobleaching*) Experimente mit Vimentinfilamenten zeigten den

Austausch von Untereinheiten (Turnover) innerhalb eines Netzwerkes (VIKSTROM *et al.*, 1992). Weiterhin bleibt aber unklar, ob sich die IF-Untereinheiten lateral entlang individueller Filamente austauschen, ob der Tausch an den Filament-Enden stattfindet, oder ob beide Möglichkeiten existieren.

Experimente mit fluoreszenzmarkierten IF-Proteinen zeigten die Existenz von verschiedenen IF-Organisationsformen. Es wurden Partikel (WINDOFFER und LEUBE, 1999), Vorläufer (WINDOFFER und LEUBE, 2001) und *squiggles* (YOON, K. H. *et al.*, 2001; HELFAND *et al.*, 2003a) beschrieben. Vimentin-Partikel vereinigen sich, um sogenannte *squiggles* zu bilden (YOON, M. *et al.*, 1998), Keratinfilamentvorläufer verbinden sich zu kurzen Filamenten (WINDOFFER *et al.*, 2004). Da die Keratinvorläufer in polymerisierende Netzwerke integrieren, konnte erklärt werden, wie sich Netzwerke *de novo* in Zellen bilden (WINDOFFER und LEUBE, 2001). Die Bildung von vorläuferartigen IF-Strukturen scheint eine generelle Eigenschaft von IFs zu sein, da sie für Keratin (WINDOFFER und LEUBE, 2001), Neurofilamente (ROY *et al.*, 2000), Peripherin (HELFAND *et al.*, 2003a) und Vimentin (PRAHLAD *et al.*, 1998) nachgewiesen wurden.

Durch Beobachtungen dieser IF-Vorläufer mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten IF-Konstrukten in lebenden Zellen wurden Mechanismen des IF-Zusammenbaus aufgedeckt: Keratinfilamentvorläufer (KFP) bilden sich in der Zellperipherie (WINDOFFER *et al.*, 2004). Peripherinvorläufer entstehen anscheinend *de novo* aus neusynthetisierten Proteinen (CHANG *et al.*, 2006).

Posttranslationelle Modifikationen wie z. B. Glykosilierungen oder Phosphorylierungen dienen als Regulationsmechanismen (KIM und COULOMBE, 2007). Der Abbau erfolgt nach Ubiquitylierung in Proteasomen (KU und OMARY, 2000). Auch Interaktionen mit Intermediärfilament-assoziierten Proteinen (IFAPs) besitzen einen Einfluss auf die dynamischen Eigenschaften der IF-Organisation (OMARY *et al.*, 2006).

2.1.4.5 Funktionen von Intermediärfilamenten

Die große Anzahl der in Vertebraten evolvierten Intermediärfilamentgene lässt sich anhand ihrer spezifischen Gewebsexpression sowie ihrem breiten Funktionsspektrum erklären. IFs verleihen Zellen mechanische Stabilität und sind maßgeblich an ihrer Formgebung beteiligt. Der Schutz vor mechanischem Stress wurde lange als die Hauptaufgabe der IFs angesehen, da sie eine hohe Dehnbarkeit und eine starke Resistenz gegenüber Brüchen aufweisen und über spezifische Zell-Zell-Kontakte verknüpft sind (KARTENBECK *et al.*, 1983; KARTENBECK *et al.*, 1984; GREEN und GAUDRY, 2000; KOTTKE *et al.*, 2006). IFs besitzen eine ungewöhnliche Dehnbarkeit im Vergleich zu MF und MT und sind damit die flexibelsten der biologischen Filamente. Sie können sich um mehr als das dreifache ihrer Länge strecken, bevor sie brechen. Sie sichern damit die Dehnbarkeit und Reißfestigkeit der Zelle (KREPLAK und FUDGE, 2007). Rheologische Messungen haben gezeigt, dass IFs außerdem bis zu 300-400 % Scherstress ertragen können, bevor das Netzwerk zusammenbricht (JANMEY *et al.*, 1998).

IF-Netzwerke unterliegen einem ständigen Austausch zwischen Polymeren und löslichen Untereinheiten und interagieren über die verschiedensten inter- und intrazellulären Verknüpfungen mit weiteren Komponenten des Zytoskelettes. Gerade die hohe Stabilität und die Regulation über Phosphorylierungen bieten ideale Voraussetzungen als intrazelluläre Stress- und Kommunikationsplattform (OMARY *et al.*, 2006). Der Widerstand gegen mechanischen Stress wird beispielsweise durch veränderte Keratinexpression erhöht. Nach Streckung von Keratinozyten wird die Expression von K10 unterdrückt und die von K6 induziert (YANO *et al.*, 2004). Ähnliche Ergebnisse zeigen Verwundungsexperimente in Keratinozyten: K6, K16 und K17 werden hochreguliert (KIM *et al.*, 2006).

Des Weiteren sind die IFs auch in die Regulation von Schlüsselsignalwegen z. B. über das Adapterprotein 14-3-3 involviert. Sie transportieren Stress-induzierte Signalmoleküle, interagieren mit zellulären Überlebens-Signalen (PALLARI und ERIKSSON, 2006) und beeinflussen somit Zellzyklus, Proliferation und Apoptose (PARAMIO *et al.*, 1999; GILBERT *et al.*, 2001; TOIVOLA *et al.*, 2001; KU und OMARY, 2006).

Weiterhin sind IFs noch in zelluläre Signalwege involviert, indem sie als Substrat für multiple Phosphorylierungs-Reaktionen dienen (OMARY *et al.*, 2006). Die Phosphorylierung von Keratinfilamenten (KFs) soll als „Phosphorylierungsschwamm“ eine protektive Funktion gegen Stress darstellen (KU und OMARY, 2006).

IFs spielen weiterhin eine wichtige Rolle in der Koordination von mechanischen Kräften während der Embryonalentwicklung sowie beim Wachstum und der Reifung von spezifischen Geweben (CHEN und WANG, 2004).

Die Lamine bilden die nukleäre Lamina an der inneren Kernmembran und binden direkt an das Chromatin. Sie tragen zur Integrität und Form des Nukleus bei, assoziieren mit einer großen Anzahl an nukleären Proteinen, z. B. für die differenzierungsspezifische Regulatoren der Transkription, so dass sie die Genexpression über verschiedene Mechanismen beeinflussen können (ZASTROW *et al.*, 2004).

2.1.5. Intermediärfilament-assoziierte Proteine

Optimale Funktionalität und Integrität erhält das Zytoskelett durch die Verknüpfung der verschiedenen Bestandteile. Intermediärfilament-assoziierte Proteine (IFAPs) besitzen IF-Bindestellen und größtenteils auch Bindestellen für MF oder MT und verknüpfen diese funktionell miteinander. Je nach Zelltyp und IF-Typ existieren verschiedene IFAPs (COULOMBE und WONG, 2004; IZAWA und INAGAKI, 2006). Weiterhin können IFAPs den Auf- und Abbau der IFs regulieren (GODSEL *et al.*, 2008). Sie ermöglichen die laterale Bindung von IFs zu dicken Bündeln (Tonofibrillen) und verankern diese an Kern- und Plasmamembran. (STEINERT und ROOP, 1988). Vor allem die Mitglieder der Plakin-Genfamilie besitzen einen großen Einfluss auf die Gestaltung und Funktion von IF-Netzwerken. Alle Proteine der Plakin-Genfamilie besitzen Bindungseigenschaften für mindestens

zwei zytoskeletale Elemente und befestigen dadurch die IFs an Aktin, Mikrotubuli bzw. Adhäsionskomplexen (Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen; Abb. 9 B und C; SONNENBERG und LIEM, 2007). Differenzielles Spleißen der einzelnen Gene ermöglicht die zelltypspezifische Expression verschiedener Isoformen. Plakin-Gene besitzen alle eine gemeinsame Domänenorganisation: Der C-Terminus wird durch ein großes Exon kodiert, welcher die Sequenzen für die Bindungsstellen der IFs beinhaltet. Der N-Terminus bestimmt die subzelluläre Lokalisation, welche die Quervernetzung zwischen den verschiedenen Zytoskelett-Elementen ermöglicht, wie z. B. durch die Aktin-Binde-Domäne (ABD) oder die Mikrotubuli-bindende Region.

Plectin ist das größte Mitglied der Plakin-Genfamilie (530 kDa) und kommt in fast allen Zelltypen vor, hauptsächlich in Desmosomen und Hemidesmosomen, aber auch im Zytoplasma. Verschiedene Bindedomänen wie die ABD am N-Terminus, die durch zwei Calponin-Homologie-Domänen gebildet wird, oder die IF-Binddomäne am C-Terminus, ermöglichen die Verknüpfung mit β -Integrin, Aktin, Mikrotubuli und Desmoplakin (WICHE, 1998; Abb. 9 A). Verschiedene Plectin-Isoformen werden zelltypspezifisch hergestellt und vernetzen die unterschiedlichen Zytoskelett-Komponenten miteinander (Abb. 9 B und C).

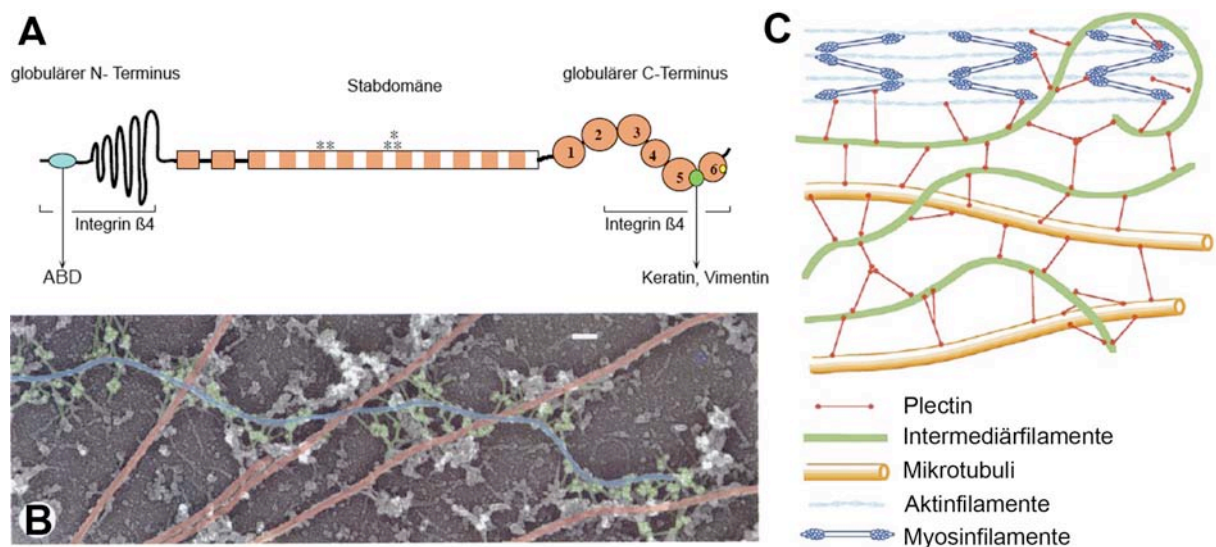


Abb. 9: Das Zytolinker Protein Plectin. (A) Domänen-Karte des Plectin-Moleküls. Die dreigeteilte Struktur besteht aus einer zentralen Stabdomänen und zwei globulären Domänen am N- und C-Terminus, die beide Bindungsstellen für Integrin β 4 besitzen. Die Domäne am C-Terminus besteht aus 6 homologen Wiederholungen und bindet IFs. Am N-Terminus befindet sich die ABD. Die Sternchen markieren Mutationsstellen, die zu einem vorzeitigen Stopp führen und in EBS-MD resultieren (verändert nach Wiche, 1998). (B) Verteilung von Mikrotubuli und Plectin. Digital nachträglich coloriertes EM-Bild mit Gold-markiertem Plectin (grün), welches IFs (blau) mit Mikrotubuli verbindet (rot). Aus Svitkina *et al.*, 1996. (C) Modell für Plectin-vermittelte Integration des Zytoskelettes. Plectin (rot) verbindet die IFs (grün) mit den MT (gelb), Myosine (orange) und MF (blau). Aus Fuchs, E. und Cleveland, 1998 nach Svitkina *et al.*, 1996 verändert.

Das Plectin-Gen besteht aus 32 Exonen, von den 14 alternativ gespleißt werden können (LIU *et al.*, 1996; FUCHS, P. *et al.*, 1999). Nach Zhang *et al.* (2004) besitzt das Plectin-Gen 11 variable Exone. Alle variablen Exone werden separat gespleißt und an das erste, konstante Exon angefügt, so daß verschiedene Isoformen entstehen. Es bestehen keine Sequenzähnlichkeiten oder konservierten

Motive zwischen den verschiedenen Isoformen, welche ebenfalls verschiedenen Promotoren besitzen (ZHANG *et al.*, 2004).

Plectin-defiziente Zellen weisen eine beeinträchtigte IF-Quervernetzung auf, sind empfänglicher für Stress-induzierte Zerstörung des Zytoskeletts durch hyperosmotischen Schock und weisen weiterhin Veränderungen in der Zellmigration und Signalweiterleitung auf (OSMANAGIC-MYERS *et al.*, 2006). Mutationen in der Stabdomäne des Plectin-Gens verursachen *Epidermolysis bullosa simplex* (EBS) mit assoziierter Muskeldystrophie (EBS-MD, siehe 2.2.1), da die Keratin-Hemidesmosomen-Verbindung defekt ist (CORDEN und MCLEAN, 1996). Dieser Effekt verdeutlicht die Bedeutung des funktionalen Zusammenspiels von Plectin und Intermediärfilamenten für die Zellintegrität.

2.1.6 Typ I und II Intermediärfilamente: Keratine

Keratine bilden die größte Gruppe der IFs und den größten Anteil der in Epithelien synthetisierten Proteine. Das menschliche Genom besitzt 54 funktionale Keratingene, die in zwei kompakten Genclustern lokalisiert sind (HESSE *et al.*, 2004; SCHWEIZER *et al.*, 2006). Des Weiteren sind zahlreiche, nichtfunktionale Pseudogene im gesamten Genom verteilt.

Typ I und II IF-Keratine repräsentieren 75% der IF-Gene und werden spezifisch in Epithelzellen synthetisiert (COULOMBE *et al.*, 2001). Die Keratinproteine werden paarweise, gewebsspezifisch und differenzierungsabhängig reguliert, so dass jedes Epithelgewebe ein spezifisches Keratin-Genexpressionsmuster besitzt (MOLL *et al.*, 1982; YAMADA *et al.*, 2002). Die unterschiedliche Expression der verschiedenen Keratine scheint die Funktion des Gewebes zu beeinflussen und von äußeren Faktoren (z. B. Stress) abhängig zu sein, so dass die Zellen sich durch die Herstellung unterschiedlicher Keratine an die Umgebung anpassen können, wie es z. B. während der Migration oder Wundheilung der Fall ist (PALADINI *et al.*, 1996; COULOMBE und WONG, 2004; KIM *et al.*, 2006). Die primäre Funktion der Keratine ist der Schutz von Epithelzellen gegenüber mechanischem und nicht-mechanischem Stress, welcher zum Zerreißen der Zelle und zum Zelltod führen kann. Die Verteilung und damit Reduktion von mechanischem Stress wird durch die Verbindung der Netzwerke über Plakinproteine der Desmosomen sowie der Verankerung in der extrazellulären Matrix und der Basalmembran erreicht (GREEN und SIMPSON, 2007; PEKNY und LANE, 2007). Die große Anzahl an erblichen Krankheiten, die zu einer abnormen Fragilität des Epithelgewebes führen und durch Mutationen den Keratingenen verursacht werden, unterstreicht die Bedeutung der KFs für die Hautintegrität (siehe 2.2.1).

Weitere, nicht-mechanische Funktionen der Keratine sind die Beeinflussung von Signaltransduktionswegen, die Modulierung der Proteinbiosynthese sowie die Generierung von Antworten auf pro-apoptotische Signale und die Beeinflussung von Zellgröße und Zellwachstum (OMARY *et al.*, 2004; GODSEL *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2006; KIM und COULOMBE, 2007). K8 und K18 schützen beispielsweise Leberhepatozyten vor Chemikalien, Drogen und apoptotischem Stress und ermöglichen spezifische Signalprozesse (OMARY und KU, 1997; KU *et al.*, 1998b).

Die ersten Keratinproteine werden bereits während der Embryogenese synthetisiert. Das Keratindimer K8 und 18 wird im Vierzell-Stadium und in allen Epithelien in der frühen Entwicklung hergestellt; später allerdings hauptsächlich in einfachen Epithelien: Leber, Pankreas, Nieren, Luftwege, Darm (OMARY *et al.*, 2002; PARAMIO und JORCANO, 2002; OWENS und LANE, 2003).

Weiterhin haben die KFs Einfluss auf die zytoplasmatische Organisation von Zellorganellen. Unter anderem interagieren sie mit Mitochondrien und bestimmen die Positionierung des Golgi-Apparats (TOIVOLA *et al.*, 2005). Mitochondrien in EBS-Keratinocyten sind abnormal verteilt, auch in Leberzellen von Keratin K8^{-/-} Mäusen ist die Verteilung der Golgi-Apparate verändert (UTTAM *et al.*, 1996). Darüber hinaus sind die KFs an der apikal-basalen Polarität in einschichtigen Epithelien beteiligt (ORIOLO *et al.*, 2007).

Die Beeinflussung des Zellzyklus und der Zellgröße über die Proteinbiosynthese wird anhand des Adapterproteins 14-3-3 deutlich: Während der Wundheilung bindet K17 14-3-3, welches die Serin-Threonin-Kinase mTOR aktiviert und somit die Proteintranslation und das Zellwachstum verstärkt (KIM *et al.*, 2006). 14-3-3 zählt zu den Keratin-assoziierten Proteinen (KaPs; COULOMBE und OMARY, 2002). Hierzu zählen ebenfalls querverbindende Proteine wie Filaggrin und Trichohyalin, welche die KFs in Epithelien (Filaggrin) und Haarfollikeln (Trichohyalin) bündeln (LEE *et al.*, 1993; COULOMBE *et al.*, 2000). Beide Proteine werden zunächst als Polyprotein-Vorläufer in zytoplasmatischen Granula aufbewahrt. Die Prozessierung und Aktivierung findet erst zu einem späteren Zeitpunkt während der Keratinocyten-Differenzierung statt, so dass Makrofibrillen entstehen (DALE *et al.*, 1978).

Über Plectin-vermittelte Interaktionen mit Nesprin3 werden KFs am Nukleus angeheftet (WILHELMESEN *et al.*, 2005). KaPs übernehmen aber nicht nur die Verknüpfung mit weiteren zytoskeletalen Proteinen zur Aufrechterhaltung der mechanischen Zellstabilität, sondern beeinflussen weiterhin die Filamentorganisation. Hitzeschockproteine binden beispielsweise über ihren C-Terminus an K18 und beeinflussen damit die Filamentorganisation von K8 und K18 (IZAWA *et al.*, 2000). K18 und K14 interagieren über die Stabdomäne mit dem Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor Typ 1- (TNFR1) assoziierten Todesdomänen-Protein (TRADD, *assoziierter death domain protein*) und beeinflussen damit die Apoptose über Caspase 8-Aktivierung (INADA *et al.*, 2001). Caspase-sensitive Schnittstellen befinden sich in der Linker-Region sowie am Ende der Stabdomäne und dienen der Zerstörung der Filamente (KU und OMARY, 2001).

2.1.6.1 Bildung und Dynamik von Keratinfilamenten

KFs weisen wie alle IFs eine dreigeteilte Struktur auf und polymerisieren spontan *in vitro* (siehe 2.1.4.2-4 sowie Abb. 6 und 8). Essentiell für die Bildung funktionaler KFs scheint die Kopfdomäne zu sein, da nach Deletion dieser Domäne keine Filamente sondern nur noch Tetramere gebildet werden (HATZFELD und BURBA, 1994; KREPLAK *et al.*, 2004). Für die Entstehung *in vivo* gibt es verschiedene Modelle. Da KFs zunächst als rein statische Gebilde betrachtet wurden und einen unpolaren Aufbau aufweisen, wurden Veränderungen im Netzwerk nur durch ein lateralen Austausch mit löslichen

Untereinheiten erklärt (MILLER *et al.*, 1991). Untersuchungen mit fluoreszierenden Keratinmolekülen offenbaren allerdings ein hochdynamisches und regulierbares Keratinnetzwerk mit einem stetigen Austausch zwischen Polymeren und löslichen Untereinheiten (OMARY *et al.*, 2006). So wird z. B. während der Mitose das Keratinnetzwerk komplett zu Keratingranula abgebaut. Nach der Zellteilung werden neue Filamente aus nicht-filamentösem Material am Zellkortex reorganisiert (WINDOFFER und LEUBE, 2001). Durch Inkubation mit Phosphataseninhibitoren kann in nicht-mitotischen Zellen ebenfalls eine Reorganisation des Keratinnetzwerkes induziert werden. Die Inkubation z. B. mit Okadarsäure führt zur irreversiblen Zerstörung des Keratinnetzwerkes ausgehend von der Zellperipherie (STRNAD *et al.*, 2001). Auch der Phosphataseinhibitor Orthovanadat verursacht einen Zusammenbruch des Keratinnetzwerkes und die Bildung von Keratingranula. Nach dem Auswaschen des Inhibitors werden ausgehend von den Keratingranula neue Filamente gebildet (STRNAD *et al.*, 2002). Windoffer und Leube (1999) beobachteten die Entstehung von diffusem fluoreszierendem Material in der Zellperipherie. Fluoreszenz-Zeitraffer-Aufnahmen von A-431-Zellen, die stabil HK13-GFP synthetisieren (AK13-1-Zellen), zeigen eine kontinuierliche Bewegung der KFs von der Zellperipherie in Richtung Zellzentrum (WINDOFFER und LEUBE, 1999; WINDOFFER und LEUBE, 2001). Kleine sphärische Keratinpartikel entstehen in enger Nachbarschaft zur Plasmamembran in der Zellperipherie von Epithelzellen und werden als Keratinfilamentvorläufer (KFP) bezeichnet (WINDOFFER *et al.*, 2004). Während ihrer Wanderung in Richtung Zellzentrum vergrößern sie sich zunächst und wachsen dann in die Länge zu longitudinalen Vorläufern, bis sie in das periphere Netzwerk integrieren. Ob es sich dabei um die Assoziation oder Aneinanderlagerung der *in vitro* beobachteten ULF-Untereinheiten handelt, bleibt weiterhin unklar. Bleichexperimente zeigten ebenfalls die Rückkehr von fluoreszierenden Molekülen zuerst an der Plasmamembran in der Zellperipherie. Das Keratinfilamentnetzwerk ist somit in der Lage, sich ausgehend von der Zellperipherie zu reorganisieren und damit dynamisch auf die jeweiligen Bedürfnisse der Zelle zu reagieren. Der genaue Mechanismus dieses postulierten Turnover-Modells ist aber weiterhin unbekannt.

Die Beweglichkeit der KFs ist abhängig von dem Aktin- sowie dem Mikrotubuli-Netzwerk. Zeitrafferaufnahmen von SW-13-abgeleitete SK8/18-2-Zellen, die K8 gekoppelt an CFP sowie K18 fusioniert mit YFP synthetisieren, offenbaren zwei verschiedene Keratinbewegungen: eine langsame und kontinuierliche Bewegung in Richtung des Zellinneren in der Zellperipherie und in Lamellipodien ($\sim 0,23 \mu\text{m}/\text{min}$) sowie eine schnelle, sprunghafte und bidirektionale Bewegung ($\sim 17 \mu\text{m}/\text{min}$) in axon-artigen Ausläufern. Durch selektive Zerstörung von MF und MT konnte der langsame Transport beruhend auf MF und der schnelle beruhend auf MT eingeordnet werden (WÖLL *et al.*, 2005). In *Xenopus*-Extrakten ist die IF-Polymerisation abhängig von F-Aktin und Mikrotubuli (GARD *et al.*, 1997; GARD und KLYMKOWSKY, 1998). Keratin- und Aktinfilamente bewegen sich zudem übereinstimmend in den *Xenopus*-Extrakten (WEBER und BEMENT, 2002) sowie in Enterozyten des

Darmes (WALD *et al.*, 2005). Auch Yoon *et al.* (2001) detektierten Keratin-Partikel im Aktin-reichen Zellkortex, die sich verlängern und in Richtung Zellinneres wandern (YOON, K. H. *et al.*, 2001).

Auf der Suche nach Organisationszentren für die Bildung der KFs wurden verschiedenste zelluläre Kompartimente vorgeschlagen. Adhäsionskontakte wie Desmosomen oder Hemidesmosomen (KNAPP *et al.*, 1983a; BOLOGNA *et al.*, 1986) oder der Nukleus (ECKERT *et al.*, 1982; ALBERS und FUCHS, 1987) wurden postuliert. Auch eine Entstehung im gesamten Zytoplasma (CELIS *et al.*, 1983; MAGIN *et al.*, 1990) oder an MF sowie MT (KNAPP *et al.*, 1983b; CELIS *et al.*, 1984) wurde vorgeschlagen. Aktuell wird der Aktin-reiche Zellkortex als Bildungsort der Keratine angesehen (siehe oben; YOON, K. H. *et al.*, 2001; WINDOFFER *et al.*, 2004).

An der Reorganisation der KFs sind ebenfalls das Zytolinkerprotein Plectin und das Adapterprotein 14-3-3 beteiligt. Orthovanat-induzierte Keratingranula in AK13-1-Zellen ko-lokalisieren mit Plectin ebenso wie Mitose-induzierte Keratingranula. Okadarsäure-induzierte Granula, die sich nicht wieder auflösen, ko-lokalisieren hingegen mit 14-3-3 und nicht mit Plectin. Plectin könnte somit als eine Befestigung für die Granula am Zytoskelett zur Verfügung stehen, da Plectin-positive Keratingranula unbeweglich im Vergleich zu den Okadarsäure-induzierten Granula sind (STRNAD *et al.*, 2001; STRNAD *et al.*, 2002).

2.1.6.2 Regulation und Modifikation von Keratinfilamenten

Posttranskriptionelle Veränderungen wie z. B. Phosphorylierung, Glykosylierung, Ubiquitylierung, Acetylierung und Transglutaminierung dienen der Regulation und Modifikation des Keratinnetzwerkes (COULOMBE und OMARY, 2002; COULOMBE und WONG, 2004; OMARY *et al.*, 2006; KIM und COULOMBE, 2007, siehe Tabelle 2). Phosphorylierung und Glykosylierung sind dynamische Modifikationen, die in der Kopf- und der Schwanzdomäne des Keratinmoleküls stattfinden (CHOU, C. F. *et al.*, 1992; LIAO *et al.*, 1995b). Diese beiden Domänen sind für die strukturelle Heterogenität verantwortlich und daher für die gewebespezifische Expression der verschiedenen Keratine zuständig. Am besten untersucht ist bisher die Bedeutung der Phosphorylierung von KFs, da Keratine während Zellstress, der Mitose oder in Hautkrankheiten hyperphosphoryliert sind (LIAO *et al.*, 1997; TOIVOLA *et al.*, 2002; RIDGE *et al.*, 2005; OMARY *et al.*, 2006). Eine Mutation des K18 am Serin52 nach Alanin (S52A) verhindert z. B. die Phosphorylierung an dieser Stelle und prädisponiert transgene Mäuse für hepatotoxische Verletzungen. Damit könnte der Phosphorylierung der KFs eine protektive Wirkung zugeschrieben werden (KU *et al.*, 1998b; TOIVOLA *et al.*, 2002). Die Mutation am Keratin K8 von Glycin61 zu Cystein (G61C) führt zu einer Inhibierung der K8-Phosphorylierung am Serin73, welche eine Zielstelle für die JNK- und p38-stressaktivierten Kinasen ist. Da transgene Mäuse mit dieser Mutation anfälliger für Leberverletzungen und Apoptose als Wildtypmäuse sind, vermuten die Autoren, dass Keratinfilamente die Gewebe vor Verletzungen schützen, indem sie als Phosphat-Schwamm dienen und damit Stress-induzierte Kinaseaktivitäten absorbieren (KU und OMARY, 2006). Zusätzlich zum Schutz gegen Zellstress wird vermutet, dass die Phosphorylierung der KFs die

Löslichkeit der Keratine beeinflusst sowie die Bindung der Keratine an weitere Zytoskelett-Proteine reguliert. 5% der Keratine K8 und K18 sind unter basalen Konditionen löslich (CHOU, C. F. *et al.*, 1993). Die Phosphorylierung an spezifischen Stellen im Molekül beeinflusst somit das Verhältnis der löslichen gegenüber dem zytoskeletalen Anteil der Keratine (OMARY *et al.*, 1998).

Die Keratinaggregate in Keratinozyten von EBS-Patienten sind ebenfalls hyperphosphoryliert und ubiquitinyliert. Stress-aktivierte Kinasesignalwege sind konstitutiv aktiv (RUSSELL *et al.*, 2004). Auch Mammakarzinon-abgeleitete MCF7-Zellen, die das mutierte Keratin 14R₁₂₅C gekoppelt an YFP synthetisieren, zeigen eine Ko-Lokalisierung der aktivierten p38 mit den mutierten Keratingranula (WÖLL *et al.*, 2005; WOLL *et al.*, 2007). P38 wird ebenfalls während der Mitose oder bei Zellstress, ausgelöst z. B. durch Hitze oder osmotischen Schock, rekrutiert und am konservierten Serin73 des K8 phosphoryliert. Die Hochregulation von p38 induziert die Bildung von Keratingranula; die Herunterregulierung von p38 hingegen verhindert den Abbau der KFs sowie der Keratingranula. Die Inhibierung von p38 hemmt ebenfalls die Bildung der KFPs. Zusammenfassend scheint die Phosphorylierung der Keratine ein Hauptmechanismus der Netzwerkorganisation zu sein (OMARY *et al.*, 2006).

Alle bekannten Phosphorylierungsstellen befinden sich entweder in Kopf- oder in der Schwanzdomäne der KFs (COULOMBE und OMARY, 2002), die Stellen in der Kopfdomäne sind essentiell für den Zusammenbau der IFs (INAGAKI *et al.*, 1990; GIBB *et al.*, 1996; GOHARA *et al.*, 2001; HERRMANN *et al.*, 2003; KREPLAK *et al.*, 2004). Die Phosphorylierungen erhöhen den Anteil an negativer Ladung, so dass Interaktionen der Kopfdomäne mit der negativ geladenen Stabdomäne verhindern werden. Der Kopf des Filamentes verbleibt in einer offenen Konformation, welches beim Abbau der Filamente zu Granula die Filamentstruktur verändert (WOLL *et al.*, 2007). Phosphorylierung an den beiden Enddomänen könnten zudem den IF-Zusammenbau regulieren, in dem der Gleichgewichtszustand des Untereinheiten austausches erhöht wird (OMARY *et al.*, 2006).

Die Phosphorylierung von KFs wird wahrscheinlich durch Glykosylierung beeinflusst (WELLS *et al.*, 2001). Diese besteht aus einer einzigen O-verknüpfte Acetyl-Glucosaminierung (O-GlucNAc), eine Monosaccharid-Veränderung an Serin- oder Threonin-Resten der KFs. Für K18 konnten drei Glykosylierungsstellen in der Kopfregion detektiert werden (KU und OMARY, 1995). Eine generelle Abnahme des durch O-GlucNAc-modifizierten Proteinmenge wird durch Behandlung mit Okadarsäure, einem unspezifischen Phosphat-inhibitor, erreicht (GRIFFITH und SCHMITZ, 1999). Über weitere Funktionen der Glykosylierung wird spekuliert, z. B. wird eine protektive Rolle gegen Degradierung oder eine subzelluläre Zielfindung vermutet (COULOMBE und OMARY, 2002).

Die Transglutaminierung ist eine weitere Modifikationsmöglichkeit der KFs. Sie verbindet verschiedene Typ II Keratine in der Epidermis mit Loricin, Involucrin und Envoplakin über einen hoch konservierten Lysinrest in der Kopfdomäne, um den sogenannten „*cornified envelope*“ in der Plasmamembran epithelialer Zellen zu stabilisieren (CANDI *et al.*, 1998).

Der Abbau von Keratinfilamenten wird ebenfalls durch zwei postranlationelle Modifikation reguliert: das Ubiquitin-Proteasom-System und das Caspasen-vermittelte Proteolyse-System (COULOMBE und OMARY, 2002). Zunächst wurden verdaute Keratinfragmente als Resultat von Proteolysen während der Apoptose detektiert (CAULIN *et al.*, 1997; KU *et al.*, 1997). Der Proteinabbau findet wahrscheinlich am carboxyterminalen Ende von allen Typ I Keratinen während der Apoptose an Caspase-spezifischen Konsensus-Erkennungssequenzen innerhalb der L12- Linkerdomäne statt (CAULIN *et al.*, 1997; KU und OMARY, 2001). Typ II Keratine werden nicht durch Caspasen verdaut, sie weisen auch keine Erkennungsmotive in der L12-Linkerregion auf (KU und OMARY, 2001).

Obwohl die Keratine relativ stabil sind und lange Halbwertszeiten besitzen, können sie schnell durch das Proteasom über Phosphorylierung und Ubiquitinylierung umgesetzt werden (KU und COULOMBE 2000). Der Abbau der Filamente erfolgt nach Ubiquitinylierung im Proteasom (KU und OMARY, 2000). Die Ubiquitinierung findet als Teil des normalen Proteasomen-vermittelten Turnovers der KFs statt und wird durch Keratinhyperphosphorylierung an bestimmten Stellen im Molekül inhibiert (KU und OMARY, 2000). Interessanterweise akkumulieren ubiquitinyierte Keratine zusammen mit Komponenten von *Mallory Bodies* (Einlagerungen im Zytoplasma von Leberzellen), wenn Proteasomen inaktiviert sind (DENK *et al.*, 2000; BENCE *et al.*, 2001).

Des Weiteren existieren Acetylierungen an N-terminalen Serinen und Modifikationen durch Lipide. Genaue Funktionen beider Mechanismen sind unbekannt (OMARY *et al.*, 1998).

Weitere Regulationsmöglichkeiten bestehen über die KaPs, wie z. B. die 14-3-3 Adapterproteinfamilie, die Hitzeschockproteinfamilie HSP70 oder das IFAP Periplakin (LIAO *et al.*, 1995a; LIAO und OMARY, 1996; LONG *et al.*, 2006). Die Phosphorylierung am Serin33 des K18 scheint über die Bindung von 14-3-3 reguliert zu sein (KU *et al.*, 1998a; OMARY *et al.*, 1998).

Tabelle 2: postranlationelle Keratinmodifikationen (verändert nach Omary *et al.*, 1998)

Modifikation	Keratin	Art oder Ort der Modifikation
Phosphorylierung	K1, K6, K8, K18	Serine, Theronine
Glykosilierung	K8, K18, K13 K19	O-GlcNAc-Serine
Acetylierung	epidermale Keratine	N-terminale Serine
Proteolyse	K18, K19	vermittelt über Caspasen
Transglutamination	K8, K18, K1, K10	<i>cross-linking</i>

2.1.7 Typ III Intermediärfilamente

Type III IFs können entweder Homo- oder Heteropolymere bilden. Vimentin kommt in allen mesenchymalen Zellen vor, Desmin ist das Haupt- IF-Protein der Muskelzellen und in den Z-Scheiben aller Muskeln lokalisiert und Peripherin wird im peripheren Nervensystem hergestellt (siehe Tabelle 1).

Vimentin und Peripherin werden wie die Typ I und II IF, die KFs, in der Zellperipherie gebildet (CHOU, Y. H. *et al.*, 2007). Untersuchungen mit GFP-gekoppelten Vimentin und Antikörperfärbungen offenbarten verschiedene Organisationsformen der Vimentin-Filamente. Es wurden nicht-filamentöse Partikel, kurze Filamente, die als *squiggles* bezeichnet werden, und längere, reife Filamente detektiert (PRAHLAD *et al.*, 1998; YOON, M. *et al.*, 1998). Die genauen Organisationsformen der Vimentinpartikel sind ungeklärt; es wird aber vermutet, dass sie aus Tetrameren oder ULFs aufgebaut sind. SOKOLOVA *et al.* (2006) zeigten, dass Vimentin-Tetramere *in vitro* lateral interagieren und Oktamere bilden. Vier Oktamere bilden dabei jeweils ein ULF. Die Vimentinfilamente sind meistens um den Kern orientiert; *squiggles* und Partikel befinden sich in der Peripherie. *Squiggles* bewegen sich in sich ausbreitenden Zellen bidirektional und verbinden sich Ende zu Ende (*end-to-end annealing*) oder fügen sich an ein bereits existierendes Filament an.

Die Behandlung mit Nocodazol führt zum Zusammenbruch des Vimentin-Netzwerks und zur Reorganisation der Filamente in perinukleäre Aggregate. Somit ist die Vimentin-Dynamik von Mikrotubuli-basierenden Motorproteinen wie Dynein und Kinesin abhängig (HELFAND *et al.*, 2002). Auch Peripherin existiert in kurzen Filamenten, Partikeln und *squiggles*, die sich Mikrotubuli-abhängig in der Zelle bewegen (HELFAND *et al.*, 2003a; HELFAND *et al.*, 2003b). Nach Behandlung mit neuronalen Wachstumsfaktoren differenzieren sich die neuronalen PC12-Zellen und die Partikel vergrößern sich zu *squiggles*, die zu längeren Fibrillen verschmelzen und neue Netzwerke etablieren (HELFAND *et al.*, 2003a). In neuronalen PC12-Zellen sind 30% der Peripherin-Partikel unbeweglich (CHANG *et al.*, 2006). Für diese stationären Peripherin-Partikel wurde ein ko-translationeller Mechanismus des Peripherin-Zusammenbaus beobachtet. FISH-Versuche (Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung) zeigten die Assoziation von Peripherin-mRNA mit Peripherin-Proteinprodukten. Diese ribonukleären Partikel (RNP) bewegen sich entlang von Mikrotubuli und sind transkriptionell inaktiv. Erst wenn der Bewegungsvorgang unterbrochen wird, beginnt die Translation. Nach vollendeter Proteinbiosynthese dissoziieren die Ribosomen und mRNA und Proteinpartikel entfernen sich unabhängig entlang von Mikrotubuli.

Vimentin- und Peripherin-Partikel weisen Geschwindigkeiten etwa zwischen 0,3 und 0,4 $\mu\text{m/s}$ auf, welches dem normalen Mikrotubuli-assoziierten Motortransport entspricht. *Squiggles* bewegen sich deutlich langsamer mit 0,06 und 0,3 $\mu\text{m/s}$ (PRAHLAD *et al.*, 1998; YOON, M. *et al.*, 1998; YOON, K. H. *et al.*, 2001; HELFAND *et al.*, 2003a; HELFAND *et al.*, 2004). Keratinvorläufer bewegen sich im Vergleich etwa 15-fach langsamer als Vimentin-*squiggles*, welches einem Aktin-abhängigen Transport entspricht (YOON, K. H. *et al.*, 2001).

Typ III IFs werden wie die KFs durch posttranslationelle Modifikationen reguliert. Desmin bildet in Muskelzellen ein dreidimensionales Netzwerk um die Z-Scheiben, welches die Myofibrillen mit dem Nukleus und Mitochondrien verbindet (BAR *et al.*, 2004; CAPETANAKI *et al.*, 2007). Die Phosphorylierung von Desmin stellt ebenfalls eine regulatorische Funktion dar (COLLETT *et al.*, 1980). Der N-Terminus von Vimentin besitzt mehrere Phosphorylierungsstellen, die wahrscheinlich den

Turnover zwischen den verschiedenen Vimentin-Organisationsformen regulieren, da die Phosphorylierung den Abbau zu Tetramer-Untereinheiten induziert (ERIKSSON *et al.*, 2004). Vimentin interagiert wie Keratin mit Signalmolekülen wie z. B. den MAP-Kinasen oder den Adapterproteinen 14-3-3 (KU *et al.*, 1998a), zudem assoziiert es mit Mitochondrien und dem Golgi-Apparat (STRAUBE-WEST *et al.*, 1996).

Gonzales *et al.* (2001) beschrieben die Assoziation von Vimentin-Filamenten mit FAs. Anscheinend beeinflusst die Organisation des Vimentin-Netzwerkes die Struktur der Adhäsionen: Mechanischer Stress verstärkt die Assoziation der Vimentinbündel mit den FKs, beim Knock-Down der Vimentin-Expression hingegen verkleinern sich die FAs (GONZALES *et al.*, 2001; TSURUTA und JONES, 2003).

2.2 Epidermale Keratinopathien

Den Intermediärfilamenten wurde erst größeres Interesse entgegengebracht, als man entdeckte, dass Punktmutationen in Keratingenen Hautkrankheiten verursachen, die zu schweren Zellschäden sowie zur Blasenbildung in der Haut von betroffenen Patienten führen (IRVINE und MCLEAN, 1999; TAKAHASHI *et al.*, 1999; Abb. 10 und 11). Im Folgenden werden zwei für die Arbeit relevante erbliche Hauterkrankungen näher vorgestellt, welche durch Mutationen in Keratingenen verursacht werden.

2.2.1 Epidermolysis bullosa simplex

Epidermolysis bullosa simplex localisata Weber-Cockayne (EBS; FUCHS, E., 1996) bezeichnet eine heterogene Gruppe von vererbten Krankheiten, bei der sich spontan oder durch leichte mechanische Traumata (z.B. Reibung) Hautblasen bilden (Abb. 10 A und A'). Die Ursache der Blasenbildung sind verschiedene Mutationen in der Stabdomäne von K5 und K14, welche hauptsächlich in basalen Keratinozyten hergestellt werden (Abb. 10 C). Die Enden der hoch konservierten Stabdomäne weisen Hotspot-Regionen für die Mutationen auf (Abb. 10 C, rot dargestellt; MCLEAN und IRVINE, 2007). Die Blasen werden durch die Zytolyse basaler Keratinozyten verursacht (IRVINE und MCLEAN, 1999). Patienten leiden vor allem durch die von den Blasen verursachten Wunden in allen Epithelien, welche schon durch minimalen Druck oder Reibung ausgelöst werden. Durch starke mechanische Beanspruchung sind Füße, Hände, Gelenke, Mund und Speiseröhre am stärksten betroffen (Abb. 10 A und A').

Die Expression der mutierten Keratine in Zellkulturzellen verursacht eine Aggregation der KFs. Abb. 10 B zeigt eine EBS-mutierte Zelle, welche nur ein noch perinukleäres Keratinnetzwerk ausgebildet. In der Peripherie befinden sich Keratingranula. Antikörperfärbungen mit einem anti-Keratin-AK in EBS-Patientenzellen zeigte ähnliche Ergebnisse (KITAJIMA *et al.*, 1989). Mäuse mit Keratin 14-Deletion entwickeln ebenfalls intraepidermale Blasen mit Keratinfilament-Aggregaten (VASSAR *et al.*, 1991). Die mutierten Bereiche sind somit als funktional essentiell für den Netzwerkzusammenbau der KFs anzusehen.

Besonders schwere Verläufe zeigt die EBS-Dowling-Meara (FUCHS, E., 1996). Ursache ist entweder eine Mutation im der Stabdomäne des Plectin-Genes oder eine Punktmutation in der ersten Windung (Coil 1 A) der K14-Stabdomäne des Codon 125: Die Aminosäure Arginin ist gegen Cystein oder Histidin ausgetauscht (CORDEN und MCLEAN, 1996). Patienten zeigen eine schwere Blasenbildung zusätzlich in den Schleimhäuten sowie eine Muskeldystrophie. Die EBS-Dowling-Meara manifestiert die Bedeutung der beiden Zytoskelett-Komponenten Keratin und Plectin für die Hautintegrität, da Mutationen in beiden Genen die gleichen Symptome auslösen.

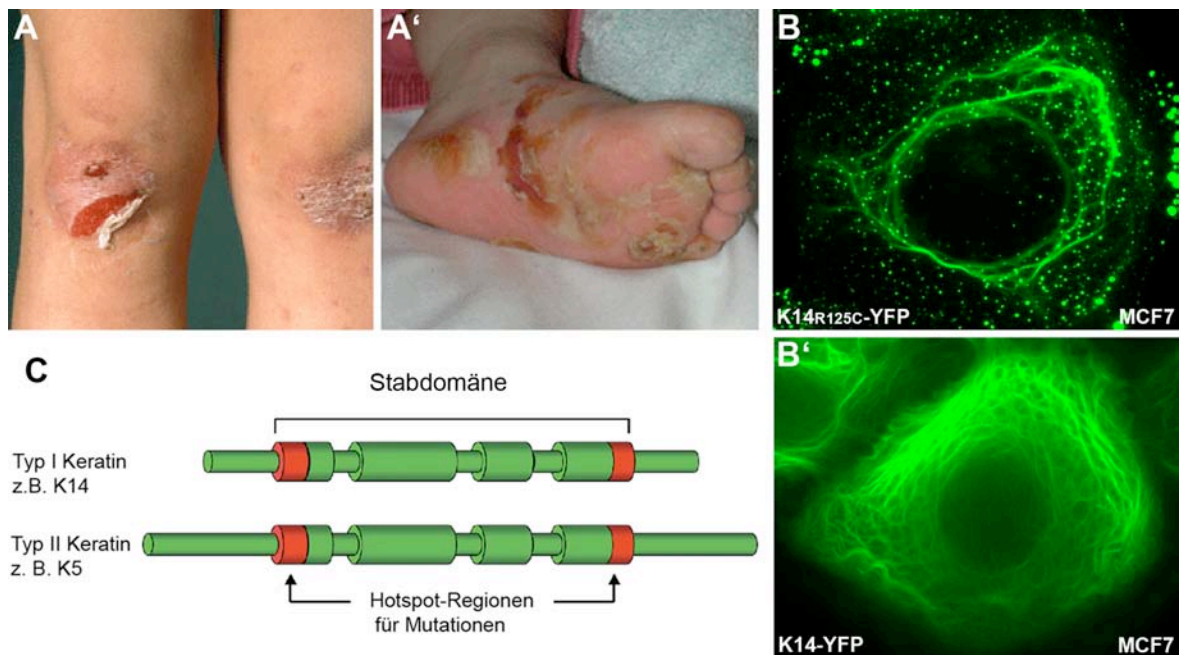


Abb. 10: Epidermolysis bullosa simplex (EBS). (A) Klinische Symptome wie Blasenbildung und Hautablösung am Knie (A) und Fuß (A') eines Patienten treten bei EBS auf. (B) MCF7-Zelllinien, die das mutierte K14 gekoppelt an YFP herstellen, weisen Keratingranula in der Zellerperipherie auf. (B') Das nicht-mutierte, YFP-markierte K14 besitzt hingegen ein normales, filamentöses Keratinnetzwerk. (C) Schema eines Keratindimers mit eingezeichneten Mutations-Hotspots am Anfang und Ende der Stabdomäne. (A) und (A') stammen aus <http://www.netzwerk.eb.de>, (C) verändert nach McLean und Irvine 2007.

2.2.2 Pachyonychia congenita

Pachyonychia congenita (PC) beschreibt eine Gruppe von meist autosomal rezessiv vererbten ektodermalen Abnormalitäten (Dysplasien), deren prominenter klinischer Befund eine Nagelhypertrophie ist. Es werden zwei klinische Subtypen nach phänotypischen Merkmalen und den verursachenden genetischen Mutationen unterschieden: Jadassohn-Lewandowsky-Typ (PC-1) und Jackson-Lawler-Typ (PC-2) (LEACHMAN *et al.*, 2005). Beide Krankheitsformen führen zur Ausbildung vergrößerter und ungleichmäßig geformter Finger- und Fußnägel (Abb. 11 B). Ursache sind Störungen in der Verhornung, die durch übermäßige Proliferation der Epithelzellen durch erhöhte Zytokinausschüttung ausgelöst werden (Dyskeratose; DE BERKER *et al.*, 2000).

PC-1 ist begleitet von schweren fokalen Keratodermen, meist an den Fußsohlen, welches den Patienten immense Schmerzen beim Laufen verursacht (Abb. 11 E). Außerdem treten orale

Leukoplasien (weiße Plaques in der Mundschleimhaut durch Verdickung des Plattenepithels) auf (Abb. 11 C). Verschiedene Mutationen in K6a oder K16 verursachen PC-1 (MCLEAN *et al.*, 1995). Die Häufigste tritt an der hoch konservierten Aminosäure Asparagin N171 von K6a auf (Abb. 11 A, G). Zum einen können drei Basenpaare (AAC) deletiert sein (Delta N171); zum anderen ist ein einzelnes Basenpaar ausgetauscht, welches in dem Aminosäureaustausch Asparagin nach Lysin resultiert (N171K). Damit wird ein Asparaginrest aus der helikalen Domäne 1A entfernt, welche beim Filamentzusammenbau eine essentielle Rolle spielt (BOWDEN *et al.*, 1995; SMITH *et al.*, 2005).

Bei PC-2 treten zusätzlich multiple subepidermale Zysten, verursacht durch Hyperkeratose in den Haarfollikeln und in den Talgdrüsen sowie manchmal natale Milchzähne auf. Die Nagelläsionen sind meist schwächer ausgeprägt als in Typ1-PC. PC-2 wird hauptsächlich durch Mutationen im K17, selten auch durch K6b-Mutationen verursacht (MCLEAN *et al.*, 1995; SMITH *et al.*, 2005).

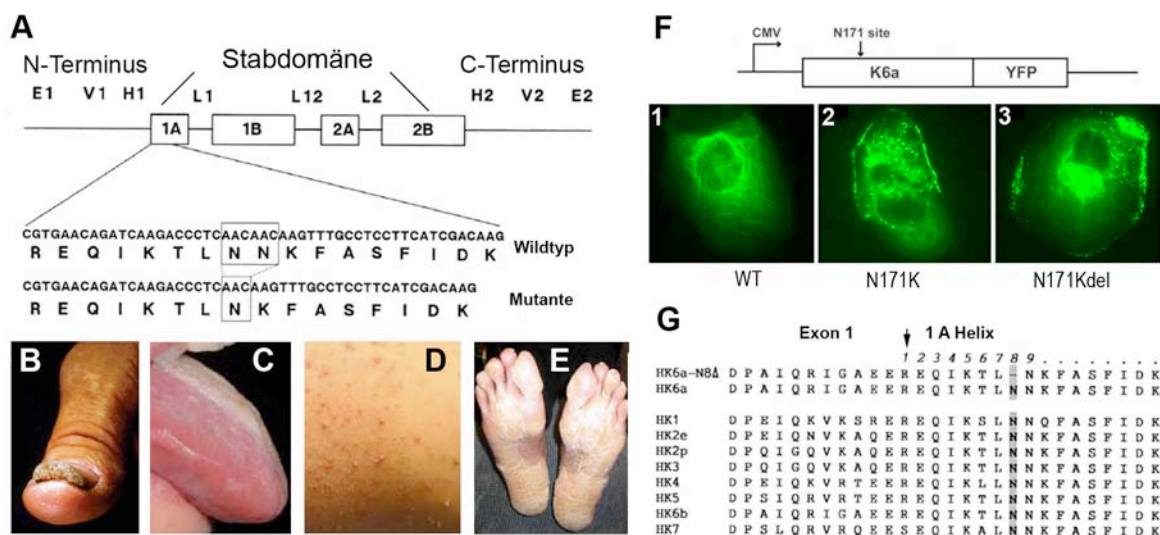


Abb. 11 Pachyonychia congenita. (A) Schematische Darstellung der K6a-Proteinstruktur mit den vier α -helikalen Domänen 1A, 1B, 2A und 2B, die durch Linker (L1, L12, L2) voneinander getrennt sind. In der Domäne 1A befindet sich eine drei Basenpaar-große Deletion im mutierten Allel des K6a Gens (AAC, siehe Kasten), im mutierten Protein fehlt die Aminosäure N8. (G) Aminosäuresequenz verschiedener Typ II-Keratine ab Beginn der 1A-Domäne. Die Asparagine N8 und N9 sind hoch konserviert, das Fehlen einer dieser Aminosäuren lässt eine Störung in der Bildung der α -Helix vermuten. (B) Hypertrophe Nageldystrophie ist das Markenzeichen von PC. (C) Orale Leukoplasien und Hautzysten (D) können ebenfalls auftreten, ebenso Hyperkeratosen am Fuß (E). (F) Humane PLC-Zellen, die mit DNA-Konstrukten, die für HK6a (F 1) oder den beiden mutierten Keratinen HK6aN171K (F 2) und HK6aN171del (F 3) fusioniert mit YFP transfiziert wurden, zeigen ein zerstörtes Keratinnetzwerk. (A und F) verändert nach Hickerson *et al.* 2006; (B) und (C) verändert nach Bowden *et al.* 1995 und (D-G) aus <http://www.pachyonychia.org>.

Nicht jeder PC-Patient weist alle Symptome auf, selbst Mitglieder einer betroffenen Familie können unterschiedliche Hautveränderungen ungleichen Ausmaßes zeigen. Die daraus folgenden Schwierigkeiten in der klinischen Diagnose von PC können durch genetischen Mutationscreens der betroffenen Keratingene definiert werden. K6a und K16 werden in Hand- und Fußsohlen, dem Nagelbett und im Wangen- und Zungenepithel exprimiert; K6b und K17 hauptsächlich in Talgdrüsen und Haarfollikeln (LEACHMAN *et al.*, 2005).

Transfektionen von Fusionskonstrukten, die mutierte K6a-Gene gekoppelt an das Reporter-gen YFP enthalten (Abb. 11 F), resultieren in der Bildung von Keratinaggregaten in Zelllinien. Abb. 11 F 1 zeigt das Wildtyp-K6a, Abb. 11 F 2 und 3 die beiden Mutanten N171K und N1717del. Hickerson et al. (2006) haben siRNA, deren Zielsequenz die Mutationsstellen von K6a in PC1 enthalten (N171K und N171delta), zusammen mit den oben genannten Fusionskonstrukten in Zellkulturzelllinien exprimiert und konnten die Inhibierung der mutierten mRNAs zeigen (HICKERSON *et al.*, 2006).

2.3 Zielsetzungen

In den letzten Jahren hat sich das Bild von den statischen IFs, die nur eine rein mechanische Unterstützung leisten, stark verändert. Dazu hat vor allem beigetragen, dass zahlreiche Erbkrankheiten mit Mutationen in IF-Genen in Verbindung gebracht wurden. Inzwischen ist anerkannt, dass sich IF-Netzwerke hochdynamisch verhalten: IFs zeigen einen kontinuierlichen Austausch mit löslichen Untereinheiten, sie interagieren mit anderen Zytoskelett-Systemen und Signalmolekülen und sind weiterhin reguliert durch Phosphorylierung und andere postranslationale Modifizierungen. Diese Eigenschaften ermöglichen es den IFs, auf Veränderungen wie z. B. Stress zu reagieren. Die genauen Mechanismen zur Entstehung von IF-Netzwerken bleiben aber weiterhin ungeklärt. In der vorliegenden Dissertation sollten Typ I, II und III IFs zell- und molekularbiologisch sowie proteinbiochemisch untersucht werden. Für die Anfertigung von hochauflösenden Lebendzellaufnahmen sollten verschiedene stabile Zellklone hergestellt werden, welche fluoreszierende Keratine synthetisieren. Folgende Ziele wurden zur Aufklärung der Entstehung und Dynamik von IFs formuliert:

A) Wo werden die KFs gebildet? Gibt es einen definierten Ort in der Zellperipherie, der die Entstehung von KFPs beeinflusst? Wie werden diese transportiert?

B) Wie erfolgt der Umsatz des Keratinnetzwerkes? Wie werden KFs auf- und wieder abgebaut?

C) Besitzen Zytolinkerproteine wie Plectin einen Einfluss auf die Netzwerkbildung der KFs?

D) Wie werden die dynamischen Eigenschaften von IF-Netzwerken reguliert?

E) Werden Typ III IFs ebenfalls in der Zellperipherie gebildet? Weisen sie die gleichen dynamischen Eigenschaften wie Typ I und II IFs auf?

F) Wie verhalten sich mutierte Keratine der Hautkrankheit Pachyonychia congenita im Vergleich zu nicht-mutierten Keratinen? Werden andere Zytoskelett-Komponenten von der Mutation beeinflusst?

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Geräte

Gerät/Typ	Bezugsquelle
1°C Freezing Cryocontainer	Nalgene Cryo, Rochester (USA)
Autoklav/Varioklav Typ 400	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Bakterienschüttler/Certomat R	B. Braun Biotech, Melsungen
Blotkammer/Transblot SD	BioRad, München
Destillator	Milli-Q Millipore, Billerica (USA)
Eismaschine	AF-10 Scotsman, Gießen
Heizblock/Blockthermostat BT100	Kleinfeld Labortechnik
Elektrophoresekammer	Sigma-Aldrich, München
Elektroporationsgerät/Gene Pulser II	BioRad, München
Fluoreszenzmikroskop/Axiophot I	Carl Zeiss, Jena
Fluoreszenzmikroskop/IX-70 s	Olympus, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop Axiovert	Carl Zeiss, Jena
Geldokumentation Image Master VDS	GE Healthcare (Pharmacia), München
Homogenisator (Glas)	Hartenstein, Würzburg
Kamera Axiophot/C4742-95	Hamamatsu, Herrsching
Kamera Olympus/IMAGO	Till Photonics, München
Kühlschrank	Premium Liebherr, Ochsenhausen
Laminarflow Sterilwerkbank Microflow	Nunc, Rochester (USA)
Laser Scanning Mikroskop SP5	Leica, Bensheim
Light-Cycler iQ™	BioRad, München
Magnetheizrührer/IKA Kombimag-Ret	Janker & Kunkel, Staufen
Micropipette Puller/Model P-87	Sutter Instruments Co. Novato (USA)
Mikroskop/DMI 6000 CS Trino	Leica, Darmstadt
Netzteil/Power Pac 300	BioRad, München
PAGE System Mini Protean II/III	Roth, Karlsruhe
PCR Gerät/Primus 96	MWG Biotech, Ebersberg
PCR Gerät/Primus 96 advanced	peqlab, Erlangen

Tabelle 3: Verwendete Geräte (Fortsetzung)

Gerät/Typ	Bezugsquelle
pH-Meter pH530	WTW, Weilheim
Photometer/Ultaspec 2000 UV	GE Healthcare (Pharmacia), München
Präzisionswaage/LC 2434	Sartorius, Göttingen
Präzisionswaage/LC 4801	Sartorius, Göttingen
Röntgenkassetten	Angewandte Gentechnologie, Heidelberg
Rotationsschüttler/RFR-2000	Heidolph, Schwabach
Shutter Mikroskop/Uniblitz VMM-D1	Vincent Associates, Rochester (USA)
Stickstofftank GT40	Air Liquide, Düsseldorf
Überkopfschüttler/RL-2M Intelli Mixer	ELMI Lab. Equipmet, Riga (Lit.)
Ultrazentrifuge	Kontron, Eching
Vortexer/Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Wasserbad	Bioblock Scientific, Freckendorf
Zeichenbrett A3/Digitizer 2 UD-1218	WACOM, Krefeld
Zellkultur-Inkubator	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge/Biofuge Fresco	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge/Megafuge1 OR	Heraeus Instruments, Hanau

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Bezugsquelle
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose NuSieve GTG Agarose LE	Biozym, Hessisch Oldendorf
Accutase	PAA, Pasching
AgNO ₃	Merck, Darmstadt
Ammonium-Persulfat (APS)	Sigma-Aldrich, München
Bacto-Agar Becton	Dickinson, Heidelberg
Bacto-Trypton Becton	Dickinson, Heidelberg
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Reagenzien (Fortsetzung)

Chemikalie	Bezugsquelle
Coomassie Brilliant Blau R 250	Serva, Heidelberg
Cumarsäure	Fluka, München
Digitonin	Sigma-Aldrich, München
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
Doxyzyklin	Sigma-Aldrich, München
DTT (Dithiothreitol)	Merck, Darmstadt
EDTA (Ethyldiamin-Tetraessigsäure)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, München
Glycerol	Serva, Heidelberg
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hanks-Salzlösung (HBSS)	Invitrogen, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Imidazol	Sigma-Aldrich, München
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
KCl	Fluka, München
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe
KH_2PO_4	Roth, Karlsruhe
Luminol	Fluka, München
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Mowiol	Sigma-Aldrich, München
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
NaCl	Roth, Karlsruhe
NaOH	Roth, Karlsruhe
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, München

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Reagenzien (Fortsetzung)

Chemikalie	Bezugsquelle
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
N-Acetyl-L-Cystein	Sigma-Aldrich, München
N,N-bis-[2hydroxyethyl]-2-aminoethansulfonsäure (BES)	▫ Sigma-Aldrich, München
N-Lauroyl-Sarkosin	Sigma-Aldrich, München
Nonidet P-40 (NP-40)	Fluka, München
nicht-essentielle Aminosäuren	Invitrogen, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phosphorsäure	Merck Darmstadt
Phenylmethylsulfanylfluorid (PMSF)	Merck, Darmstadt
Polyethelenglycol 50% (PEG)	Roche, München
Polyvinylalkohol (Mowiol 4-88)	Fluka, München
Ponceau-S	Roth, Karlsruhe
Rinderserum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München
Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30% (29:1)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Sorbitol	Roth, Karlsruhe
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Tris-Base	Roth, Karlsruhe
Triton-X 100	Sigma-Aldrich, München
Trockenmilchpulver	Töpfer, Dietmannsried
Trypsin	Sigma-Aldrich, München
Tween-20	Merck, Darmstadt

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Verwendete Gebrauchswaren

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
0,5 ml-; 1,5 ml-; 2 ml-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
24-Loch; 96-Loch Platten	Nunc, Rochester
2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml serologische Pipetten	Cellstar Greiner Bio-One, Frickenhausen
35x10 mm, 60x15 mm, und 100x20 mm Zellkulturschalen mit Nocken	Cellstar Greiner Bio-One Frickenhausen, Frickenhausen
Superplate 96-Loch PCR	ABgene, Hamburg
BioMax Light-1, 18x24 cm	Kodak, Rochester, New York (USA)
Bottletopfilter SFCA 0,2 µm	Nalgene, Rochester (USA)
Bottletopfilter SFCA 0,45 µm	VWR, Darmstadt
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One
Deckgläser für die Mikroskopie 16 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Entwickler LX 24	Kodak, Rochester, New York (USA)
Elektroporationsküvetten Genpulsar II	BioRad, München
Glaskapillaren GB 100F-10	Science Products, Hofheim
Glasbodenschale 35x14 mm	MadTek Cultureware Ashland (USA)
Glaswaren	Duran Schott, Mainz
Fixierer	Kodak, Rochester, New York (USA)
Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München
Nitrocellulose Optitran BA-S83	Schleicher & Schuell, Brentford (UK)
Objektträger 24x32 mm	Roth, Karlsruhe
Parafilm „M“	Pechiney Plastic, Chicago, USA
Pasteurpipetten	Roth, München
PCR-Reaktionsgefäße	ABgene, Hamburg
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Plättchenständer	CTI, Wiesbaden
Whatman-Papier CB002 Gel Blotting Papier	Schleicher & Schuell, Brentford (UK)
Zellkulturflaschen, Filter-top	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen	Sarstedt, Nürnbrecht

3.1.3 Software

Tabelle 6: Verwendete Software

Software	Hersteller
Amira 4	Indeed Visual Concepts, Berlin
Chromas V.1.4.5	Conor McCarthy, Southport (Australia)
Clone Mangager Suite 7	Sci Ed Central Cary, (USA)
Image Pro Plus V5	Media Cybernetics, Silver Spring (USA)
Leica LAS-AF	Leica, Wetzlar
Mac Clade V4.08	Maddison and Maddison, Sunderland, Massachusetts, (USA)
Photoshop CS2, V.8.0.1	Adobe, San Jose (USA)
TILLvisION	Till Photonics, Gräfeling

3.1.4 Kits

Tabelle 7: Verwendete Kits

Kit	Bezugsquelle
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	peqlab, Erlangen
RetroX System	BD Clontech, Heidelberg
RNeasy™ Tissue Kit	Qiagen, Hilden
SuperSignal West Pico Chemiluminescent	Perbio Science (Pierce), Bonn
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

3.1.5 Enzyme

Tabelle 8: Verwendete Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
ABgene Reverse-iT™ RTase Blend	Epsom, Hamburg
Benzonase	Merck, Darmstadt
Finnzymes, Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase	NEB, Frankfurt
NEB Antartic Phosphatase	NEB, Frankfurt
NEB Quick Ligase	NEB, Frankfurt
Proteinase K	Sigma-Aldrich, München

Tabelle 8: Verwendete Enzyme (Fortsetzung)

Enzym	Bezugsquelle
Restriktionsendonukleasen	NEB, Frankfurt und MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Taq DNA-Polymerase	VWR, Darmstadt
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
SYBR® Green Fluophor Taq DNA-Polymerase	BioRad, München

3.1.6 Antibiotika

Tabelle 9: Verwendete Antibiotika

Antibiotika	Stammlösung	Arbeitskonzentration	Bezugsquelle
Ampicillin	100 mg/ml	100-150 µg/ml	Sigma-Aldrich, München
Chloramphenicol	34 mg/ml (in Ethanol)	25 µg/ml	Sigma-Aldrich, München
Geneticin (G-418)	100 mg/ml	100–1000 µg/ml	Sigma-Aldrich, München
Kanamycin	20 mg/ml	50-60 µg/ml	Sigma-Aldrich, München
Tetracyclin/Doxycyclin	10 mg/ml	12,5 µg/ml	Sigma-Aldrich, München
Penicillin/Streptomycin (100 x)	10000 U Penicillin 10 mg/ml Streptomycin	1% (v/v)	Gibco™, Karlsruhe
Zeocin	100 µg/µl	100–1000 µg/ml	Sigma-Aldrich, München

3.1.7 Drogen und Reagenzien

Tabelle 10: Verwendete Drogen und andere Reagenzien

Droge	Stammlösung	Arbeitskonzentration	Bezugsquelle
Cycloheximid	1 mg/ml	17 µM	Sigma-Aldrich, München
Cytochalasin D	1 mM in DMSO	1 µM	Sigma-Aldrich, München
4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)	500 µg/ml	0,1 µg/ml	Boehringer-Mannheim (Roche), München
Latrunculin B	1 mg/ml	30 µM	Sigma-Aldrich, München
MG-132	20 mg/ml in DMSO	50 µg/ml	VWR, Darmstadt
Nocodazol	10 mM in DMSO	100 µM	Sigma-Aldrich, München
Phalloidin Texas Red	200U/ ml in Methanol	1:50	Invitrogen, Karlsruhe
PMSF Phenylmethylsulfonylfluorid	100 µg/ ml	0,1 mM	Merck, Darmstadt
Puromycin	1 mg/ml	3 µg/ml	Sigma-Aldrich, München
SB 201290	10 mM in DMSO	100 µM	Sigma-Aldrich, München

3.1.8 Antikörper

Tabelle 11: Verwendete Primär-Antikörper

Primär-Antikörper und laborinterne Bezeichnung	Spezies	Antigen	WB	IF	Bezugsquelle
10F6 (mc 72)	Maus	Plectin (Roddomäne)	-	1:50	G. Wiche, Wien Foisner <i>et al.</i> , 1994
α - Desmoglein2 (rb 88)	Kaninchen	Desmoglein2 (C-Terminus)			B. Holthöfer, Mainz (Doktorarbeit)
α - Desmoplavkin-Mix (mc 28)	Maus	Desmoplakin	-	unverdünnt	Cowin <i>et al.</i> , 1985
α - FAK (rb 99)	Kaninchen	fokale Adhäsionskinase	-	1:100	Biosource
α - FAK pY ³⁹⁷ (rb 100)	Kaninchen	FAK Y ³⁹⁷	1:1000	1:100	Biosource
Keratin-pan (gp 26)	Meerschweinchen	Zytoskelett-Extrakt (Rind)	1:2000	1:100	Progen
TROMA1 (rb 3)	Ratte	Keratin 8	1:100	1:10	Kemler <i>et al.</i> , 1981
L2A1 (mc 100)	Maus	Keratin 8/18 total	1:1000	1:100	M. Omary, Stanford Chou und Omary, 1991
Lim2 (rb 114)	Kaninchen	Plectin 1 (N-Terminus)	-	1:100	A. Maatta Durham
Lim5 (rb 115)	Kaninchen	Plectin 1F (N-Terminus)	-	1:100	A. Maatta Durham
P1 (mc 108)	Maus	Plectin (Roddomäne)	-	1:200	T. Magin, Bonn Schroder <i>et al.</i> , 1999
α - Paxillin (mc 114)	Maus	Paxillin	1:7000	1:100	BD Transduction Lab.
α - Phospho- p38 MAPK (rb 87)	Kaninchen	p38-MAPK	1:1000	1:100	Cell Signalling
α - Talin Klon 8D4 (mc 110)	Maus	Talin	-	1:100	Sigma-Aldrich, München
α - β -Tubulin (mc 27)	Maus	β -Tubulin	-	1:200	Amersham Biosciences

Tabelle 12: Verwendete Sekundär-Antikörper

Sekundär-Antikörper	Spezies	WB	IF	Bezugsquelle
Cy3- α - Kaninchen-IgG F(ab') ₂	Esel	-	1:200	Jackson/Dianova
Cy3- α - Maus-IgG	Ziege	-	1:300	Rockland/Biotrend
Cy3- α - Meerschweinchen-IgG F(ab') ₂	Ziege	-	1:144	Jackson/Dianova
Cy2- α - Kaninchen	Ziege	-	1:50	Jackson/Dianova

Tabelle 12: Verwendete Sekundär-Antikörper (Fortsetzung)

Sekundär-Antikörper	Spezies	WB	IF	Bezugsquelle
Cy2- α - Maus-IgG	Ziege	-	1:50	Rockland/Biotrend
Cy2- α - Meerschwein IgG	Ziege	-	1:50	Jackson/Dianova
TxR- α - Maus-IgG F(ab') ₂	Ziege	-	1:100	Jackson/Dianova
TxR- α - Kaninchen-IgG	Ziege	-	1:50 - 1:200	Jackson/Dianova
AMCA- α - Maus	Ziege	-	1:30	Jackson/Dianova
HRP- α - Kaninchen-IgG	Ziege	1:2000	-	Jackson/Dianova
HRP- α - Maus-IgG	Ziege	1:4000	-	NEB
HRP- α - Meerschweinchen	Ziege	1:4000	-	Jackson/Dianova

3.1.9 Oigonukleotide und Nukleinsäuren

Sämtliche Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) in der Qualitätsklasse „HPSF“ (hochrein, salzfrei) bezogen.

Tabelle 13: Verwendete Nukleinsäuren

Nukleinsäuren	Bezugsquelle
dNTSPs	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
SYPER [®] Green Fluophor dNTPS	Bio-Rad, München

Tabelle 14: Verwendete Klonierungsprimer

Klonierung von mRFP-Aktin

Primer Bezeichnung	Sequenz
03-88 <i>vorwärts</i>	5'- AGA TCC GCT AGC CGA TAA GGA TCC GAT GGC C -3'
03-89 <i>rückwärts</i>	5'- AGC TCG AGA TCT GGC GCC GGT GGA GTG GC -3'

Klonierung von TER-mRFP

Primer Bezeichnung	Sequenz
03-88 <i>vorwärts</i>	5'- AGA TCC GCT AGC CGA TAA GGA TCC GAT GGC C -3'
05-60 <i>rückwärts</i>	5'- AGC TCG TCT AGA TTA GGC GCC GGT GGA GTG -3'

Klonierung von Plectin 1E und 1F

Primer Bezeichnung	Sequenz
08-06 <i>rückwärts</i>	5'- GTG GAT CCT GAT CCT GCA CGT CCG GCA C-3'

Klonierung von HK14

Primer Bezeichnung	Sequenz
00-52 <i>vorwärts</i>	5'- AAA AAG CTT ATG ACT ACC TGC AGC CGC CAG -3'
00-53 <i>rückwärts</i>	5'- AAA GGA TCC GGG TTC TTG GTG CGA AGG ACC TG -3'

Klonierung von Peripherin

Primer Bezeichnung	Sequenz
07-70 <i>vorwärts</i>	5'- CTG GTA CCG GTC CGG AAT TCC -3'
07-97 <i>rückwärts</i>	5'- CGG ATC CCA GTA GCT GTG AAT AGA AGA CTT G -3'

Tabelle 15: Verwendeter Primer für Reverse- Transkriptase-PCR

Primer Bezeichnung	Sequenz (V = not T)
Primer Poly-dT- Adapter Oligo	5'- GAC TCG AGT CGA CAT CGA TTT TTT TTT TTT TTT TV -3

Tabelle 16: Verwendete Sequenzierungsprimer

Primer Bezeichnung	Sequenz
107 <i>vorwärts</i> : Sequenzierung der shRNA Konstrukte	5'- GTG TCA CTA GGC GGG AAC AC -3'
484 <i>rückwärts</i> : Sequenzierung der shRNA Konstrukte	5'- GGC GGG CCA TTT ACC GTA AG -3'
98-02 <i>rückwärts</i> : Sequenzierung von Plasmiden beginnend am fluoreszierenden Protein	5'- CAG CTC GAC CAG GAT GGG CA -3'
98-47 <i>vorwärts</i> : Sequenzierung von Plasmiden beginnend am Ende des CMV Promotor	5'- ATT GAC GCA AAT GGG CGG TA -3'
98-32 <i>vorwärts</i> : Sequenzierung von Plasmiden beginnend am Ende des fluoreszierenden Proteins	5'- GAT CAC ATG GTC CTG CTG GA- 3'
pLNCX2 <i>vorwärts</i> : Sequenzierung von retroviralen Plasmiden	5'- AGC TGG TTT TAG TGA ACC GTC AGA TC- 3'
pLNCX2 <i>rückwärts</i> : Sequenzierung von retroviralen Plasmiden	5'- ACC TAC AGG TGG GGT CTT TCA TTC CC-3'
pLXSN <i>vorwärts</i> : Sequenzierung von retroviralen Plasmiden	5'-CCC TTG AAC CTC CTC GTT CGA CC-3'
pLXSN <i>rückwärts</i> : Sequenzierung von retroviralen Plasmiden	5'-GAG CCT GGG GAC TTT CCA CAC CC-3'

Tabelle 17: Verwendete Primer für Real-Time-PCR der verschiedenen Plectin-Isoformen

Primer Bezeichnung	Sequenz
07-71 Plectin Exon 4 rückwärts	5'- ATT CTG CAG CTT GTG GAA CG -3'
07-73 Plectin 1 vorwärts	5'- TGC CTG CTA CCA CCA G -3'
07-74 Plectin 1e vorwärts	5'- ATC CAG AAC GAG ATC AGC -3'
07-75 Plectin 1f vorwärts	5'- TTC ATC CAG GCC TAC GAG G -3'
07-76 Plectin 1e GFP vorwärts	5'- GCC AAG CTT CAG ACA TGG ACC CCT CG -3'
07-77 Plectin 1k GFP vorwärts	5'- GCC AAG CTT CCG GCA TGG CCG GCC CGC TG -3'
07-72 Plectin Exon 8 GFP rückwärts	5'- GCG GAT CCG ATC CTG CAC GTC CGG CA -3'

Primer Info durch Arto Maata, School of Biological and Biomedical Sciences, University of Durham.

Positionen der Primer im Alingment im Anhang.

Tabelle 18: Verwendete Primer für die Real-Time-PCR (Positiv-Kontrollen)

Primer Bezeichnung	Sequenz
05-29 GAPDH (human) vorwärts	5'- CAA TGA CCC CTT CAT TGA CC -3'
05-30 GAPDH (human) rückwärts	5'- CAG TGG ACT CCA CGA CGT AC -3'
05-31 GAPDH (murin) vorwärts	5'- ATG AG CCC TTC CAC AAT G -3'
05-32 GAPDH (murin) rückwärts	5'- TCC ACT CAC GGC AAA TTC -3'

3.1.10 Bakterienstämme

Tabelle 19: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	F'xTn10 proA+B+lacIq Δ (lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96(Nalr)thi hsdR17 (rKmK+) supE44relA1 lac	Stratagene, La Jolla, USA
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F-phi80dlacZΔ (lacZYA-arg F) U169 deoR recA1 hsdR17 phoA Sup E44 λ -thi-1 gyrA96 relA1	Invitrogen Life Techn., Karlsruhe
<i>Escherichia coli</i> GM2163	F-dam-13::Tn9 (Camr) dcm-6 hsdR2 (rk-mk+) leuB6 hisG4 thi-1 araC14 lacY1galK2 galT22 xylA5 mtl-1 rpsL136 (Str')fhuA31 tsx- 78 gln/44 mcrA mcrB1	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

3.1.11 Zelllinien

Tabelle 20: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Ursprung/Zelltyp	exprimiertes Konstrukt	Herkunft
Caco-2	<i>Homo sapiens</i> , Colon- Adenocarcinoma	-	W. Franke, Heidelberg ACCC HTB-37
EpH4	<i>Mus musculus</i> , Brustdrüsenepithel	-	H. Beug, Wien Fialka <i>et al.</i> , 1996
MCF7	<i>Homo sapiens</i> , Brustdrüsen- Adenokarzinom	-	ATCC HTB-22 Soule <i>et al.</i> , 1973
MT5K14-26	<i>Homo sapiens</i> , Brustdrüsen- Adenokarzinom	HK14 _{R125C}	N. Werner, Bonn Werner <i>et al.</i> , 2004
PC12	<i>Rattus norvegicus</i> , adrenerges Phäochromozytom	-	V. Huttner, Dresden ATCC CRL-1721
PK18-5	<i>Homo sapiens</i> , hepatozelluläres Karzinom	HK8-YFP	P. Strnad, Mainz Strnad <i>et al.</i> , 2002
PLC	<i>Homo sapiens</i> , hepatozelluläres Karzinom	-	Alexander <i>et al.</i> , 1976 ATCC CRL-8024
SW-13	<i>Homo sapiens</i> , Nebennierenrinde- Karzinom	-	ATCC CCL-105 Leibovitz <i>et al.</i> , 1973
SK8/18-2	<i>Homo sapiens</i> , Nebennierenrinde- Karzinom	HK8-CFP; HK18-EYFP	S. Wöll, Mainz Wöll <i>et al.</i> , 2005

3.1.12 Plasmide und Vektorkonstrukte

Die „Living Colors® Fluorescent Proteins“ Vektoren der Fa. Clontech wurden in dieser Arbeit für die Expression von FP-Fusionsproteinen in Säugerzellen verwendet. Die Fusion der zu untersuchenden Zytoskelett-Proteine erfolgte dabei meistens am N-Terminus des fluoreszierenden Proteins (FP). Alle Vektoren besitzen Resistenzgene zur Selektion in Prokaryoten (Kanamycin) und in Säugerzellen (G-418/Geneticin); dies ermöglicht die Vermehrung der Plasmide in Bakterien und die Herstellung von stabilen Zelllinien. Für die retrovirale Transfektion von Säugerzellen wurden die Retro-X Vektoren aus dem Retor-XTm- System (Clontech) benutzt; diese besitzen eine Amipicillin- Resistenz zur Selektion in Prokaryoten und eine G-418/Geneticin- Resistenz zur Selektion in Säugerzellen.

Tabelle 21 listet die verwendeten FP-Klonierungsvektoren auf, Tabelle 22 die daraus hervorgegangenen Plasmide.

Tabelle 21: Verwendete Klonierungsvektoren und Plasmide

Vektor	Beschreibung	Ursprung
pEYFP-N1	Enhanced Yellow Fluorescent Protein	Clontech Bioscience, Palo Alto, CA
pECFP-N1	Enhanced Cyan Fluorescent Protein	Clontech Bioscience, Palo Alto, CA
pmRFP-N1	Monomeric Red Fluorescent Protein	Stefan Wöll, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
pLXSN	Retroviraler Expressionvektor	Clontech Bioscience, Palo Alto, CA

Tabelle 21: Verwendete Klonierungsvektoren und Plasmide (Fortsetzung)

Vektor	Beschreibung	Ursprung
pLNCX2	Retroviraler Expressionsvektor	Clontech Bioscience, Palo Alto, CA
pPA-GFP-C1	Photoaktivierbares GFP	George Patterson, Patterson und Lippincott-Schwartz, 2002
pPA-GFP-N1	Photoaktivierbares GFP	George Patterson, Patterson und Lippincott-Schwartz, 2002
pRSET-B-mCherry	Monomeric Cherry (Red) Fluorescent Protein	Roger Tsien, San Diego Shaner et al., 2004
pTER	shRNA Expressionsvektor	van de Wetering <i>et al.</i> , 2003
pTER-EGFP	shRNA Expressionsvektor gekoppelt mit EGFP	Bockamp und Griffin, Institut für Toxikologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
pRSET-B-mRFP	Monomeric Red Fluorescent Protein	Roger Tsien Campbell <i>et al.</i> , 2002

Tabelle 22: Plasmide zur Expression von fluoreszierenden Proteinhybriden

Plasmid	markiertes Protein	Vektor	Herkunft
pAktin-mRFP	humanes Aktin	pmRFP	Stefan Wöll, Mainz Windoffer <i>et al.</i> , 2006
pGFP-superFAK	SuperFAK aus <i>Gallus gallus</i>	pEGFP-C1	M. Schaller, Chapel Hill Gabarra-Niecko <i>et al.</i> , 2002
pGFP-FRNK	FRNK aus <i>Gallus gallus</i>	pEGFP-C1	M.Schaller, Chapel Hill Schaller <i>et al.</i> , 1993
pHK6a-YFP	humanes K6a	pEYFP-N1	U. Wilhem, Mainz Hickerson <i>et al.</i> , 2006
pHK6aN171K-YFP	humanes K6a mit mutiertem N171K	pEYFP-N1	U. Wilhem, Mainz Hickerson <i>et al.</i> , 2006
pHK6aN171del-YFP	humanes K6a mit deletiertem N171K	pEYFP-N1	U. Wilhem, Mainz Hickerson <i>et al.</i> , 2006
pHK8-CFP	humanes Keratin 8	pECFP-N1	P. Strnad, Mainz Windoffer <i>et al.</i> , 2004
pHK14-YFP	humanes K14	pEYFP-N1	U. Wilhelm, Mainz Windoffer <i>et al.</i> , 2006
pHK18-YFP	humanes Keratin 18	pEYFP-N1	P. Strnad, Mainz Strnad <i>et al.</i> , 2002
pPaxillin-pDsRed2-N1	humanes Paxillin	pDsRed2	A. Horwitz, Charlottesville Webb <i>et al.</i> , 2004
pPlectin1-GFP	humanes Plectin 1	pEGFP-N1	Arto Maatta, University of Durham
pPlectin1E-GFP	humanes Plectin 1E	pEGFP-N1	Arto Maatta, University of Durham
pPlectin1F-GFP	humanes Plectin 1F	pEGFP-N1	Arto Maatta, University of Durham
pTER-mRFP	mRFP	pTER	S. Wöll Windoffer <i>et al.</i> , 2006
pRFP-Zyxin	humanes Zyxin	pmRFP	A. Huttenlocher Bhatt <i>et al.</i> , 2002

3.1.13 Medien und Puffer

Alle verwendeten Medien wurden mit deionisiertem Wasser, das über eine Ionenaustauschanlage (Millipore) gefiltert wurde, angesetzt und bei 120°C autoklaviert. Antibiotika wurden nach Abkühlung des Mediums auf etwa 50°C zugegeben. Für die Herstellung von Diethylcarbonat- Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (DEPC-PBS) wurde 1 mg DEPC in 999 ml ddH₂O für 16 Std unter ständigem Rühren aufgelöst und anschließend autoklaviert. Puffer und Lösungen, die nicht in Tabelle 23 und 24 verzeichnet sind, finden sich unter den jeweiligen Methoden (nach SAMBROOK et al. 2002 hergestellt).

Tabelle 23: Allgemeine Puffer

DNA-Ladepuffer (10x, pH 7,5)		Protein-SDS-Ladepuffer nach Laemmli (2x)		TE Puffer (10x pH 8,0)	
Glycerin	30% (v/v)	Glycerin	20% (v/v)	Tris-HCl	100 mM
SDS	1% (w/v)	SDS	2% (w/v)	EDTA	10 mM
Bromphenolblau	0,3% (w/v)	Tris-HCl	42 mM		
Xylencyanol	0,3% (w/v)	DTT	150 mM		
EDTA	50 mM	Bromphenolblau	0,01% (w/v)		
Tris-HCl	10 mM				

Tabelle 24: Allgemeine Lösungen

PBS (10x, pH 7,5)		TBS (10x pH 8,0)		TBE (5x)	
NaCl	137 mM	Tris-Base	0,2 M	Tris-Base	0,45 M
KCl	3 mM	NaCl	1,3 M	Borsäure	0,45 M
Na ₂ HPO ₄	8 mM			EDTA	10 mM
K ₂ HPO ₄	2 mM				

3.1.14 Molekulargewichtsstandards

Tabelle 25: DNA-Größenstandards

Molekulargewichtsstandards	Bezugsquelle
Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ Mass-Ruler	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Precision Protein Standard	BioRad, München
Precision Protein Standard <i>prestained</i>	BioRad, München

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische und gentechnische Methoden

3.2.1.1 Isolierung von RNA aus Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien wurden auf 100 mm-Zellkulturpetrischalen bis zu einer Dichte von 90% kultiviert. Nach Waschen mit 1x DEPC-PBS (37°C, Tabelle 24) wurden sie abtrypsinert (0,25% Trypsin-EDTA) und jeweils eine Schale in 1 ml DEPC-PBS aufgenommen. Nach Zentrifugation (1000 g für 3 min) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit Hilfe des RNeasy™ Extraktions-Kits (Qiagen™) nach Protokoll weiterverarbeitet: Die Zelllyse erfolgte durch Resuspension in 600 µl RLT-Lysepuffer mittels enthaltenem Guanidinisothiocyanat und β-Mercaptoethanol. Zur weiteren Homogenisierung wurde das Gemisch durch eine 20-gauge-Injektionsnadel gezogen. Nach Zugabe von 600 µl 70%-igen Ethanol wurde das Gemisch auf eine RNeasy-Mini-Säule pipettiert und bei 10000 x g für 15 s zentrifugiert. Die sich im Überstand befindende negativ geladene RNA wurde reversibel an die positiv geladene Membran der Siliziumoxid-Säule in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen gebunden und anschließend mit ethanolhaltigem Waschpuffer (RW1-Puffer) gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde die RNA mit RNase-freiem ddH₂O wieder aus der Membran gelöst und durch abschließendes Zentrifugieren eluiert. Ein Teil dieser Gesamt-RNA wurde zur Qualitätskontrolle im Agarosegel aufgetrennt und die Konzentration durch Vergleich mit dem Molekulargewichtstandard Mass-Ruler (Fermentas) abgeschätzt. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

3.2.1.2 Isolierung von DNA aus Zelllinien

Für die Extraktion von DNA mit Hilfe des DNeasy™ Extraktions-Kits (Qiagen™) wurden vier 100 mm Petrischalen der jeweiligen Zelllinie bis zur Konfluenz kultiviert. Nach Waschen der Zellen mit PBS wurden diese zum Ablösen von den Petrischalen kurz mit Trypsin (0,25% Trypsin-EDTA) behandelt und anschließend in 4 ml PBS aufgenommen. Die Zelllyse des durch Zentrifugation bei 1000 x g für 3 min gewonnenen Zellpellets erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in Lysepuffer. Durch anschließendes Zentrifugieren über eine QIA-Shredder-Säule blieb die sich im Überstand befindende DNA auf der Membran der Silica-Säule hängen und wurde danach mit ethanolhaltigem Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit ddH₂O wieder aus der Membran gelöst und durch Zentrifugation eluiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Auftrennung im Agarosegel der isolierten DNA-Proben in einer Verdünnungsreihe durch Vergleich mit dem Molekulargewichtstandard Mass-Ruler (Fermentas). Die extrahierte DNA wurde bei -20°C gelagert.

3.2.1.3 Reverse Transkriptase-PCR zur cDNA-Synthese

Der erste Schritt der RT-PCR ist die cDNA-Synthese, die, ausgehend von der Gesamt-RNA als Matrize, von viralen Polymerasen ausgeführt wird. In dieser Arbeit wurde die „Reverse-iT™ RTase Blend“ Reverse-Transkriptase (RT, ABgene), eine aus dem Moloney Murine Leukemia Virus (MMuLV) und dem Avian M-Virus (AMV) stammende und modifizierte Transkriptase verwendet, welche keine RNaseH-Aktivität mehr enthält. Durch selektive Hybridisierung eines 35-Nukleotid langen Primers „Poly-dT-Adapter“ im Bereich des Poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende der mRNA wurden aus der isolierten Gesamt-RNA alle mRNA-Moleküle in einzelsträngige, komplementäre cDNA-Moleküle umgeschrieben. In der darauf folgenden PCR wurde die cDNA zum Doppelstrang ergänzt.

Die Durchführung der cDNA-Synthese erfolgte nach Vorschrift des Herstellers (ABgene): Standardmäßig wurden 2 µl der extrahierten RNA, 1 µl dT-Adapterprimer (10 µM) und 6 µl DEPC-H₂O in einem RNase freien 0,2 µl Reaktionsgefäß für 10 min bei 70°C erhitzt. Hierbei wurden die Sekundärstrukturen der RNA aufgeschmolzen. Der Oligo (dT)-Primer besteht aus einer Adapterregion und 19 Thyminen (Tabelle 15), die durch anschließende Abkühlung (2 min auf Eis) der Reaktion mit dem 3' Poly(A)-Ende der polyadenylierten mRNA einen dT:A-Doppelstrang ausbildeten. Im Anschluß wurden folgende Komponenten hinzugefügt: 4 µl 5X First-Strand-Synthesis-Buffer, 2 µl DTT (100 mM), 2 µl dNTP Mix (10 mM) und 1 µl der RT (50 units/µl). Nach gründlicher Durchmischung und anschließendem Herunterzentrifugieren wurde der Ansatz bei 42°C für 90 min inkubiert. Während dieser Inkubation synthetisiert die RT den cDNA Strang. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung der RT mittels Inkubation bei 70°C für 15 min abgestoppt. Das Produkt der cDNA Synthese, ein DNA/RNA Doppelstrang, wurde in der anschließenden PCR als Matrize eingesetzt.

3.2.1.4 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die vielfache enzymatische Amplifikation von genomischen Vorlagen-Genen, Genfragmenten oder Oligonukleotiden *in vitro* (SAIKI *et al.*, 1985). Durch die Anbindung von flankierenden Primern an die zu vermehrende denaturierte Matrizen-DNA (Template) erfolgt die Verlängerung der Stränge durch ein aus dem thermophilen Archaeobakterium *Thermophilus aquaticus* isoliertes hitzestabiles Enzym, die Taq DNA-Polymerase. Diese baut ausgehend vom 3'-Ende der Primer im Überschuss vorliegende, dem Template-Strang komplementäre Desoxynukleotide (dNTPs) ein. Dabei werden die freien Hydroxylgruppen an den jeweiligen 3'-Enden des Primers mit der 5'-Phosphatgruppe des zum Matrizenstrang komplementären dNTPs verbunden. Die Strangverlängerung erfolgt durch Phosphodiesterbindungen der Taq DNA-Polymerase zwischen weiteren komplementär gebundenen dNTPs bis wieder der komplette Doppelstrang vorliegt.

Der erste Schritt der PCR ist die Denaturierung der DNA zur Trennung der Doppelstränge. Im folgenden Annealingschritt hybridisierte der im Überschuss vorliegende *vorwärts*-Oligonukleotidprimer an die nun einsträngige cDNA. Die optimale Annealingtemperatur erlaubt nur

die Hybridisierung des Primers an die komplementäre Zielsequenz. Die Schmelztemperatur gibt an, bei welcher Temperatur 50% des Primers nicht mehr an das Template binden, also als Einzelstrang vorliegen. Die Annealingtemperatur liegt etwa 5-10°C darunter. Die optimale Annealingtemperatur verschiedener Primer und Primerkombinationen wurde empirisch durch eine Gradienten-PCR bestimmt. Für die anschließende Elongation des Primers durch Hybridisierung weiterer dNTPs in 5'>3' Richtung (Strangverlängerungsschritt) erfolgt die Temperaturanpassung auf das jeweilige Temperaturoptimum der verwendeten DNA-Polymerase. Die Elongationszeit richtet sich nach der Größe des erwarteten Produktes; es werden 0,5-1 min je kb Länge bei Verwendung der Taq DNA-Polymerase gerechnet. Dieser Zyklus wurde 30 bis 35 mal wiederholt; in jedem Zyklus verdoppelt sich die Zahl der Matrizen-DNA, da die Komplementierung an beiden Strängen des Templates abläuft. Am 3' Ende der neu synthetisierten Stränge wird von der Taq-Polymerase unspezifisch ein Desoxyadenosin angehängt (Poly-A Überhang).

Für Standardreaktion wurde die Taq DNA-Polymerase unter folgenden Bedingungen verwendet: Die initiale Denaturierung erfolgte für 5 min bei 94°C. Anschließend folgten 35 Zyklen bestehend aus jeweils 30 s bei 94°C (Denaturierung), 20 s bei der jeweiligen Annealingtemperatur, und 60 s bei 72°C (Elongation). Als letzter Schritt fand ein finaler Elongationsschritt für 10 min bei 72°C statt, um eine komplette Extension aller Reaktionsprodukte sicherzustellen. Anschließend wurden die Reaktionsansätze auf 8°C heruntergekühlt.

Ein Ansatz enthielt 1X Reaktionspuffer [10 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, 2 mM MgSO₄; 0,1% Triton X-100, pH 8,8; NEB], 9 mM MgCl₂ (NEB, dNTPs je 10 mM (peqlab), 10µM/0,5M des jeweiligen Primer (Qiagen), 1 U Taq DNA-Polymerase (VWR) und bis zu 10 ng Plasmid-DNA oder bis zu 500 ng genomische DNA. Die eingesetzte Menge an Matrizen-DNA variierte mit Konzentration der synthetisierten cDNA bzw. Menge der extrahierten DNA. Der Ansatz wurde auf 50 µl mit PCR-Wasser (Braun) aufgefüllt und in dünnwandige 0,2 µl PCR-Reaktionsgefäße (ABgene) pipettiert. Es wurde stets eine Negativ-Kontrolle, die Wasser anstelle der Template-DNA enthielt, mit amplifiziert, um die Reinheit aller Komponenten zu überprüfen und so Kontaminationen mit Fremd-DNA auszuschließen.

3.2.1.5 Phusion-PCR für Klonierungsexperimente

Die Taq DNA-Polymerase besitzt durch eine fehlende 3'>5' Exonukleaseaktivität eine Fehlerquote von 1×10^6 (1 Fehler pro 1000 Nukleotide). Da PCR-Produkte in dieser Arbeit vor allem für Klonierungsexperimente eingesetzt wurden, mussten Kettenabbrüche und Leseraster-Verschiebungen in der Protein-kodierenden cDNA unbedingt vermieden werden. Zur Fehlerratenreduktion wurde eine Mischung verschiedener DNA-Polymerasen mit Endonuklease-Aktivität eingesetzt. Verwendet wurde die Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase (Finnzymes, NEB), die aus der Taq und der Pfu DNA-Polymerase besteht. Durch die Verwendung beider Polymerasen wurde eine hohe Prozessivität und eine niedrige Fehlerrate ($4,4 \times 10^{-7}$) erreicht. Allerdings können diese PCR-Produkte nicht für Vektoren einer TA-Klonierung verwendet werden,

da keine TA-Überhänge, sondern glatte Enden generiert werden. Da die Primersequenzen meist zusätzliche eingefügte Restriktionsschnittstellen enthalten und eine veränderte Nukleotidzusammensetzung aufweisen, um Stopp-Codons zu entfernen, wurde ein optimierter PCR-Ansatz für degenerierte Primer entwickelt (siehe Tabelle 26).

Der initiale Denaturierungsschritt wurde bei 98°C für 30 s durchgeführt. Anschließend wurden 30 bis 35 Zyklen mit der Denaturation bei 98°C für 10 s, das Annealing der Primer für 20 s bei der primerspezifischen Annealingtemperatur (entspricht hier der Schmelztemperatur der Primer) und der anschließenden Elongation bei 72°C je nach Länge des erwarteten Produktes (15-30 s pro 1kb DNA) durchgeführt. Der abschließende Elongationsschritt betrug 72°C für 10 min. Zum Schluss wurden die Reaktionsprodukte auf 8°C herunter gekühlt.

Tabelle 26: PCR-Ansätze mit der Phusion-Taq

Standard PCR-Ansatz	optimierter PCR Ansatz für degenerierte Primer
10 ng Plasmid-DNA	10ng Plamid-DNA
1x HF-Reaktionspuffer (7,5 mM Mg ⁺⁺)	1x HF oder GC-Reaktionspuffer
	10 mM MgCl ₂
10 mM dNTP-Mix	10 mM dNTP-Mix
1 µM <i>vorwärts</i> -Primer	2 µM <i>vorwärts</i> -Primer
1 µM <i>rückwärts</i> -Primer	2 µM <i>rückwärts</i> -Primer
1U Phusion DNA-Polymerase	1U Phusion DNA-Polymerase
ad 50 µl ddH ₂ O	ad 50 µl ddH ₂ O

3.2.1.6 Real-Time-Polymerasekettenreaktion

Die Real-Time-PCR ermöglicht die quantitative Analyse von Gen-Transkripten. PCR-Produkte können während der laufenden Zyklen durch Einbau von fluoreszierenden Nukleotiden quantifiziert werden (HEID *et al.*, 1996). Verwendet wurde das SYBR[®] Green System in Kombination mit dem iCycler „iQ[™] Multi-Color Real Time PCR Detection System“ (BioRad). Der Cyaninfarbstoff SYBER[®] Green absorbiert nach Bindung an die kleine Furche doppelsträngiger DNA blaues Licht der Wellenlänge 498 nm. Erst nach der Hybridisierung wird grünes Licht bei $\lambda = 522$ nm emittiert; die Fluoreszenz steigt an. Somit nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge an PCR-Produkten von Zyklus zu Zyklus zu. Die Quantifizierung erfolgt in der exponentiellen Phase der PCR, die durch den CT-Wert (*Threshold Cycle*, Schwellenwertdefinition) bestimmt wird (ZIPPER *et al.*, 2004). Die Bestimmung der Spezifität der PCR-Produkte ist notwendig, da auch unspezifische PCR-Produkte wie Primer-Dimere detektiert werden können. Nach abgelaufener PCR wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt: Die DNA wird durch eine kontinuierliche und schrittweise Temperaturerhöhung (60-95°C, alle 10 s + 0,5°C) aufgeschmolzen. Jedes PCR-Produkt besitzt abhängig von seiner Basenzusammensetzung eine

spezifische Schmelztemperatur, bei welcher der Doppelstrang zum Einzelstrang denaturiert und der Fluoreszenzfarbstoff wieder freigesetzt wird; der Laser des Light-Cylers detektiert diesmal eine Fluoreszenzabnahme. Mehrere PCR-Produkte liefern verschiedene Maxima in der Schmelzkurve.

Die Höhe der Standardkurve gibt Auskunft über die Menge der gebildeten Fragmente; anhand derer die Fragmentlänge und damit die Spezifität bestimmt wird. Die relative Quantifizierung durch den Vergleich mit einem Referenz-Gen (z. B. das house-keeping Gen Glycerinaldehyd-3 Phosphat-Dehydrogenase) wurde nicht durchgeführt.

Die PCR-Ansätze wurden stets doppelt in 96-Loch-PCR-Platten pipettiert und eine Negativkontrolle mit Wasser anstatt der cDNA zusätzlich mitgeführt (siehe Tabelle 27). Die Schmelzkurvenanalyse wurde durch eine Erhöhung der Temperatur von 60° auf 100°C (alle 10 s + 0,5°C) durchgeführt.

Tabelle 27: Real-Time-PCR-Ansatz

Real Time-PCR-Protokoll		Real Time-PCR-Programm
Thermo-Mastermix	12,5 µl	15 min bei 95°C (hotstart)
3' Primer 10 µM	0,75 µl	30 s bei 95°C
5' Primer 10 µM	0,75 µl	30 s bei 54°C
cDNA 1:10 verdünnt	5 µl	30 s bei 72°C
H ₂ O	6 µl	45 Zyklen

3.2.1.7 Quantifizierung von Nukleinsäurelösungen mittels Absorptionsspektrometrie

Photometrische Konzentrationsmessungen beruhen auf dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei $\lambda = 260$ nm. Durch Messung der optischen Dichte (OD) der verdünnten Nukleinsäurelösungen in einer speziellen Küvette wird die Konzentration anhand der Extinktion nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz bestimmt. Eine OD von 1 entspricht 50 µg/ml DNA bzw. 40 µg/ml RNA (SAMBROCK et al., 1989). Folgende Formel wird zur Berechnung der Endkonzentration (µg/ml) verwendet:

$$\text{OD} \times \text{Umrechnungsfaktor für DNA oder RNA} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Endkonzentration (µg/ml)}$$

Über den Grad der Verunreinigung mit Proteinen und Phenolen lässt sich mit Hilfe des Quotienten $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ eine Aussage machen. Beträgt der Wert des Quotienten 1,8 oder mehr, kann die DNA- oder RNA-haltige Lösung als rein angesehen werden.

3.2.1.8 Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte müssen vor ihrer Weiterverarbeitung von Puffer-, Enzym- und Oligonukleotid-Resten befreit werden. Hier für wurde das PCR-Aufreinigung-Kit von Qiagen benutzt: Nach Zugabe des 5-fachen Volumens an QIB-Puffer wurde das Gemisch auf eine Qiagen-Säule pipettiert und für 1 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Fragmente, die kleiner als 50 bp sind, können nicht an die Säule binden;

somit wurden sämtliche Oligonukleotide entfernt. Nach Waschen mit Qiagen-Waschpuffer wurde zweimal zentrifugiert (1 min, 13.000 x g) und anschließend eluiert (Zentrifugation für 1 min bei 13.000 x g mit Qiagen-Elutions-Puffer).

3.2.1.9 *In vitro*-Rekombination von DNA-Konstrukten

Zur Studie der Lokalisation und Dynamik von verschiedenen Zytoskelett-Proteinen in Säugerzellen wurden diese mit verschiedenen fluoreszierenden Proteinen gekoppelt. Alle Klonierungen und PCRs wurden mit Hilfe des Programms „Clone Manager Suite 7“ (Sci EdCentral) geplant. Zu klonierende PCR-Produkte wurden mit Restriktionsendonukleaseschnittstellen am 5'- und 3'- Ende durch die Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase synthetisiert. Da die meisten Restriktionsenzyme ein bis mehrere Basen Übergänge zum vollständigen Schneiden benötigen, wurden vor den entsprechenden Schnittstellen zusätzliche Nukleotide im Primer eingefügt. Die Überprüfung der hergestellten Plasmide erfolgte durch Verdau mit Restriktionsendonukleasen sowie Sequenzierungsreaktionen.

3.2.1.9.1 Restriktion von DNA

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische palindromisch angeordnete Nukleotide und schneiden DNA-Moleküle innerhalb dieser Erkennungssequenz. Nach Auftrennung im Agarosegel sind die verschiedenen DNA-Fragmente als spezifisches Bandenmuster detektierbar und können zur Identifikation von Plasmid-DNA verwendet werden. Für diese analytische Restriktion wurden jeweils 1 µl Plasmid-DNA mit den zur Klonierung der jeweiligen Plasmide benutzten Enzymen und weiteren Enzymen, die drei- bis vier Fragmente generierten, in den dazugehörigen Puffern nach Anweisung des Herstellers verdaut (siehe Tabelle 28).

Der Verdau von DNA mit einem Restriktionsenzym erfolgte jeweils in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem. Die Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen Fermentas und NEB bezogen und unter Verwendung der mitgelieferten Puffer eingesetzt.

Für die Herstellung von fluoreszierenden Proteinhybriden wurden die Plasmide in einem präparativem Ansatz verdaut (Tabelle 30) und nach der Auftrennung aus dem Agarosegel wieder aufgereinigt. Zur vollständigen Restriktion von 4 µg Plasmid-DNA wurde diese für 60 min mit 10 Enzym-Einheiten (U, Units) und 1X Restriktionspuffer unter den angegebenen Temperaturbedingungen inkubiert (siehe Tabelle 28).

Für den Verdau von Plasmiden mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen muss die Pufferkompatibilität beachtet werden. Mit Hilfe der Online-Programme „DoubleDigest™“ (<http://www.fermentas.com/doubledigest/index.html>) und „Double Digest Finder“ (<http://www.neb.com/doubledigestcalculator/html>) konnte der optimale Puffer bestimmt werden. Bei Fehlen eines gemeinsamen Puffersystems wurde zunächst nur mit einem Enzym verdaut. Im Anschluss wurde das linearisierte Plasmid mittels Ethanol-fällung (siehe 3.2.1.9.2) aufgereinigt und nachfolgend mit dem zweiten Enzym geschnitten.

Tabelle 28: Analytische und präparative Restriktion

analytische Restriktion		präparative Restriktion	
Plasmid-DNA	200 ng	Plasmid-DNA	4 µg
Restriktionpuffer	1X	Restriktionpuffer	1X
Restriktionsenzym	1U	Restriktionsenzym	10 U
gg. Restriktionsenzym 2	1 U	gg. Restriktionsenzym 2	10 U
ddH ₂ O	ad 10µl	ddH ₂ O	ad 50µl

3.2.1.9.2 Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren können durch eine Ethanolfällung angereichert und von Verunreinigungen wie z. B. Salzen, Enzymen und Puffern gesäubert werden. Die DNA-haltige Lösung wurde hierzu mit 1/10 des Volumens mit 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 2,5-fachem Volumen an 100% Ethanol (v/v) versetzt und für 30 min bei -20°C inkubiert. Durch anschließendes Zentrifugieren ($13000 \times g$, 30 min., 4°C) wurden die präzipitierten Nukleinsäuren sedimentiert. Das resultierende DNA-Pellet wurde anschließend mit 70% Ethanol (v/v) gewaschen, erneut zentrifugiert ($13000 \times g$, 10 min., 4°C) und in TE-Puffer resuspendiert.

3.2.1.9.3 Agarosegel-Elektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Restriktionsfragmenten erfolgte aufgrund der vom Molekulargewicht abhängigen Laufgeschwindigkeit in einer Agarosegelmatrix (SAMBROCK et al., 1989). Mit Hilfe der Gelelektrophorese können DNA-Fragmente anhand ihrer Größe aufgetrennt werden, da die negativ geladenen DNA-Moleküle im Agarosegel in einem elektrischen Spannungsfeld zur Anode wandern. Kleinere Fragmente können sich besser durch die Agarosematrix bewegen und wandern somit schneller.

Ethidiumbromid (3,8 Amino-5-ethyl-6-phenylphenanthridium-bromid) lagert sich reversibel in die DNA ein und fluoresziert unter UV-Licht; die Nachweisgrenze liegt bei 5 ng Nukleinsäure pro aufgetrennter Bande. Für ein einprozentiges Gel (Standard) wurden 0,5 g Agarose (SeaKem LE Agarose von Biozym) in 50 ml Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE) in der Mikrowelle aufgekocht, auf etwa 60°C abgekühlt und mit 2 µl Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) versetzt und anschließend in Gelkassetten gefüllt. Die Proben wurden mit 0,3-fachem Volumen Ladepuffer versetzt und in die Taschen des polymerisierten Agarosegels pipettiert. Die Auftrennung der DNA erfolgte horizontal in Flachbett-Gelapparaturen (peqlab) bei einer Spannung von 10 V/cm und 1X TBE als Laufpuffer. Die Laufweite der Proben kann durch den dem Ladepuffer beigesetzten Farbstoffen Bromphenolblau (bei 300 bp) und Xylencyanol (bei etwa 3 kb) abgeschätzt werden. Die Visualisierung und Dokumentation der DNA-Fragmente fand unter UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) mit Hilfe des Geldokumentation Image Master VDS

statt. Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgte durch Vergleich mit einem zusätzlich aufgetragenen Größenstandard (Fermentas).

3.2.1.9.4 Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Aufgetrennte DNA-Fragmente können aus ausgeschnittenen und aufgeschmolzenen Agarosestücken wieder isoliert und weiter verwendet werden. Die Durchführung erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel-Extraction-Kits (Qiagen) nach Vorschrift des Herstellers. Zunächst wurde durch Inkubation in QG1-Puffer bei 50°C für 10 min die Agarose gelöst. Nach dem Wiegen des ausgeschnittenen Gelstückes wurde die dreifache Menge an Puffervolumen entsprechend des Gewichts zugesetzt. Um die Ausbeute an DNA zu erhöhen, wurde die einfache Menge an Isopropanol zugesetzt. Anschließendes Zentrifugieren (13.000 x g, 1 min) in eine QIAquick-Säule band die DNA an die Silica-Membran der Säule. Bei zu niedrigem pH-Wert (gelöstes DNA-Agarose-Puffer-Gemisch zeigt eine violette Farbe) kann die Säulenanbindung durch Zugabe von Natriumactat (3 mM) verbessert werden. Die gebundene DNA wurde nun mit einem ethanolhaltigem Waschpuffer gewaschen und anschließend trocken zentrifugiert (13.000 x g, 1 min). Nach Lösen der DNA in Elutions-Puffer wurde diese in ein neues Reaktionsgefäß durch Zentrifugation für 1 min bei 13.000 x g eluiert.

3.2.1.9.5 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Bei Vektoren mit kompatiblen Enden (Enzyme, die glatte Enden (blunt-ends) generieren oder bei einer Klonierung, die durch Restriktion von nur einem Enzym durchgeführt wurde) müssen die Enden dephosphoryliert werden, um eine Religation des linearisierten Vektors zu vermeiden. Die NEB-Antartic-Phosphatase hydrolysiert endständige 5'-Phosphat-Gruppen, so dass die Ligase die beiden Vektorenden nicht mehr miteinander verbinden kann. Die Phosphatasebehandlung wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt: Je 1 U Antartic-Phosphatase wurde mit 1 µg DNA und 1X Phosphatase-Puffer (50 nM Bis-Tris-Propan-HCl, 1 mM MgCl₂, 0,1mM ZnCl₂; pH 6) für 15 min bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung des Enzyms für 5 min bei 65° C gestoppt.

3.2.1.9.6 Auffüllen von 5' bzw 3' Enden durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase

Bei manchen Klonierungsansätzen war es durch die Verwendung spezieller Enzyme notwendig, klebrige Enden (sticky-ends) durch das Anfügen von Nucleotiden in glatte Enden umzuwandeln. Das Klenow-Enzym (große Untereinheit der DNA-Polymerase I) besitzt keine 5'>3' Exonukleaseaktivität und kann somit Desoxynucleotide an DNA-Fragmente anfügen. 50 ng DNA wurden hierfür mit 10 U des Klenow-Fragment der DNA-Polymerase (Fermentas), 10 X Reaktionsbuffer (500 mM Tris-HCl pH8, 50mM MgCl₂, 10mM DTT) und dNTPs (je 2 mM) bei 37°C für 10 min inkubiert.

3.2.1.9.7 Ligation von DNA

Die Phagen-T4-DNA-Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einer freien 5'-Phosphat-Gruppe und einer freien 3'-Hydroxyl-Gruppe zweier doppelsträngiger DNA-Fragmente unter ATP-Verbrauch. Für eine erfolgreiche Ligation sollte das Insert-Vektor Verhältnis 3:1 betragen. Es wurden 50 ng des aufgereinigten Vektors eingesetzt, die Konzentration der aufgereinigten DNA-Fragmente betrug in Bezug auf das molare Verhältnis das 2 – 3-fache der eingesetzten Vektormenge. In einem 20 µl Ligationsansatz wurden entsprechende Mengen an Vektor und Insert mit 400 U T4-Ligase (NEB Quick Ligation Kit) und 1x Reaktionspuffer (132 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, 2 mM Dithiothreitol, 15% PEG 6000; pH 7,6) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ligationsansatz in kompetente Bakterien transformiert.

3.2.1.9.8 Herstellung kompetenter Bakterien

Das Amplifizieren der Plasmide erfolgte mit Hilfe von kompetent-gemachten Bakterien nach (Hanahan, 1983). Von der tiefgefrorenen Bakterien-Ursprungslösung wurde ein Verdünnungsausstrich durchgeführt und bei 37°C über Nacht bebrütet. Hiervon wurden 20 ml LB-Flüssigkultur mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und ebenfalls über Nacht bei 37°C und 200 g auf dem Schüttler inkubiert. XL1-Blue-Bakterien (Stratagen) besitzen eine Resistenz gegen das Antibiotikum Tetracyclin, welches jeder Kultur zugefügt wurde, um Kontaminationen mit anderen Bakterien zu vermeiden. DH5α-Bakterien (Invitrogen) besitzen keinen Selektionsmarker, die GM2163-Bakterien (Fermentas) eine Resistenz gegen Chloramphenicol. Der GM2163-Bakterienstamm ist im Gegensatz zu den beiden anderen Stämmen Methyltransferasen-defizient und wurde zur Entfernung von Methylresten nach Klonierung mit Methyltransferasen-sensitiven Enzymen benutzt.

Von der Übernachtskultur wurden jeweils 0,5 ml abgenommen und mit 7 ml LB-Medium beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ = 0,3 kultiviert (Vorkultur). Vor der Vorkultur wurden wiederum 5 ml entnommen, mit 100 ml vorgewärmtem LB-Medium versetzt und bis zu einer OD₆₀₀ = 0,48 kultiviert. Nach Abkühlen auf Eis wurden die Zellen durch Zentrifugation (5000 x g für 10 min bei 4°C) pelletiert und in 30 ml gekühlten Tfb1-Puffer aufgenommen. Nach zweistündiger Inkubation auf Eis erfolgte eine erneute Zentrifugation (5000 x g für 10 min bei 4°C). Das entstandene Bakterienzellpellet wurde in 4 ml gekühlten Tfb2-Puffer aufgenommen und in Aliquots von 200 µl in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.2.1.9.9 Transformation durch Hitzeschock

Der abzentrifugierte Ligationsansatz wurde den auf Eis aufgetauten chemokompeten Bakterienzellen hinzugefügt und anschließend vorsichtig durchmischt. Während der nachfolgenden 30-minütigen Inkubation auf Eis heftete sich die Plasmid-DNA an die Zellwände der Bakterien an. Durch den folgenden Hitzeschock für 50 s bei exakt 42°C wurde die Zellmembran der Bakterien kurz durchlässig

und die Plasmid-DNA drang in die Zellen ein. Nach anschließender 2-minütiger Inkubation auf Eis wurden 500 µl SOC-Medium hinzugefügt und die Proben bei 37°C auf dem Schüttler (~200 g) für 90 min inkubiert. Jeweils 200 µl und 500 µl des Transformationsansatzes wurden nun auf Ampicillin- bzw. Kanamycin-haltige Agarplatten entsprechend der Resistenz des Plasmids ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet.

3.2.1.9.10 Kultivierung von Bakterien in Flüssigkulturen

Etwa sechs Kolonien einer Platte wurden jeweils mit antibiotikahaltigem LB-Medium, (je nach Resistenz des Plasmides Kanamycin oder Ampicillin, siehe Tabelle 29) angeimpft und über Nacht auf dem Schüttler (200 g) bei 37°C inkubiert.

Tabelle 29: Medien für die *E. Coli* Kulturen

LB-Medium		SOC-Medium	
Bacto-Trypton	1% (w/v)	Bacto-Trypton	2% (w/v)
Bacto-Hefeextrakt	0,5% (w/v)	Bacto-Hefeextrakt	0,5% (w/v)
Natirumchlorid	0,5% (w/v)	Natirumchlorid	0,5% (w/v)
Agar	1,4% (w/v)	Glucose	20mM
pH 7,4			
TFbI Puffer		TFbII Puffer	
Calciumacetat	30 mM	MOPS	10 mM
Rubiniumchlorid	100 mM	Calciumchlorid	75 mM
Calciumchlorid	10 mM	Rubiniumchlorid	10 mM
Manganchlorid	50 mM	Glycerin	15 % (v/v)
Glycerin	15 % (v/v)	pH 7, sterilfiltriert	
pH 5,8, sterilfiltriert			

3.2.1.9.11 Isolierung von Plasmid-DNA (Plasmid Mini-Präparation)

Die Aufreinigung der amplifizierten Plasmide aus den Bakterienflüssigkulturen erfolgte mit Hilfe von Plasmid-Mini-Präparations-Kits nach Angaben des Herstellers (Qiagen Plasmid Mini Kit oder E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit I, peqlab).

Zunächst wurden die Übernachtskulturen (4 ml) für 10 min bei 8000 x g abzentrifugiert. Die Bakterien sammelten sich als Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes; der mediumhaltige Überstand wurde verworfen. Durch Zugabe von Lysepuffer wurden die Zellen aufgeschlossen und anschließend neutralisiert. Durch weitere 10-minütige Zentrifugierungsschritte bei 13.000 g wurden die gefällten Zellwandüberreste inklusive der chromosomalen Bakterien-DNA und Proteine pelletiert. Der DNA-enhaltene Überstand wurde durch Zentrifugation auf eine Silica-Membran einer Säule gebunden

(13.000 x g, 1 min) und anschließend zweifach mit ethanolhaltigem Waschpuffer gewaschen. Nach Trocknung der Säule durch einen weiteren Zentrifugierungsschritt (13.000 x g, 1 min) wurde durch eine einminütige Inkubation mit Elutionspuffer die Plasmid-DNA aus der Membran gelöst und durch weiteres Zentrifugieren (13.000 x g, 1 min) in einem 1,7 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch.

3.2.1.9.12 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation größerer Mengen reiner Plasmid-DNA wurde das Qiagen Plasmid Maxi Kit eingesetzt. 200 ml LB Medium wurden mit dem entsprechenden Antibiotikum und 20 μl einer ÜN-Bakterienkultur oder einer Kolonie einer Agarplatte angeimpft und für 18 h in einem Orbitalschüttler bei 200 g und 37°C inkubiert. Die Isolierung und Aufreinigung wurde entsprechend des Kit-Protokolls durchgeführt und entspricht dem Prinzip der Plasmid-Mini-Präparation (siehe 3.2.1.11). Das abzentrifugierte Bakterienpellet wurde in 10 ml P1-Puffer resuspendiert und anschließend in 10 ml P2-Puffer lysiert. Die Zugabe von 10 ml Puffer P3 neutralisierte und fällte das Gemisch. Die Abtrennung der im Überstand befindlichen DNA erfolgte durch Filtration durch eine zuvor equilibrierte QIAfilter-Säule. Die an der Silicamembran gebundene DNA wurde gewaschen (2 x 20 ml QC-Puffer) und mittels Elutionspuffer wieder gelöst. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol gefällt und für 30 min bei 4°C und 15000 x g in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet mit 5 ml 70% Ethanol (v/v) gewaschen und anschließend erneut für 20 min bei 4°C und 15000 x g zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde kurz bei RT getrocknet (2-3 min) und in 300 μl TE-Puffer aufgenommen. Ausbeute und Reinheit der Präparation wurden photometrisch bestimmt; die Lagerung erfolgte bei -20°C .

3.2.1.9.13 Sequenzierung

Die Aufreinigung der Proben, die Sanger-Reaktion und die Sequenzierungsreaktion erfolgte durch die Firma GENterprise, Gesellschaft für Genanalyse und Biotechnologie mbH. Um die Sequenz der amplifizierten Fragmente lesbar zu machen, wurde die Sanger-Reaktion der aufgereinigten PCR-Produkte oder Plasmide durchgeführt (SANGER *et al.*, 1977). Diese beruht auf den basenspezifischen Abbruch der von der DNA-Polymerase katalysierten Reaktion aufgrund des Einbaus von farbstoffmarkierten Didesoxynucleotiden in den neusynthetisierten Strang. Die farbstoffmarkierten Produkte der Sanger-Reaktion, die sich in ihrer Länge jeweils um ein Basenpaar unterscheiden, wurden elektrophoretisch über Polyacrylamidgele aufgetrennt und per Laser im Kapillar-Sequenziergerät detektiert (ABI Prism 3730).

Das aus der Sequenzierung resultierende Chromatogramm wurde manuell mit Hilfe des Programms Chromas (V.1.45; Conor McCarthy, Southport, Australia) editiert.

3.2.1.9.14 Erstellung von Nukleotidsäurealignments

Nach Entfernung der Vektorsequenz durch das Online-NCBI-Programm VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>) wird das Insert durch das Programm BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) identifiziert.

Ein auf den Nukleotidsequenzen beruhendes Alignment der verschiedenen Isoformen der Plectin-Genfamilie erfolgte manuell mit dem Programm McClade Version 4.08.

3.2.1.10 Design und Annealing von shRNA-Einzelsträngen

Spezifischer Gen-Knock-Down kann durch die Verwendung von sogenannten Small Hairpin-RNA (sh-RNA; "kurze Haarnadel-RNA") erreicht werden. Doppelsträngige RNA (dsRNA) wird vom Organismus als fremd erkannt und durch das RNase III-Enzym Dicer über den RNA-Interferenz-Signalweg (RNAi) in 21 Nukleotid-lange, small interfering RNAs (siRNA) Sequenzen geschnitten. Diese werden anschließend in den Proteinkomplex RISC (RNA-induced silencing complex) eingebaut und binden komplementär an DNA oder mRNA und verhindern auf diese Weise deren Translation. Dies dient z.B. dem Abbau von Fremd-DNA (Viren, Bakterien), aber auch der zellinternen Regulation über postranskriptionelles Gensilencing. Synthetisch hergestellte siRNA-Oligos können nach Transfektion in Säugetierzelllinien die Expression von spezifischen Zielgenen durch den Abbau der mRNA verringern (TUSCHL, 2001). ShRNAs besitzen im Gegensatz zu siRNAs eine Haarnadelstruktur und werden über Vektoren in Zellen eingebracht. Der Vektor besitzt den konstitutiv aktiven Polymerase III Promotor H1, der für eine kontinuierliche Produktion der shRNA-Moleküle sorgt. Somit werden die herunterregulierenden Elemente von den Zellen selbst produziert und können im Gegensatz zur siRNAs an Tochterzellen weitergegeben werden. Die shRNA-Moleküle werden durch zelluläre Mechanismen (RNA-Interferenz Signalweg) zu siRNA geschnitten und in RISC Komplex integriert, welcher wiederum an die mRNA bindet und diese anschließend schneidet. Der Haarnadel-Loop befindet sich zwischen den beiden Strängen, so dass nur ein einziges Transkript hergestellt und zu funktionalen siRNAs weiterprozessiert wird (PADDISON *et al.*, 2002).

Das shRNA Expressionsplasmid pTER wurde zunächst durch L. Griffin und E. Bockamp (Institut für Toxikologie Universität Mainz) wie folgt verändert (VAN DE WETERING *et al.*, 2003): Das 1,379 bp große, für das EGFP und den CMV-Promotor kodierende Fragment wurde über PCR amplifiziert und nach anschließender Restriktion mit SpeI und XbaI in den mit den gleichen Enzymen verdauten pTER-Vektor hinter den H1-Promotor eingefügt. Da der H1-Promotor aus Komponenten der humanen RNase besteht und somit ein Polymerase-III Promotor ist, wird der RNAi-Translationsprozeß nicht beeinträchtigt. Die Anwesenheit des Farbprotein im Vektor erlaubt eine Selektion auf positiv transfizierte Zellen. Damit eignet sich dieses Vektorsystem besonders gut für shRNA-Expressionsversuche.

Talin-spezifische, doppelsträngige siRNA-Oligonukleotide (siehe Tabelle 30) wurden nach Angaben von Dr. Yuko Miyamoto und Dr. Rudy Juliano (persönliche Kommunikation, unpubliziert) synthetisch

hergestellt (MWG Biotech). Sie entsprechen der Zielsequenz AAGGCACUCACUGGAACCAUU des humanen Talin-Gens (Acession-Nummer NCBI NM_006289; Nukleotide 1478-1497). Die Target-Sequenz ist in einem Alignment im Anhang dargestellt.

Um sense- und antisense-Sequenzen miteinander zu verbinden (*annealing*), wurden diese für fünf Minuten bei 95°C und anschließend für 15 min bei 75°C in *annealing*-Puffer (100 mM Kaliumacetat, 30 mM Hepes-KOH, pH 7,4 und 2 mM Magnesiumacetat) inkubiert. Die nun komplementären Oligos wurden nach einer BglIII/HindIII Restriktion hinter dem H1-Promotor in pTER-mRFP einligiert. Vor der Transformation in chemokompetente Zellen wurde das ligierte Plasmid mit HindIII geschnitten. Da diese Schnittstelle in erfolgreich ligierten Vektoren nicht mehr vorhanden ist, wurden re-ligierte Vektoren geschnitten und konnten somit nicht mehr transformiert werden.

Tabelle 30: Synthetisch hergestellte Talin-siRNA-Oligonukleotide

Talin Zielsequenz: AAGGCACUCACUGGAACCAUU			
Forward 5'-	GATCCC	GGCACTCACTGGAACCATT	TTCAAGAGA AATGGTTCCAGTGAGTGCC TTTTGGAAA -3'
Revers 3'-	GG	CCGTGAGTGACCTTGGTAA	AAGTTCTCT TTACCAAGGTCACGCGG AAACCTTTTCGA -5'
	sense		antisense

3.2.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.2.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Zur Herstellung von Zellysaten für die SDS-Polyacrylamidelektrophorese wurden die Zellen zunächst in 100 mm Zellkulturschalen bis zu einer Dichte von 80-90% kultiviert. Nach Entfernen des Zellkulturmediums wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und pro Schale 300 µl SDS-Auftragspuffer hinzugegeben. Mit Hilfe eines Gummispatels wurden die Zellen von der Petrischalenoberfläche entfernt und anschließend in ein gekühltes Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C eingefroren.

3.2.2.2 Keratinisolierung aus Zellkultur-Epithelzellen

Für den Nachweis der verschiedenen Keratin-Subtypen aus Zellkulturzelllinien wurden zunächst Gesamtprotein-Zellextrakte aus den zu untersuchenden Zellen hergestellt. Durch anschließende Behandlung mit einem Hochsalzpuffer (siehe Tabelle 31) wurden alle Zytoskelett-Komponenten außer den Keratinen in Lösung gebracht.

Zwei 100 mm Zellkulturschalen der zu untersuchenden Zelllinien wurden bis zu einer Dichte von 90% kultiviert. Nach dem Waschen mit 1x PBS wurde jeweils eine Schale mit 500 µl Hochsalzpuffer versetzt, die Zellen mit einem Zellkulturschaber abgespatelt und anschließend in ein Reaktionsgefäß überführt. Mit Hilfe eines Homogenisators „Glas-Douncer“ wurden die Zellen auf Eis lysiert (etwa 30 Mal) und in ein 15 ml-Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend wurde mit Hochsalzpuffer auf 10 ml

aufgefüllt und 1 µl Benzonase zugegeben, um die DNA zu zerstören. Nach zweistündiger Inkubation im Überkopf-Schüttler bei 4°C wurden die isolierten Keratine durch Zentrifugation für 20 min bei 2000 x g und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pelett mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend erneut zentrifugiert (20 min, 2000 x g, 4°C). Das entstandene Pellet wurde in 100 µl SDS-Proteinladepuffer aufgenommen.

Tabelle 31: Hochsalzpuffer für die Keratinisolierung

Hochsalzpuffer	
Tris	10 mM
EDTA	5 mM
NaCl	140 mM
Triton-X 100	1% (v/v)
KCl	1,5 M
PMSF	100 µg/ml

3.2.2.3 SDS-Poly-Acrylamid-Gel Elektrophorese

Proteine werden unter denaturierenden Bedingungen im diskontinuierlichen Poly-Acrylamid-Gel Elektrophorese (PAGE) SDS-Gel entsprechend ihrer molekularen Masse im elektrischen Feld aufgetrennt (LAEMMLI, 1970). Damit Eigenladung, Faltung und Struktur der Proteine keinen Einfluss auf die Trennung haben, werden diese vor der Auftrennung durch SDS und Hitze denaturiert und mit reduzierenden Thioverbindungen (Dithiothreitol und Mercaptoethanol) versetzt. SDS, ein anionisches Detergens, bindet an hydrophobe Proteinregionen und ummantelt die linearen Polypeptidketten mit einer negativ geladenen Hülle. Die Laufgeschwindigkeit der Proteine im SDS-Gel durch das elektrische Feld sollte so nur von ihrem Molekulargewicht bestimmt sein. Polyacryamidgelle bestehen aus Acrylamid, Bisacrylamid, TEMED und APS. Acrylamid polymerisiert durch die Vernetzung über Bisacrylamid zu Polyacrylamid; APS und TEMED dienen hierbei durch Bildung von freien Radikalen als Katalysator (unter Luftabschluss).

Zuerst wurde das Trenngel (siehe Tabelle 32) zwischen zwei abgedichteten Glasplatten (BioRad) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisierung unter Luftabschluss wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel (siehe Tabelle 32) darüber gegossen. Das schwächer konzentrierte Sammelgel (4% v/v) dient der besseren Bandenauftrennung der aufgetragenen Proben – diese laufen dann am selben Startpunkt in das höher konzentrierte Trenngel (10-12% v/v). Vor dem Gießen des Sammelgels wurde ein Kamm eingeführt, so dass in die entstehenden Taschen die mit Probenpuffer versetzten Proteinproben hinein pipettiert werden konnten.

Bei der Probenvorbereitung wurde SDS im Überschuss zugeben und die Proben für 5 min auf 95°C erhitzt. Nach Abkühlen auf Eis wurden diese sofort in die Geltaschen pipettiert (0,5-20 µg Protein pro

Tasche) und eine elektrische Gleichspannung (~100V) angelegt. Die negativ geladenen Proteine wanderten durch die Gelmatrix in einem Tris/Glycin-Puffergemisch (10 x Elektrodenpuffer) hindurch zur positiv geladenen Anode. Die Proteine diffundierten abhängig von ihrer Molekülmasse mit unterschiedlicher Geschwindigkeit, so dass eine Auftrennung erreicht wird. Als Größenstandardt wurde ein Proteinmarker (*pre-stained*-Marker von Fermentas) zusammen mit den Proben aufgetragen.

Tabelle 32: PAGE-Puffer

SDS-Sammelgelpuffer	
Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30% (29:1)	5% (v/v)
Tris-Base pH8,8	120 mM
SDS	1% (w/v)
APS	1% (w/v)
APS	1% (w/v)
TEMED	1‰ (w/v)
SDS-Trenngelpuffer	
Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30% (29:1)	10% (v/v)
Tris-Base pH 8,8	250 mM
SDS	1% (w/v)
APS	1% (w/v)
TEMED	1‰ (w/v)
10x Elektrodenpuffer	
Tris-Base pH 8,8	250 mM
Glyzin	520 mM
SDS	1% (w/v)
pH 8,9	

3.2.2.4 Nachweis von Proteinen auf Membranen: Western Blot (Immunoblot)

Gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine sind im SDS-Gel für immunologische Detektion schwer zugänglich. Beim Western-Blot Verfahren werden die Proteine daher mittels Elektrophorese unter Beibehaltung des vorhandenen Bandenmusters aus dem Gel auf eine Trägermatrix übertragen. Die immobilisierten Proteine sind nun für weitere Methoden zugänglich.

Beim Immunoblot werden bestimmte Proteine einer Probe mit jeweils spezifischen Antigenen nachgewiesen. Die Methode beruht auf der Southern-Hybridisierung, die 1975 von Edwin Southern für die Analyse von DNA-Fragmenten entwickelt wurde. Die Proteine werden durch ein senkrecht

zum SDS-Gel angelegtes elektrisches Feld (es wird 1 mA/cm^2 Gel gerechnet) aus dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran ($0,2 \text{ }\mu\text{m}$ Porengröße, Whatman, Schleicher & Schuell) übertragen und bleiben an der Membranoberfläche aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften. Das Auftrennungsmuster der elektrophoretisch getrennten Proteine bleibt dabei erhalten und einzelne Proteinbanden können z. B. durch Immunodetektion identifiziert werden. Um eine höhere Spezifität zu erreichen, wird das an den Proteinen angelagerte SDS mit Hilfe von Waschpuffern ausgewaschen, so dass die Proteine zum größten Teil wieder ihre Sekundär- und Tertiärstruktur einnehmen können (Renaturierung).

Der Transfer erfolgte in der TransBlot-SD-Apparatur von BioRad bei konstanten 150 mA für zwei Stunden im Semidry-Verfahren. Zwischen Gel und Kathode bzw. zwischen Membran und Anode befanden sich jeweils drei Lagen in Transferpuffer getränkten Whatmann-Papiers (Schleicher & Schuell). Das Gel, die Membran und die Filterpapierbögen wurden für 10 min im Transferpuffer äquilibriert (siehe Tabelle 33). Beim Schichten des „Sandwichs“ wurden die Luftblasen durch Abrollen einer Glaspipette entfernt. Zum Nachweis des erfolgreichen und gleichmäßigen Proteintransfers wurde die Membran mit PonceauS und das Proteingel mit Coomassie-Blau angefärbt (siehe 3.2.2.6.1 und 3.2.2.6.2).

Tabelle 33: Western-Blot-Puffer

Transfer-Puffer	
Tris-Base	25 M
Glyzin	192 mM
Methanol	10% (v/v)

3.2.2.5 Immundetektion von Proteinen

Nach dem Transfer sind die aufgetrennten Proteine auf der Membran immobilisiert und können durch Bindung von spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht werden. An den Fc-Teil des primären Antikörpers bindet wiederum ein sekundärer Antikörper, der mit einem Farbstoff gekoppelt ist und entsprechend detektiert werden kann.

Mit Hilfe der Blockierungs-Lösung (siehe Tabelle 34) wurden zunächst die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran maskiert, um nicht-spezifische Proteinbindungen zu verhindern. Der Blot wurde eine Stunde in der Milchpulver-haltigen Lösung unter ständiger Bewegung inkubiert. Nach anschließendem Waschen mit TBS mit 0,1% Tween 20 (TBS/T) für 15 min auf dem Horizontalschüttler wurde die Membran mit dem in Erst-Antikörperlösung verdünnten Primär-Antikörper (siehe Tabelle 11) über Nacht inkubiert (4°C , Überkopfschüttler).

Weitere Waschschrte mit TBS/T (3x für 5 min, Horizontalschüttler) entfernten schwächer haftende, unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran. Anschließend wurde die Membran mit dem

Sekundär-Antikörper in Block-Lösung verdünnt (siehe Tabelle 12) und für eine Stunde bei RT inkubiert. Die Sekundär-Antikörper sind spezifisch gegen bestimmte Bereiche des ersten Antikörpers gerichtet (meistens gegen die Fc-Bereiche) und mit dem Enzym HRP (Meerrettichperoxidase, *horseradish peroxidase*) gekoppelt. Die Spezies-Spezifität des Erst-Antikörpers bestimmt dabei das Epitop des Zweit-Antikörpers. Außerdem können mehrere Sekundär-Antikörper an einen Primär-Antikörper binden, wodurch es zur Signalverstärkung kommt. Nach abschließendem Abwaschen der überschüssigen Zweit-Antikörper für 15 min in TBS/T wurde der Blot in eine Röntgenkassette eingelegt und kurz mit *enhanced Chemi-Luminescence-Lösung* (ECL, SuperSignal West Pic Chemiluminescent, Perbio Science) inkubiert. Die gekoppelte HRP detektiert die Proteine durch enzymatische Umsetzung der Substrate. Die im Bereich der gebundenen Immunkomplexe auftretende Chemolumineszenz wurde durch anschließende Exposition eines Hyperfilms (GE Healthcare) auf dem Blot, je nach aufgetragener Proteinmenge und Antikörper-Verdünnung für wenige Sekunden bis zu 10 min, detektiert.

Im Anschluss wurde der Hyperfilm in der Dunkelkammer durch eine zweiminütige Inkubation in Entwicklerlösung (LX 24, Kodak) entwickelt und dann im Wasser gewaschen. Nach Inkubation in Fixierlösung (mehrere min) wurde der Film erneut mit Wasser gewaschen und anschließend im Trockenschrank aufgehängt und für 15 Minuten getrocknet. Als letztes wurden die Filme eingescannt. Die eingescannten Membranen (Ponceau-Färbung) und SDS-Gele (Coomassie-Färbung) dienten als Kontrollen für eine gleichmäßige Gelbeladung und zur Abschätzung der eingesetzten Proteinmengen.

Tabelle 34: Puffer für die Immunodetektion

Block-Lösung	
TBS	1x
Tween 20	0,1 % (v/v)
Trocken-Magermilchpulver	2,5 % (w/v)
Wasch-Puffer TBS/T	
Tris-Base	0,2 M
NaCl	1,3 M
Tween-20	0,1% (v/v)
Erst-Antikörper-Verdünnungslösung	
TBS	1X
BSA	5% (w/v)
Tween-20	0,1% (v/v)

3.2.2.6 Detektion von Proteinen durch Färbung

3.2.2.6.1 Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von SDS-Gelen

Eine Markierung der aufgetrennten Proteine konnte durch Anfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blau (G-250) erreicht werden, da dieser Farbstoff unspezifisch an basische Seitenketten von Aminosäuren bindet (siehe Tabelle 35). Das SDS-PAGE-Gel wurde für eine Stunde in der Färbelösung auf dem Schütteltisch inkubiert. Durch anschließendes Entfärben über Nacht (siehe Tabelle 36) wurden die Proteine im Gel fixiert und überschüssiger Farbstoff entfernt. Die Nachweisempfindlichkeit der Markierung liegt bei 0,5 µg Protein pro Bande.

Tabelle 35: Puffer für Coomassie-Blau Färbung

Coomassie-Brilliant-Blau-Färbelösung	
Coomassie-Brilliant-Blau RG-250	2,5 % (w/v)
Ethanol	50 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)

Tabelle 36: Puffer für Coomassie-Entfärbung

Coomassie-Entfärbe-Lösung	
Methanol	40 % (v/v)
Essigsäure	7,5 % (v/v)

3.2.2.6.2 Ponceau-S-Färbung von Proteinen auf Membranen

Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran wurden diese zur Überprüfung des erfolgreichen Transfers und zur Lokalisation der Proteinbanden mit Ponceau-S angefärbt. Die Membran wurde für 10 min in der Färbelösung (Tabelle 37) inkubiert und anschließend kurz mit TBS gewaschen bis die Proteinbanden sichtbar waren. Nach Markierung der Proteinbanden wurde die Membran durch kurzes Waschen mit Wasser entfärbt.

Tabelle 37: Puffer für Ponceau-S Färbung

Ponceau S-Färbelösung	
Ponceau S-Farbstoff	2% (w/v)
Trichloressigsäure	30% (w/v)
Sulfosalizylsäure	30% (w/v)

3.2.3 Zellkulturmethoden

3.2.3.1 Kultivierung von Säugerzellen

Die Inkubation von Säugerzellen erfolgte in Brutschränken bei einer Temperatur von 37°C, 5% CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre. Alle Arbeiten an den Zellkulturen fanden in Sterilbänken mit laminarem Luftstrom statt. Für die Kultur wurden 60 und 100 mm Zellkulturschalen und 96-bzw. 24 - Lochplatten der Firma Greiner (Heidelberg) verwendet.

Tabelle 38: Medien für die Kultur von Säugerzelllinien

DMEM/FCS:	Einfriermedium
DMEM (<i>high glucose</i>)	DMEM (<i>high glucose</i>)
FCS 10% (v/v)	FCS 20 % (v/v)
100 U/ml Penicillin/Streptomycin (bei Bedarf)	DMSO 10 % (v/v)

3.2.3.1.1 Passagieren von adhärenenten Zellen

Die Zellen wurden mit modifiziertem DMEM-Kulturmedium (PAA oder Invitrogen, siehe Tabelle 38) gehalten und alle 3-4 Tage passagiert. Hierfür wurde von einer konfluenten Kultur das Medium abgesaugt und die Zellen kurz mit EDTA-Lösung (siehe Tabelle 39) gewaschen. Anschließend wurde der Zellrasen mit vorgewärmter Trypsin/EDTA-Lösung (0,25 %, siehe Tabelle 42) überschichtet und bis zur Ablösung der Zellen im Brutschrank inkubiert. EpH4-Zelllinien wurden für circa 10 min bei 37°C mit Accutase (PAA) inkubiert, da eine Behandlung mit Trypsin zum Absterben der Zellen führte. Die enzymatische Ablösungs-Reaktion wurde durch Zugabe von 2 ml Kulturmedium gestoppt und die Zellen in einer Verdünnung von 1:10 und 1:20 in neue Zellkulturschalen überführt.

Tabelle 39: Lösungen zur Kultur von Säugerzellen

EDTA-Lösung:	Trypsin/EDTA
EDTA 0,02% (w/v)	Trypsin 0,25% (v/v)
1X PBS	EDTA 0,02% (w/v)
	1X PBS

3.2.3.1.2 Kryokonservierung von Säugerzellen

Die Langzeitlagerung von Säugerzellen fand in Kryoröhrchen bei -196°C in flüssigem Stickstoff statt. Zum Einfrieren wurden 1×10^6 - 5×10^6 Zellen in 1 ml Kulturmedium aufgenommen, in ein 2 ml Kryoröhrchen überführt und mit 1 ml Einfriermedium (siehe Tabelle 38) versetzt. Das Röhrchen wurde zunächst für 24 h bei -80°C inkubiert und danach in flüssigen Stickstoff überführt. Das zugesetzte DMSO verhinderte dabei die Bildung von Eiskristallen, die zur Zerstörung der Zellen

führen können. Zum Auftauen wurde ein Röhrchen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und in einem 37°C warmen Wasserbad geschwenkt. Die aufgetauten Zellen wurden mit 5 ml Kulturmedium vermischt, abzentrifugiert (5 min bei 1000 x g) und anschließend in der gleichen Menge Medium aufgenommen und in neue Zellkulturschalen überführt. Der zusätzliche Waschschrift ist nötig, da DMSO bei RT zytotoxisch ist und vollständig entfernt werden muss.

3.2.3.1.3 Zellzahlbestimmung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl einer Kultur wurde eine Neubauer-Zählkammer (Roth) verwendet. Nachdem Ablösen der Zellen mittels EDTA-Trypsinlösung von den Zellkulturschalen (siehe 3.2.3.1.2) wurden diese in 3 ml Kulturmedium abgenommen und durch wiederholtes Pipettieren vereinzelt. Wenige Tropfen der Zellsuspension werden zwischen Deckgläschen und Kammer pipettiert. Die Tiefe der Kammer beträgt 0,1 mm (kontrollierbar durch Vorhandensein der Newtonischen Ringe). Vier große Quadrate wurden unter dem Mikroskop ausgezählt; die Zellzahl wurde anschließend durch folgende Formel berechnet:

$$\left[\frac{\text{Zellzahl}}{\text{Anzahl der ausgezählten Quadrate}} \right] \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor} (10^4) = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}}$$

3.2.3.1.4 Aussäen von Säugerzelllinien

Für Transfektionen oder Drogenexperimente wurden die dafür verwendeten Zelllinien auf 20 mm Glasbodenschälchen (MatTek) oder auf mit Deck-Glasplättchen (Menzel-Gläser) versehene 20 mm Zellkulturschalen ausgesät. Für die Zelluntersuchung eignen sich kleine Gruppen von etwa 4-6 Zellen besonders gut. Hierfür wurden die 60 mm Schalen in einer Verdünnung von 1:20 geteilt, da die Versuche meistens erst am nächsten Tag durchgeführt wurden, so dass sich die Zellen über Nacht optimal ausbreiten konnten.

Die verwendeten Deck-Glasplättchen wurden zur Sterilisation in Ethanol eingelegt, abgeflammt und bei 200°C gebrannt.

3.2.3.2 Transfektion von Säugerzelllinien

Verschiedene Transfektions-Methoden zum Einbringen von Plasmid-DNA in Säugerzelllinien wurden je nach Zelllinie angewandt. Alle Methoden beruhen auf dem Prinzip, die Permeabilität der Plasmamembran zu erhöhen und so das Eindringen der „Fremd-DNA“ zu ermöglichen. Für alle Transfektionsmethoden wurden die zu transfizierenden Zellen entweder auf 20 mm Glasbodenkulturschalen oder auf 20 mm Zellkulturschalen mit eingelegten Glasplättchen einen Tag vor der Transfektion ausgesät (50% konfluent).

3.2.3.2.1 Transfektion mittels Elektroporation

Das Prinzip der Elektroporation beruht auf einem elektrischen Impuls, der die Zellmembran für die Aufnahme von DNA permeabel macht (SUKHAREV *et al.*, 1992). Leitfähiges Material befindet sich nur im Zytoplasma, die Zellmembran wirkt aufgrund ihrer Lipiddoppelschicht als Isolator. Bis zu einer bestimmten elektrischen Spannung (~ 1 V) wird die Membran polarisiert. Die Membranintegrität wird zerstört, es bilden sich Poren und die Spannung kann durch die erhöhte Leitfähigkeit abfließen. Nach dem Ladungsausgleich bricht die Membranspannung wieder zusammen und die Poren schließen sich.

Da bei der Elektroporation bis zu 50% der Zellen sterben, müssen sehr viele Zellen eingesetzt werden. Auf 10 mm Schalen aufgesetzte Zellen wurden in 3 ml Medium aufgenommen und für 5 min bei 1000 x g in einem 15 ml Falcon-Röhrchen abzentrifugiert. Zum Waschen der Zellen wurde das Zellpellet in 1 ml 1x PBS aufgenommen und erneut bei 1000 x g für 5 min abzentrifugiert und anschließend die Zellzahl bestimmt. 3×10^6 Zellen wurden in 800 μ l Medium resuspendiert und in eine Elektroporations-Küvette (BioRad) pipettiert. Anschließend wurden 20 μ g der aufgereinigten Plasmid-DNA hinzugegeben und die Zellen für 10 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 244 V, 500 Ω und 975 μ F. Die Zellen wurden anschließend in 20 ml Medium aufgenommen, in eine 10 mm Zellkulturschale gegeben und im Brutschrank über Nacht inkubiert.

3.2.3.2.2 Transfektion mittels Lipofektion

Liposomen-basierte Transportvesikel (Lipoplexe) bestehen aus neutralen Helfer-Lipiden, die die Zelltoxizität der Vesikel verringern und positiv geladenen Lipiden, die die negativ geladene DNA komplexieren. Diese Komplexe werden von den Zellen durch Endocytose aufgenommen. Verwendet wurde das Lipofectamine 2000[®] Reagenz (Invitrogen). Nach Protokoll des Herstellers wurden in zwei verschiedenen Reaktionsgefäßen 4 μ g hochreine Plasmid-DNA mit 150 μ l Opti-MEM (Gibco) verdünnt und 5 μ l Lipofectamin 2000-Reagenz mit 145 μ l Opti-MEM versetzt. Beides wurde für jeweils 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das DNA-Opti-MEM-Gemisch dem Lipofectamine-Opti-MEM-Gemisch zugegeben und wieder für 20 Minuten inkubiert. Die nun gebildeten DNA-Liposomen-Komplexe wurden langsam zu den Zellen zugetropft. Die Transfektion erfolgte über Nacht bei 37°C in Brutschrank.

3.2.3.2.3 Calcium-Phosphat-Transfektion

Bei der Calcium-Phosphat-Präzipitation wurde die zu transfizierende Plasmid-DNA mit Calciumchlorid und Natriumphosphat ko-präzipitiert. Die negativ geladene Plasmid-DNA bindet an das ausfallende Calciumphosphat, die entstehenden Kristalle werden von den Zellen durch Endocytose aufgenommen. 5 μ g DNA wurden für einen kleinen Ansatz (20 mm Zellkulturschale) mit 10 μ l 2,5M CaCl_2 versetzt und mit ddH_2O auf 100 μ l aufgefüllt. Anschließend wurden 100 μ l 2x BES (N,N-bis-[2hydroxyethyl]-2-aminoethansulfonsäure) zugegeben und das Gemisch für 30 Minuten bei RT

inkubiert (siehe Tabelle 40). Das entstandene Calcium-DNA-Präzipitat wurde auf die Zellen gegeben und im Laufe der folgenden Inkubation im Brutschrank bei 37°C aufgenommen. Nach 16 Stunden wurde der Überstand abgezogen und durch DMEM-Medium mit 10% FCS ersetzt.

Tabelle 40: BES-Medium für die Calcium-Phosphat-Transfektion

BES (2x)	
BES	50 mM
NaCl	280 mM
Na ₂ HPO ₄	1,5 mM
pH	6,95

3.2.3.3 Generierung von stabilen Zellklonen

3.2.3.3.1 Herstellung von stabilen Zellklonen mittels Lipofektion

Zellen einer niedrigen Passage wurden auf 60 mm Zellkulturschalen etwa 70% konfluent ausgesät und zum Anwachsen über Nacht im Brutschrank bei 37°C kultiviert. Die Plasmide wurden durch Lipofektion wie folgt transfiziert (siehe 3.2.3.2.2): 10 µg DNA wurden mit 250 µl Opti-MEM versetzt, 10 µl Lipofectamine 2000 wurden zu 250 µl Opti-MEM gegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das DNA-Opti-MEM-Gemisch langsam dem Lipofectamine-Opti-MEM-Gemisch zugetropft. Nach einer weiteren 20-minütigen Inkubation bei RT wurde das Gesamt-Gemisch mit den gebildeten DNA-Komplexen zu den Zellen gegeben und für 24 Std im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium durch geneticinhaltiges Selektionsmedium ersetzt (1000 µg/ml). Nach etwa einer Woche hatten die das Plasmid-enthaltenden Zellen Kolonien gebildet, die unter dem Fluoreszenzmikroskop auf Intensität und Verteilung des Fluoreszenzsignales überprüft wurden. Positive Klone wurden mit Trypsin/EDTA angedaut, mit Kulturmedium versetzt, anschließend in eine 1000 µl Pipette aufgenommen und in eine 24-Loch-Platte überführt. Nach etwa 5-7 Tagen wurden die hochgewachsenen Klone erneut auf Fluoreszenz-Intensität und -Muster überprüft und in 20 mm Zellkulturschalen umgesetzt. Die besten Klone wurden weiter hochgezogen und anschließend eingefroren.

3.2.3.3.2 Herstellung von stabilen Zellklonen mittels retroviralem Gentransfer

Retroviren integrieren ihre Erbinformation ins Genom ihrer Wirtszelle. Bei Teilung der Wirtszelle wird somit das virale Genom an die Tochterzellen weitergegeben. Dieses liegt als einzelsträngige RNA vor und wird vor der Integration in das Wirtsgenom in doppelsträngige DNA mit Hilfe der reversen Transkriptase umgeschrieben. Das virale Genom enthält normalerweise drei essentielle Gene (*env*, *gag* und *pol*), zwei *long terminal repeats* (LTRs) sowie das Integrationsignal *Psi* (Ψ). *Env* kodiert für die Hüllproteine, *gag* für die Matrix- und Nukleokapsidproteine und *pol* für die viralen Enzyme

Protease, reverse Transkriptase und die Integrase. *Psi* ist das Signal für das Verpacken der RNA in neue Viruspartikel. Die Identifizierung potentieller Wirtszellen erfolgt über die Bindung viraler Glykoproteine an zelluläre Rezeptorproteine. Anschließend verschmilzt die virale Membran mit der Zellmembran und das virale Genom wird eingeschleust. Zunächst wird das virale RNA-Genom mit Hilfe der retroviralen Transkriptase in DNA umgeschrieben. Zelluläre und virale Proteine vermitteln den Transport durch die Kernporen in den Nukleus. Dort katalysiert die Integrase die Integration des viralen Genoms in das Wirtsgenom. Bei der folgenden Zellteilung wird das Virusgenom mitvermehrt und wieder aus der DNA herausgeschnitten. Nach der Verpackung in die synthetisierten Hüllproteine sind neue Viren entstanden, die weitere Wirtszellen infizieren können.

Die Nutzung von Retroviren als Transfektionssystem für Zellkulturlinien bietet wesentliche Vorteile: Das zu transfizierende Gen wird direkt in das Genom der mit dem Viruspartikel infizierten Zelle integriert. Je nach Virulenz können Transfektionseffizienzen von bis zu 100% erreicht werden. Außerdem exprimieren alle infizierten Zellen etwa die gleichen Mengen des Zielgenes, da meist nur ein Viruspartikel integriert, und so ein sehr homogenes Expressionsmuster erzielt werden kann. Der Integrationsort im Genom ist zufällig, es existieren aber „hotspots“ mit bevorzugter Integrationswahrscheinlichkeit.

Zum Schutz vor Bildung infektiöser Viruspartikel werden in retroviralen Transfektionssystemen die viralen Struktur- und Integrationsgene getrennt. Bei dem verwendeten retroviralen Gentransfersystem RetroX (BD RetroX™ Universal Packaging System BD Bioscience, Clontech) sind die Strukturgene *env*, *gag* und *pol* in der Verpackungszelllinie PT67 und die Integrationsgene sowie die LTRs in Vektoren lokalisiert. Somit ist die Wahrscheinlichkeit der Produktion von replikationsfähigen Viren durch Rekombinationsereignisse während der Zellproliferation minimiert. Das Hüllprotein *env* bestimmt den Infektionsrang (Tropismus); d.h. welche Wirts-Rezeptoren benutzt werden können, um in die Wirtszellen einzudringen. Die verwendete dualtropische Verpackungslinie PT67 (BD RetroPack™ PT67) kann Rezeptoren von Nagierzelllinien (Maus, Ratte) und humanen Zellen erkennen, da sie das Hüllglycoprotein 10A1 exprimiert. Die Viruspartikel können über die RAM1- und GALV-Rezeptoren in die Zielzellen eindringen.

Die im RetroX-System enthaltenen Vektoren pLN2 und pLXSN stammen vom Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) und enthalten virale Transkriptions- und Prozessierungselemente, das Verpackungssignal *Psi* sowie die beiden Erkennungssequenzen 5'- und 3'- *long terminal repeats* (LTR). Die viralen Gene *env*, *gag* und *pol* werden in der Verpackungszelllinie PT67 stabil exprimiert. Wird diese nun mit dem retroviralen, das Zielgen enthaltenden Vektor pLN2 oder pLXSN transfiziert, können sich nur Replikations-inkompetente Viruspartikel bilden. Diese Viruspartikel sind in der Lage, weitere Zellen zu infizieren und die im Plasmid enthaltene DNA stabil in das Wirtszellengenom zu integrieren.

3.2.3.3.2.1 Transfektion mittels Lipofektion

Die Verpackungszelllinie PT67 wurde mit 4 µg DNA des Plasmides mit Hilfe von Lipofectamine (Invitrogen) transfiziert. Nach 48 Std hatten sich infektiöse Viruspartikel gebildet. Der gesamte Kulturüberstand der PT67-Zellen wurde durch einen 0,45 µm Acetatfilter filtiert und der resultierende Virenüberstand auf die Zielzellen gegeben. Die Zellen mussten zu ca. 70% konfluent sein und wurden in einer Verdünnung von 1:1 oder 1:2 mit dem Virenüberstand versetzt. Zusätzlich wurde 4 µg/ml Polybren zugegeben, um die Bindung der Retroviren an die Zellmembran zu verbessern. Nach 48 Std wurde das Medium gewechselt und mit 0,9 mg/ml Geneticin (G-418 Sulfat-Neomycin, Invitrogen, für jede Zelllinie ausgetestet) selektioniert. Etwa 10 Tage nach der Transfektion hatten sich Klone gebildet, die unter Fluoreszenzlicht gepickt und in 24-Well Schalen weiterkultiviert wurden. Nach etwa einer Woche konnten sie in 20 mm-Schalen umgesetzt werden. Nach erneuter Überprüfung des fluoreszierenden Musters wurden die Zellen in 60 mm Zellkulturschalen kultiviert und eingefroren.

3.2.3.3.2.2 Transfektion mittels Calcium-Phosphat

Die Verpackungszelllinie PT67 wurde auf 100 mm Schalen ausgesät und mit 15 µg DNA Plasmid-DNA und mit 25 µl 2,5M CaCl₂ in insgesamt 250 µl ddH₂O versetzt. Anschließend wurden 100 µl 2x BES (N,N-bis-[2hydroxyethyl]-2-aminoethansulfonsäure) zugegeben und das Gemisch für 30 Minuten bei RT inkubiert (siehe Tabelle 40). Das entstandene Calcium-DNA-Präzipitat wurde auf die Zellen gegeben. Die Infektion der Zielzellen erfolgte wie in 3.2.3.3.2.1 beschrieben.

3.2.3.4 Hemmung der Proteinbiosynthese durch Puromycin und Cycloheximid

Inhibitoren der Proteinbiosynthese wurden nach den in (WINDOFFER *et al.*, 2000) ausgetesteten Konzentrationen (siehe Tabelle 12) eingesetzt. Fluoreszenzaufnahmen der Zelllinien PK18-5 und EK18-1 wurden in normalem Hanks/Hepes-Medium (siehe Tabelle 46) für jeweils 50 Bilder aufgenommen. Anschließend wurde das Medium komplett durch eine Pasteurpipette abgesaugt, durch das mit den Inhibitoren versetzten Hanks-Hepes-Medium ersetzt und ohne Unterbrechung die Aufnahme der fluoreszierenden Proteine fortgesetzt.

Cycloheximid ist ein Glutarimid-Antibiotikum aus *Streptomyces griseus* und hemmt die Bindung der Aminoactyl-tRNA an Ribosomen. Somit wird der Transfers der Aminosäuren von der Aminoactyl-tRNA auf die entstehende Polypeptidkette inhibiert – die Proteinbiosynthese kann nicht weiter erfolgen.

Puromycin ist ein Nucleosid-Antibiotikum aus *Streptomyces alboniger* und wird als Strukturanalogen zum 3'-Ende der Tyrosyl-tRNA bei der Translation eingebaut. Die Proteinbiosynthese wird durch vorzeitigen Kettenabbruch inhibiert.

3.2.3.5 Hemmung der Aktin-abhängigen Transportvorgängen durch Latrunculin B und Cytochalasin D

Latrunculin B, ein Toxin aus dem Seeschwamm *Latrunculia magnifica* führt zur Zerstörung der Aktinfilamente *in vivo*. Latrunculin bindet monomeres G-Aktin und verhindert somit die Polymerisation von Aktinfilamenten (SPECTOR *et al.*, 1983; YARMOLA *et al.*, 2000).

Cytochalasine sind Stoffwechselprodukte verschiedener Pilzarten. Sie binden an das Plus-Ende des Aktin-Dimers und verhindern damit die Polymerisation und Aktin-Elongation, da sich kein weiteres Aktin-Monomer anlagern kann. Verschiedene zelluläre Vorgänge wie Phagozytose oder Zellteilung werden inhibiert (ORNELLES *et al.*, 1986; HAIDLE und MYERS, 2004).

Die Wirkkonzentration von Nocodazol wurde durch AK-Färbungen mit einem monoklonalen anti-Tubulin-Antikörper überprüft. In Lebendzellaufnahmen der Zelllinien PK18-5 und EK18-1 wurde in normalem Hanks-Hepes-Medium für jeweils 50 Bilder gefilmt und anschließend das Medium mit Hilfe einer Pasteurpipette komplett abgesaugt. Das mit den Inhibitoren versetzte Hanks-Hepes-Medium wurde vorsichtig auf die Zellen pipettiert und die Schärfenebene nachreguliert – so konnte ohne Unterbrechung weiter gefilmt werden.

3.2.3.6 Hemmung der Mikrotubuli-abhängigen Transportvorgänge durch Nocodazol

Das Benzimidazolderivat Nocodazol (Methyl [5-(2-thienylcarbonyl)-1H-benzimidazol-2-yl] carbamate) baut Mikrotubuli reversibel ab und verhindert die Neubildung durch Hemmung der Polymerisation von β -Tubulin (LIN und HAMEL, 1981; LUDUENA und ROACH, 1991). Somit werden intrazelluläre Transportvorgänge sowie die Zellteilung blockiert.

Die Wirkkonzentrationen der Aktin-inhibierenden Drogen wurden Markierungen durch Fluoreszenzgekoppeltes Phalloidin überprüft. Die Zelllinien PK18-5 und EK18-1 wurden in normalem Hanks-Hepes-Medium für jeweils 50 Bilder gefilmt und anschließend das Medium komplett mit Hilfe einer Pasteurpipette abgesaugt. Das mit den Inhibitoren versetzte Hanks-Hepes-Medium wurde vorsichtig auf die Zellen gegeben und ohne Unterbrechung weiter gefilmt.

3.2.3.7 Markierung von Mikrofilamenten durch fluoreszenzmarkiertes Phalloidin

Phalloidin ist das Gift des weißen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*) und bindet Aktin zwischen den F-Aktinuntereinheiten, mit dem es feste Komplexe eingeht. Die Aktinfilamente werden durch fehlende Depolymerisierung stabilisiert. Durch Kopplung von fluoreszierenden Farbstoffen an das Phalloidin können die Aktinfilamente in Zellen lokalisiert werden. Verwendet wurde Phalloidin TexasRed (rote Fluoreszenz) oder Phalloidin Alexa Fluor 488 (grüne Fluoreszenz) von Invitrogen. Die mit Methanol und Aceton fixierten Zellen wurden eine Stunde mit dem markierten Phalloidin bei RT inkubiert, kurz mit Wasser gewaschen und anschließend mit Elvanol/DAPI eingedeckelt.

3.2.3.8 Zellfusion mittels Polyethylenglykol

Polyethylenglycol (PEG) ist ein wasserlösliches Polymer, welches die Hydrathüllen von Zellen zerstört. Anschließend wird die Verschmelzung der Plasmamembran induziert, es entsteht eine Hybridzelle mit zwei Zellkernen, ein sogenanntes Heterokaryon (PARAMIO und JORCANO, 2001).

Für die Fusion von Zellen mit verschiedenen Eigenschaften wurden die unterschiedlichen Zelllinien in der Verdünnung 1:10 geteilt und im gleichen Verhältnis auf Glasplättchen ausgesät. Die Zelllinien wurden so lange mit Trypsin behandelt, bis Einzelzellen vorlagen und die Zellkulturschale gut geschwenkt, um eine optimale Durchmischung beider Zelllinien zu erhalten. Nach Inkubation über Nacht oder für vier Stunden im Brutschrank bei 37°C hatten sich alle Zellen abgesetzt und ausgebreitet. Zunächst wurden die Zellen mit DMEM/Serum-freiem Medium gewaschen und anschließend sämtliche Flüssigkeit komplett abgesaugt. PEG 1500 Roche (50%-ige Lösung) wurde für eine Minute auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde dreimal mit DMEM-Medium ohne Serum gewaschen. Nach verschiedenen Inkubationszeiten bei 37°C (30 min, 1 Std, 3 Std und 5 Std) wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Methanol und Aceton fixiert.

3.2.3.9 Wundheilungsversuche (Scratch-Assay)

Die Zellen wurden auf Glasbodenschalen ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Mikroinjektionsnadeln wurden mit Hilfe des Micropipette Pullers (P-87) aus Glaskapillaren (GB 100F-10) hergestellt. Nach Austausch des Kulturmediums durch Hanks-Hepes-Medium wurde mit der Mikroinjektionsnadel ein Kratzer quer über den mit Zellen bewachsenen Glasboden gezogen. Anschließend wurden im Abstand von 10 bis 20 min Fluoreszenz- und Phasenkontrast-Aufnahmen der Zellen links und rechts neben dem Wundrand aufgenommen, bis wieder ein konfluenter Zellrasen vorlag.

3.2.4 Histologische Methoden

3.2.4.1 Fixierung von kultivierten Zellen

Zellen, die mit Plasmid-DNA transfiziert oder mit Drogen behandelt wurden, können durch Fixierung haltbar gemacht werden. Bei immunzytochemischen Analysen mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper sind die nachzuweisenden Proteine erst nach Fixierung der Zellen zugänglich.

Unlösliche Antigene werden durch Inkubation mit Methanol und Aceton fixiert. Hierbei wird das Zellinnere entwässert und die Proteine präzipitiert. Lösliche Proteine werden bei dieser Methode ausgewaschen; diese können durch Paraformaldehyd fixiert werden. Die Proteine werden stark vernetzt und die Zellmembran durch anschließende Behandlung mit Detergenzien permeabilisiert.

3.2.4.1.1 Methanol und Aceton-Fixierung

Für die Darstellung des IF-Netzwerkes wurden die Zellen mit Methanol fixiert und durch Aceton-Inkubation die Zellmembran permeabilisiert. Auf Deckgläschen ausgesäte und anschließend transfizierte oder mit Drogen behandelte Zellen wurden mit auf 37°C erwärmten PBS gewaschen. Die Glasplättchen wurden vorsichtig aus der Zellkulturschale entnommen und zur Weiterbehandlung in einen Plättchenständer überführt. Die Fixierung erfolgte durch fünfminütige Inkubation in eiskaltem Methanol bei -20°C, gefolgt von der Inkubation in eiskaltem Azeton für 15 s. Die Trocknung der Zelle erfolgte bei RT durch Luft.

3.2.4.1.2 Paraformaldehyd-Fixierung

Die auf Deckgläschen ausgesäten Zellen wurden vorsichtig aus der Zellkulturschale herausgeholt und in einer Plättchenständer überführt und anschließend mit auf 37°C erwärmten PBS gewaschen. Jeweils ein Plättchen wurde mit 50 µl 3%-igem Paraformaldehyd für 10 min bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die Zellen für 15 min mit vorgekühlten PBS (4°C) gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellwände für nachfolgende immunozytologische Färbungen wurden die Plättchen für circa eine Minute mit 0,01% Digitonin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS (15 min bei RT) gewaschen.

Mit sh-RNA-Oligonukletodiden transfizierte Zellen müssen mit Paraformaldehyd fixiert werden, da hier eine vollständige Durchlöcherung der Membran erreicht werden muss, um die angekoppelten fluoreszierenden Proteine zu detektieren.

3.2.4.2 Immunzytochemische Markierung durch Antikörper

Endogene Zytoskelett-Proteine (IFs, MF und MT sowie Desmosomen) werden über immunzytochemische Anfärbungen mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. Auf Glasplättchen kultivierte Zellen wurden nach der Fixierung und Permeabilisierung erneut für 15 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurden unspezifische Bindungstellen mit 5% BSA (in PBS) blockiert, die Inkubation erfolgte für 15 min bei RT. Nach weiterem Waschen mit PBS (15 min) wurden 50 µl der mit PBS verdünnten Primär-Antikörperlösungen (siehe Tabelle 11) auf jeweils ein Glasplättchen vorsichtig aufgetragen und für zwei Stunden bei 4°C inkubiert. Das Epitop des Sekundär-Antikörpers muss gegen die Spezies des Erst-Antikörpers gerichtet sein. An seinen Fc-Teil sind fluoreszierende Proteine angekoppelt, so dass die entsprechenden Proteine durch Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden können. Nach weiterem Waschen mit PBS (15 min RT) wurde der Sekundär-Antikörper in entsprechender Verdünnung (siehe Tabelle 12) für 1 Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut für 15 min in PBS gewaschen, kurz in A. dest. gespült und in Elvanol eingedeckelt.

3.2.4.3 Einbetten von Zellen und DAPI-Kernfärbung

Zur Haltbarmachung und Lagerung der gefärbten Zellen wurde das gesamte Deckplättchen in Elvanol eingebettet. Für die Anfärbung der Zellkerne wurden dem Elvanol 5 µl DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid) hinzugefügt. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI bindet an AT-reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA und bildet stark-fluoreszierende DNA-DAPI-Komplexe. Eine zytoplasmatische Fluoreszenz ist nicht nachweisbar. Bei Anregung mit ultraviolettem Licht fluoreszierte DAPI im sichtbaren Bereich mit blauer Farbe (siehe Tabellen 41 und 43).

3.2.4.3.1 Herstellung von Elvanol und DAPI

1 g Mowiol 488 (Sigma-Aldrich) wurde in 4 ml 1x PBS (pH 8,0) unter Rühren für 16 Stunden gelöst. Anschließend wurden 2 ml Glycerin hinzugefügt und das Gemisch bei 13.000 x g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in 2 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -20°C eingefroren. 100 µg/ml Bisbenzimid (Boehringer Mannheim) wurden in Ethanol gelöst und 1:1000 in PBS verdünnt. Die Stammlösung hat damit eine Konzentration von 0,5 mg/ml, die Arbeitslösung durch Verdünnung mit Elvanol 0,1 µg/ml.

3.2.5 Mikroskopische Methoden

3.2.5.1 Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Fluoreszenzmikroskopie absorbieren die Fluorophore der Fluoreszenzfarbstoffe (z. B. EYFP oder Cy2 und Cy3) Licht einer spezifischen Wellenlänge (Tabelle 41) und werden damit zum Leuchten angeregt. Die Elektronen der fluoreszierenden Moleküle absorbieren Photonen und gelangen dadurch auf ein höheres Energieniveau; durch Rückfall in den energieärmeren Zustand wird wiederum Licht emittiert. Als Lichtquelle dient eine Quecksilberdampfampe, deren Licht mit Hilfe von optischen Filtern auf bestimmte Wellenlängen limitiert wird. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird auf das Okular des Mikroskops, auf eine digitale Fotokamera oder einen elektronischen Verstärker, einem Photomultiplier, weitergeleitet und detektiert.

Tabelle 41: Extinktion- und Emissionswerte verschiedener Fluorophore (Quelle: <https://www.micro-shop.zeiss.com>)

Fluorophor	Anregung/Extinktion (nm)	Emission (nm)
EYFP	514	526
ECFP	437	476
mRFP	585	608
mCherry	587	610
DsRed2	563	581
Cy3 (Indocarbocyanin/Carbocyanin 3)	549	562

Tabelle 41: Extinktion- und Emissionswerte verschiedener Fluorophore (Fortsetzung)

Fluorophor	Anregung/Extinktion (nm)	Emission (nm)
DAPI (4',6-Diamidin-2`-phenylindol-dihydrochlorid)	358	463
Cy2 (Carbocyanin 2)	489	503
Alexa Fluor 488	499	520
Texas Red-X (antibody conjugate Sulforhodamin)	596	613
AMCA blau	347	444

3.2.5.2 Lebendzellmikroskopie

Bei dem inversen Epifluoreszenzmikroskop (Olympus IX 70) wird das Präparat durch das Objektiv (Öl-Immersionsobjektiv 63 x 1,4) mit Hilfe einer Quecksilberdampflampe und eines Monochromators bestrahlt. Farbteiler trennen das anregende vom emittierenden Licht und leiten es auf eine digitale Fotokamera (IMAGO, TILL Photonics).

Für die Erstellung von Lebendzellaufnahmen wurden fluoreszierende Zelllinien auf Glasboden-Petrischaeln (MatTek) in Phenol-freiem Hanks-Hepes Medium (Tabelle 42) kultiviert. Das TILLvisION System (Till Photonics) ermöglichte die computergesteuerte simultane Aufnahme mehrerer Farbkanäle und des Phasenkontrastes (siehe Tabelle 43). Durchschnittlich wurden Filme von 1-2 Stunden Länge erstellt, alle 15 oder 20 Sekunden wurden die verschiedenen Bilder aufgenommen. Das Umschalten der verschiedenen Anregungswellenlängen erfolgte über den Monochromator. Das Mikroskop befand sich in einer beheizten Klimakammer bei 37°C; durch ein Piezo-Schrittmotor konnte die Schärfenebene manuell nachkorrigiert werden.

Tabelle 42: Hanks-Hepes-Medium für Lebendzellaufnahmen

Hanks-Hepes-Medium	
Hanks-Salzlösung (HBSS ohne Phenolrot)	200 ml
MEM <i>non-essential amino acid solution</i> (100 x)	2,2 ml
MEM <i>essential amino acid solution</i> (50 x)	4,5 ml
Pen/Strep (Endkonz.: 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)	2,2 ml
Fötale Kälberserum (FCS)	11,2 ml
N-Acetyl-L-Cystein (Endkonz.: 4,8 mM)	1 ml

3.2.5.3 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Das verwendete konfokale Laserscanning-Mikroskop TCS SP5 der Fa. Leica besteht aus einem inversen DMI 6000 CS Trino Mikroskop und CLSM-SP5-Punktscanningsystem mit verschiedenen Lasern (405 UV-Diodenlaser, Argonlaser, DPSS 561 Laser und Helium/Neon 633 Laser) und zwei Scaneinheiten (konventioneller und Resonanz-Scanner) sowie einer Klimakammer für Lebendzellaufnahmen bei 37°C.

Verschiedene Laserstrahlen entsprechend der fluoreszierenden Probe (siehe Tabelle 43) rastern punkt- oder linienförmig das Objekt ab. Der Resonanzscanner ermöglicht durch eine Abtastfrequenz von 8000 Hertz Aufnahmen von sich schnell bewegenden Objekten und wurde vor allem für Zeitrafferaufnahmen eingesetzt.

Die angeregten Fluorophore im fokussierten Laserstrahl werden durch ein Pinhole (Lochblende) auf einem lichtempfindlichen Empfänger über einen Photomultiplier detektiert. Somit wird das Licht ausserhalb der Fokusebene nicht abgebildet – der Streulichtanteil wird unterdrückt und damit die Hintergrundsignale ausgeblendet. Von dem Spectrophotometer Detector des SP5 wird ein punktförmiges Bild zusammengesetzt. Schnitte verschiedener Focusebenen können übereinander geschichtet werden und somit ein dreidimensionales Bild erzeugen. Die Aufnahmen wurden computergesteuert mit Hilfe der LAS-AF Software der Fa. Leica erstellt. Zeitserien wurden stets als Bildstapel aufgenommen, in Zeitabständen zwischen 20 Sekunden und 10 Minuten. Bei kürzeren Aufnahmeabständen wurde die Auflösung von 1024 x 1024 auf 256 x 512 Pixel verkleinert.

Tabelle 43: Individuelle Einstellung zur Darstellung von Fluorophoren am LSM

Fluorophor	Anregung (nm)	Laser
EYFP	514	Argon
ECFP	545	Argon
Cy2	488	Argon
Alexa Fluor 488	488	Argon
mRFP	561	DPSS
mCherry	561	DPSS
DsRed	561	DPSS
Cy3	561	DPSS
Texas Red-	561	DPSS
DAPI	405	UV
AMCA blau	405	UV
Cy5	633	HeNe
PA-GFP	405 Aktivierung 488 Aufnahme	UV Argon

3.2.5.3.1 Fluoreszenz-Rückkehr nach Photobleichen (FRAP)

Als Photobleichen bezeichnet man die irreversible, photochemische Zerstörung der Fluoreszenz eines Fluorophors durch intensive Bestrahlung mit Anregungslicht.

Zunächst wird die Fluoreszenzaktivität der Probe bestimmt. Ein bestimmter Bereich wird mit 100%iger Laseraktivität bestrahlt und damit die Fluoreszenz lokal zerstört. Durch Diffusion von markierten Proteinen aus der Umgebung in den Messbereich oder Neubildung der fluoreszenzmarkierten Proteine nimmt die Fluoreszenzaktivität wieder zu.

Die FRAP-Experimente wurden an dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop TCS SP5 (Leica Microsystems) durchgeführt. Zunächst wurden Schichtbilder der Zelle bei 488 nm Laserlicht aufgenommen. Zur Photobleichung wurde etwa die halbe Zelle mit dem 405 nm UV-Laser bei höchster Laserintensität bestrahlt. Anschließend wurden wieder Schichtbilder der gleichen Ebenen mit dem 488 nm Argonlaser bis zur vollständigen Fluoreszenzrückkehr aufgenommen.

3.2.5.3.2 Photoaktivierung durch Verwendung von photoaktivierbarem GFP

Das GFP-Molekül kann in zwei verschiedenen Zuständen vorliegen: als neutrales oder anionisches Phenolat. Es besitzt deshalb zwei Anregungsmaxima (397 nm, Hauptmaximum und Nebenmaximum bei 475 nm). Durch Bestrahlung mit UV-Licht kommt GFP hauptsächlich in der anionischen Form vor, dadurch verschiebt sich das Anregungsmaximum von 475 nm auf 488 nm. Außerdem erhöht sich die Fluoreszenzintensität etwa um das Dreifache. Durch Ersatz von Threonine 203 durch Histidin (T203H) wurde das photoaktivierbare GFP (PA-GFP) geniert, welches eine niedrigere Absorption am Nebenmaximum besitzt. Das Anregungsmaximum ist nicht verschoben, aber die resultierende Fluoreszenzemission ist leicht in den rotwelligeren Bereich hinein verschoben. Durch Bestrahlung mit 413 nm UV-Licht erhöht sich die Fluoreszenzintensität um das 100-fache (Patterson und Lippincott-Schwartz, 2002).

Auf Glasbodenschalen kultivierte Zellen wurden mit 4 µg/ml Plasmid-DNA und 5 µl Lipofectamine transfiziert. Nach 48 Stunden konnten transfizierte Zellen mit Hilfe des blauen Fluoreszenzlichtes identifiziert werden. Zur Photoaktivierung wurde der „FRAP-Wizard“ der LAS-AF Software benutzt. Zunächst wurden Schichtbilder der Zelle bei 488 nm Laserlicht aufgenommen. Jeweils eine halbe Zelle oder verschiedene Bereiche der Zelle wurden durch einmaliges Scannen bei höchster Laseraktivität des 405 nm UV-Laser im ROI- (*region of interest*) Modus und gleichzeitiger Reduktion des Hintergrundes photoaktiviert. Anschließend wurden wieder Schichtbilder der gleichen Ebenen wie vor der Aktivierung mit dem Argonlaser in Abstand von 10-30 min aufgenommen.

3.2.6 Elektronische Datenverarbeitung

Die Rohdaten der Fluoreszenzaufnahmen wurden durch die Programme TILLvisION oder LAS-AF als 16-oder 12bit-TIFF-Dateien exportiert. Schichtaufnahmen wurden in LAS-AF projiziert, Zeitrasteraufnahmen wurden mit Hilfe des Programms ImageProPlus (Media Cybernetics) zu Filmen zusammengesetzt und bearbeitet. Die Rohdaten der Einzel-Fluoreszenzaufnahmen wurden in Adobe Photoshop importiert und Tonwert- und Kontrastkorrekturen zur verbesserten Darstellung durchgeführt. Die Bilder, welche durch die Schwarz-Weiss-Kamera des Olympus-Mikroskop aufgenommen wurden, wurden zur besseren Visualisierung nachträglich koloriert.

3.2.6.1 Computergestützte 3D-Datenanalyse

Weitere Datenanalysen der Zeitrasterfluoreszenzaufnahmen erfolgten mit Hilfe des Datenvisualisierungsprogrammes Amira (Indeed Visual Concepts). Für die Lokalisierung der auftretenden KFPs an FAs wurden die Filme bei hoher Vergrößerung rückwärts abgespielt und die x/y/t-Position des ersten Auftauchens der Vorläufer manuell im entsprechenden Frame mit einem grünen Punkt markiert. Hiefür mußte die Fluoreszenzintensität dieses auftauchenden KFPs signifikant höher als die des Hintergrundes (wahrscheinlich durch den löslichen Keratinpool verursacht) liegen. Neu auftretende KFPs wurden solche gewertet, die mindestens 4 Pixel groß waren (1 Pixel entspricht etwa 120 nm) und die Bewegung in nachfolgenden Bildern detektiert werden konnte. Alle manuell markierten KFP-Punkte wurden in die FA-Bilder übertragen und die Abstände zwischen den markierten KFPs und den FAs gemessen. Die Ergebnisse wurden in Excel (Microsoft, Richmond, USA) übertragen und als Diagramm dargestellt.

4. Ergebnisse

4.1 Dynamik von IF-Netzwerken

Unklar ist, ob der *in vitro* beobachtete Filamentzusammenbau der IFs auch auf die *in vivo*-Situation übertragbar ist. Zur Untersuchung des dynamischen Turnovers des Keratinnetzwerkes sollten Zelllinien etabliert werden, welche Keratine gekoppelt an fluoreszierende Proteine synthetisierten. Mit Hilfe von Zeitrafferaufnahmen sollten vor allem die Entstehung und Veränderung des Keratinfilamentnetzwerkes in sich bewegenden Zellen untersucht werden, um zu Grunde liegende Mechanismen aufzuklären.

4.1.1 Das Keratinfilament-Netzwerk wird in Lamellipodien von migrierenden Epithelzellen ständig erneuert

Etablierung der epithelialen stabilen Zelllinie EK18-1

Auf der Suche nach einem geeigneten epithelialen Zellkultursystem zur Untersuchung der Dynamik von KFs und des KFP-Turnovers wurde eine Zelllinie ausgewählt, die sich besonders gut für hochauflösende Lebendzellmikroskopie eignet. EpH4-Zellen stammen aus dem murinen Brustepithel (FIALKA *et al.*, 1996) und wurden von L. Huber zur Verfügung gestellt (OLIFERENKO *et al.*, 2000). Sie besitzen extrem dünne und außergewöhnlich große Lamellipodien, in denen sich markierte Zytoskelett-Strukturen besonders gut darstellen lassen (Abb. 12 A).

Da sich diese Zelllinie nur mit geringer Effizienz transfizieren lässt, wurde ein retrovirales Gentransfersystem zur Herstellung von stabilen Zellklonen etabliert. Zunächst wurde die HK18-YFP-cDNA in viralen Expressionsvektoren kloniert: Die HK18-YFP-cDNA wurde mit XhoI und NotI aus dem Vektor pHK18-YFP herausgeschnitten und das 2 kb große Fragment zwischen die beiden retroviralen Erkennungssequenzen 5'- und 3'-LTR in den retroviralen Vektor pLNCX2 eingefügt. Es resultierte das Plasmid rLNCX2-HK18-YFP. Zudem wurde die cDNA HK18-YFP aus pHK18-YFP mit Hilfe der Enzyme EcoRI und HpaI herausgeschnitten und in den retroviralen Vektor pLXSN wieder einligiert, welcher im Gegensatz zu pLNCX2 keinen CMV-Promotor besitzt. Das resultierende Plasmid wurde rLXSN-HK18-YFP bezeichnet.

Zur Herstellung einer stabilen Zelllinie wurde zunächst die Verpackungszelllinie PT67 mit 4 µg DNA des Plasmids pLNCX2-HK18-YFP mit der Hilfe von Lipofectamine (Invitrogen) transfiziert. Der Kulturüberstand der PT67-Zellen, welcher die infektiösen Viruspartikel enthielt, wurde nach 48 Std durch einen 0,45 µm Acetatfilter filtriert und das resultierende Virenfiltrat auf die etwa 70% konfluenten EpH4-Zellen gegeben. Selektion, Vereinzelung und Kultur der entstandenen Klone sind in 3.2.3.3.2 beschrieben.

Der im folgenden verwendete Zellklon EK18-1 besitzt extrem gleichmäßig ausgeprägte Keratinnetzwerke (siehe Übersicht in Abb. 12 B). Der Nachweis der fluoreszierenden

Keratinkonstrukte erfolgte proteinbiochemisch durch Auftrennung von Keratinextrakten von EK18-1- sowie EpH4-Zellen. Die Keratine wurden zum einen mittels Coomassie-Blau angefärbt (Abb. 12 C), zum anderen nach Western-Blot-Transfer durch Antikörpermarkierung nachgewiesen (Abb. 12 C'). Das humane K18 ist 48 kDa groß, YFP 27 kDa und das Fusionsprotein 75 kDa (Sternchen* in Abb. 12 C und C'). Sowohl in der Coomassie-Färbung als auch im Western-Blot wurde außerdem noch der Dimerpartner von K18, K8 (54 kDa) detektiert (Abb. 12 C und C').

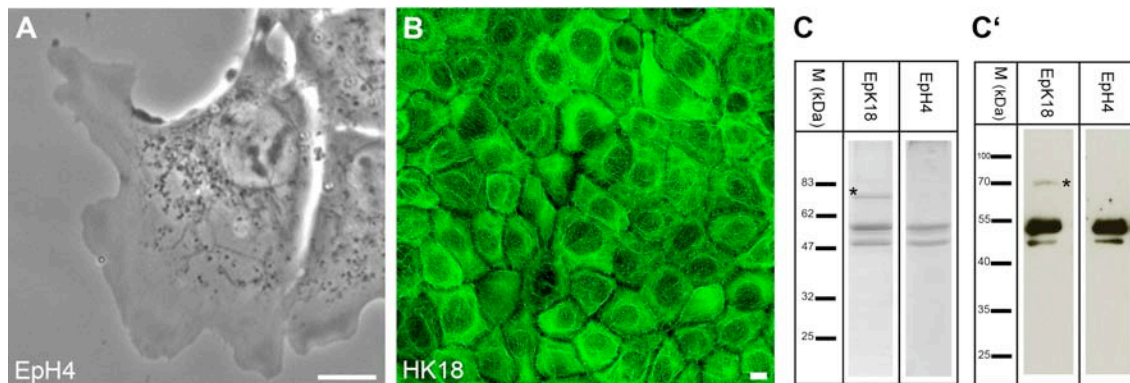


Abb. 12: Übersicht über den EK18-1-Zellklon. Abb. 12 A zeigt eine Phasenkontrastaufnahme einer EpH4-Zelle, die auf ihrer linken Seite ein großes Lamellipodium aufweist. (B) Die konfokale Laserscanning-Aufnahme des EK18-1-Zellklons zeigt eine homogene Expression des Plasmids rHK18-YFP. (C) Die spezifische Expression der fluoreszierenden Keratine wurde nach SDS-Auftrennung von Keratinextrakten durch Coomassie-Blau-Färbung (C) und Antikörpermarkierung mit einem anti-pan-Keratin-Antikörper und einem Sekundär-Antikörper mit gekoppelter HRP nach Western-Blot-Transfer (C') überprüft. Das fluoreszierende Fusionsprotein ist mit einem Sternchen gekennzeichnet und besitzt eine Größe von etwa 75 kDa. Es wurde nur in der EK18-1 Zelllinie, aber nicht im Wildtyp (Eph4), mit beiden Methoden nachgewiesen. Die endogenen K8 und 18 der EpH4-Zellen besitzen eine Größe von 54 bzw. 48 kDa. Größenbalken: 10 μ m.

Die EK18-1-Zelllinie besitzt dynamische Keratinfilamente

Für die Charakterisierung der KFs in dem neu etablierten epithelialen Zellklon EK18-1 wurden detaillierte Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen angefertigt, um zu klären, ob dieser Zellklon als Modell für die Untersuchung des KFP-Turnovers geeignet ist. Auch in dieser Zelllinie werden die KFPs in der Zellperipherie gebildet (siehe Film 1).

Abb. 13 zeigt Bilder verschiedener Zeitabstände des Films 1. Die Keratinnetzwerke der EK18-1-Zellen sind in der gesamten Zelle ausgebreitet, in der Peripherie sind kurze Filamentstücke, die KFPs, zu erkennen (Abb. 13 A und A' mit Pfeilen). Dank der flachen und ausgebreiteten Lamellipodien können sie gut dargestellt und verfolgt werden. Die Pfeile in Abb. 13 A' (nach 5 min) und A'' (nach 10 min) weisen auf entstehende KFPs in Nachbarschaft zu der Plasmamembran hin. Sie bewegen sich in Richtung des Zellzentrums, wo sie mit weiteren KFPs verschmelzen (Kreise in Abb. 13 A'') und über ihre Enden in das periphere Netzwerk integriert werden.

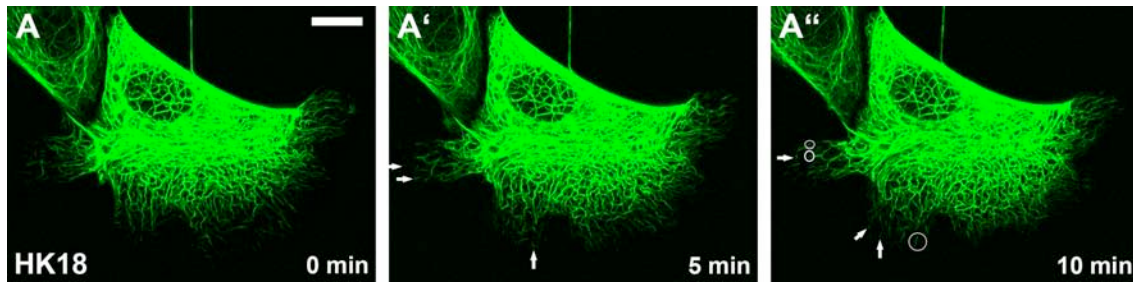


Abb. 13: EK18-1-Zellen bilden KFPs in Lamellipodien. (A) Die konfokale Lebendzellaufnahme (Film 1) zeigt eine EK18-1-Zelle, welche ein fluoreszierendes Keratinnetzwerk besitzt. In der Peripherie kann die Entstehung von KFPs in direkter Nachbarschaft zur Plasmamembran (Pfeile in A' und A'') und ihre anschließende Wanderung in Richtung Zellzentrum beobachtet werden. Dort findet die Fusion mit zuvor entstandenen KFPs und die folgende Integration ins periphere Netzwerk statt (Kreise in A''). Größenbalken: 10 μm .

EK18-1-Zellen wandern nach Verwundung aufeinander zu

Der EK18-1 Klon ist durch seine sich ständig verändernden Lamellipodien prädestiniert für Untersuchungen der dynamischen Eigenschaften der KFPs in Situationen, die Umstrukturierung und Neuorganisation der KFs erfordern. Wundheilungsversuche wie Scratch-Assays von Zellkulturverbänden ahmen die *in vivo* Wundschließung nach und geben Auskunft über das Verhalten von Zellverbänden. In konfluenten Monolayern des EK18-1-Klons wurden mit Hilfe einer Mikroinjektionsnadel künstliche Wunden erzeugt und anschließend durch konfokale Lebendzellaufnahmen die Wundschließung und Veränderungen des Keratinnetzwerks beobachtet (siehe Film 2). Abb. 14 zeigt eine EK18-1-Zelle in verschiedenen Zeitabständen nach der Verwundung. Alle Zellen des Monolayers beginnen sofort und kontinuierlich aufeinander zuzuwandern, bis die Wunde wieder geschlossen ist (nach etwa 5,5 Stunden in Film 2, siehe auch Abb. 14 A''').

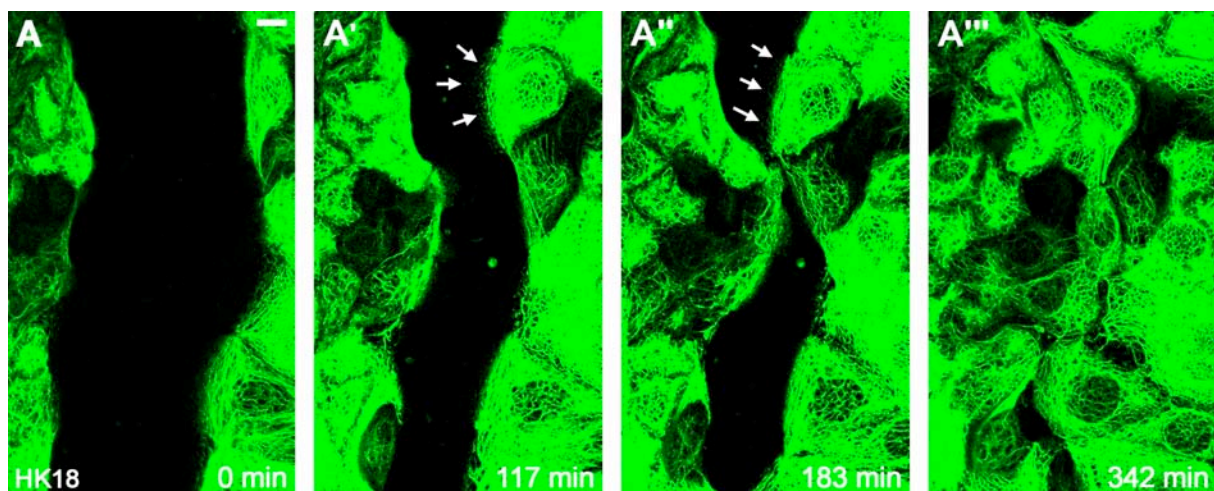


Abb. 14: Zellverbände reorganisieren ihre Keratinnetzwerke nach Verwundung. (A-A''') Konfokale Lebendzellaufnahmen (Film 2) zeigen einen konfluenten Monolayer von EK18-1-Zellen, welche sich nach Verwundung durch eine Mikroinjektionsnadel (Scratch-Assay) kontinuierlich aufeinander zu bewegen, bis der Wundverschluß stattgefunden hat (A''', nach 5,5 Std). In den Zellen am Wundrand werden große Mengen an KFPs gebildet (Pfeile in A' und A''), welche neue Keratinnetzwerke etablieren und somit die Zellen nach vorne befördern. Größenbalken: 10 μm

Das Keratinnetzwerk wird während der Migration reorganisiert: Die Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen zeigen die Entstehung von ungewöhnlich vielen Filamentvorläufern in der Zellperipherie der Wundrandzellen, die kontinuierlich in Richtung Zellzentrum strömen (siehe Pfeile in Abb. 14 A' und A''). Diese KFPs etablieren in den sich zum Wundrand hin ausbreitenden Lamellipodien der wandernden Zellen neue Keratinnetzwerke und könnten somit die Zellen am Wundrand beständig nach vorne schieben.

Migrierende EK18-1-Zellen bilden kontinuierlich KFPs

Um bei dem beobachteten Migrationsprozess die Bildung der KFPs detaillierter untersuchen zu können, wurden EK18-1-Zellen in geringer Dichte ausgesät. Die resultierenden Einzelzellen wandern spontan über das Glasbodenschälchen und bilden außergewöhnlich große Lamellipodien aus. Lebendzell-Fluoreszenzaufnahmen der migrierenden Zellen zeigen die rasche Entstehung vieler Filamentvorläufer an der Zellfront der sich ausbreitenden Lamellipodien (siehe Film3). Abb. 15 zeigt eine EK18-1-Zelle am Anfang und Ende eines 15-minütigen Films (Film 3).

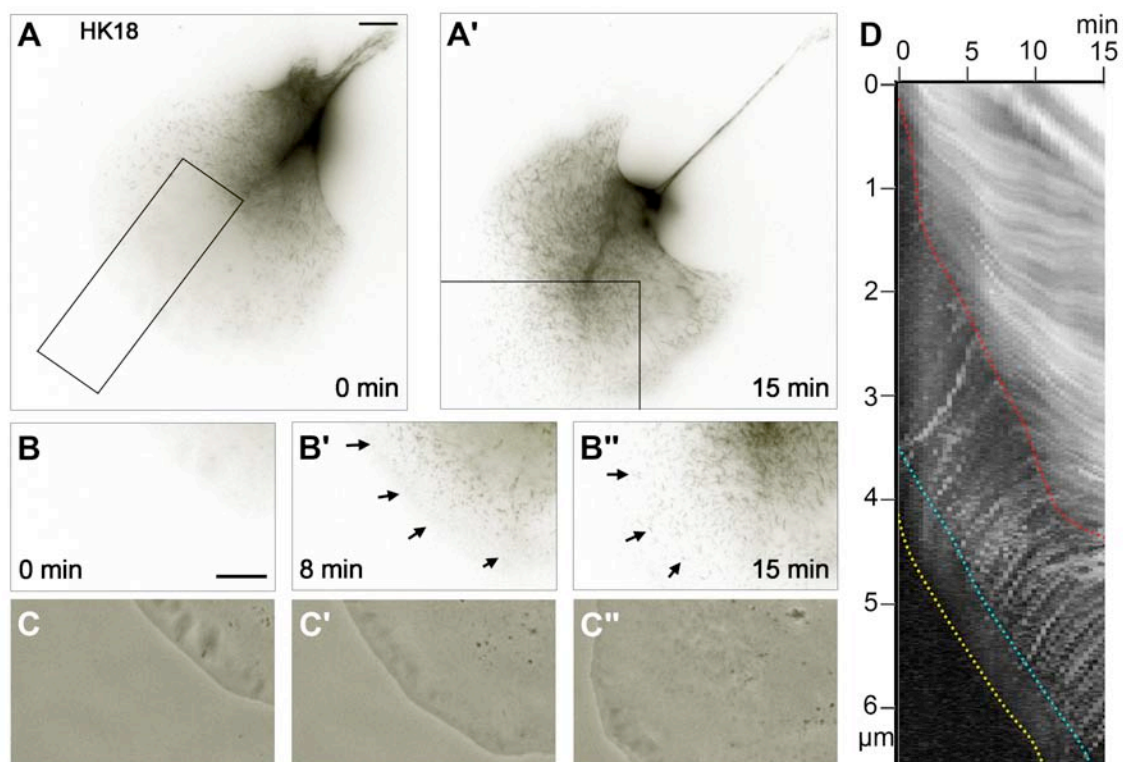


Abb. 15: KFPs entstehen an der Zellfront von migrierenden Zellen. Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen sowie Phasenkontrastaufnahmen einer wandernden EK18-1-Zelle zeigen die Entstehung vieler KFPs in in der Zellfront des sich ausdehnenden Lamellipodiums (Film 3). (A) zeigt das erste Bild, (A') die sich fortbewegende Zelle nach 15 min. (B) Vergrößerte Ausschnitte demonstrieren die Bildung der KFPs in der Peripherie des sich ausbreitenden Lamellipodiums (Pfeile). In (C) sind die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen dargestellt. (D) Das Kymogramm (Ausschnitt gekennzeichnet in A') demonstriert die Bildung der KFPs zwischen der gelben (Plasmamembran) und der blauen Linie, den anschließenden zentripetalen Transport und ihre Integration ins periphere Netzwerk (rote Linie). Größenbalken: 10 μm .

In den vergrößerten Fluoreszenzaufnahmen ist die schnelle Bildung vieler KFPs deutlich zu erkennen (siehe Pfeile in Abb. 15 B' und B''). Die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen in Abb. 15 C-C'' demonstrieren das Fortschreiten des Zellrandes.

Veränderung von Strukturen über einen Zeitraum lassen sich mit Hilfe von Kymogrammen darstellen. Diese wurden angefertigt, um die Bewegung der KFPs zu analysieren. Das Kymogramm in Abb. 15 D entspricht dem eingezeichneten Ausschnitt in Abb. 15 A und verweist auf verschiedene Geschwindigkeitszonen und Bewegungsrichtungen innerhalb des Lamellipodienrandes. Im Bereich der eingezeichneten blauen Linie unterhalb der Plasmamembran (diese entspricht der gelben Linie) wurde die Entstehung der KFPs beobachtet. Im Anschluß daran werden diese nach Innen transportiert (Bereich zwischen der blauen und der roten Linie), und schließlich ins periphere Keratinnetzwerk integriert (rote Linie). Nach der Integration in das periphere Netzwerk bewegen sich die KFs in die gleiche Richtung wie die migrierende Zelle (Bereich überhalb der roten Linie).

4.1.2 KFPs bilden sich in der Nachbarschaft zu fokalen Adhäsionen

Auf der Suche nach Nukleationszentren der Keratinfilamententstehung wurden verschiedene Orte vorgeschlagen, unter anderem der Nukleus und Desmosomen (siehe 2.1.6.1). Weiterhin ist aber unklar, ob ein definierter Entstehungsort für die Bildung der KFs existiert. Unsere Lebendzelluntersuchungen zeigen die Entstehung von KFPs in der Zellperipherie unterhalb der Plasmamembran und schließen damit den Nukleus als Nukleationsort aus (siehe auch Abb. 13-15). In Zelllinien, die keine Desmosomen beinhalten, konnte ebenfalls die Entstehung von KFPs in der Zellperipherie beobachtet werden (WINDOFFER *et al.*, 2002). Wandernde Zellen etablieren in der sich durch Aktin-Polymerisation nach vorn bewegenden Zellfront neue Netzwerke. Da auch die neu entstehenden KFs unter anderem in einem Aktin-abhängigen Transport in Richtung Zellzentrum bewegt werden (WÖLL *et al.*, 2005), sollten die Verankerungspunkte der Aktinfasern, die fokalen Adhäsionen (GEIGER *et al.*, 2001), auf eine mögliche Beteiligung an der Nukleation von KFPs in der Zellperipherie hin untersucht werden. FAs dienen zum einen als Verankerungsstrukturen von Zellen in der extrazellulären Matrix und zum anderen als Signalüberträger zwischen dem Zellinneren und der Peripherie und könnten somit die Entstehung von KFPs beeinflussen. Es sollten Fluoreszenzaufnahmen verschiedener Komponenten der FAs zusammen mit den Wildtyp-KFs als auch mutierte Keratingranula durch Doppeltransfektionen der jeweiligen Plasmide hergestellt werden. Zudem sollten verschiedene KF-Isoformen in unterschiedlichen Zellsystemen untersucht werden. Durch Störung der FAs mittels eines Knock-Down von Talin sollte weiterhin untersucht werden, ob die FAs auch einen funktionellen Beitrag zur Bildung der KFs leisten. Hierfür sollten zunächst spezifische shRNA-Oligos hergestellt und in einen Expressionsvektor kloniert werden. Nach Transfektion in verschiedene Keratin-synthetisierende Zellklone sollten die Effekte in Lebendzellaufnahmen untersucht werden.

KFPs bilden sich in der Nähe von sich entwickelnden fokalen Kontakten

Zunächst wurden fluoreszierenden K18-Proteinchimäre zusammen mit fluoreszenzmarkierten Bestandteilen von FKs in EpH4-Zellen transfiziert, um die mögliche Beteiligung von Adhäsionskontakten an der Bildung von KFPs zu untersuchen. Dazu wurde das FK-Protein Paxillin ausgewählt, da es Bestandteil früher, noch nicht ausgereifter FAs, ist (siehe 2.1.3).

Die Lebendzellaufnahmen der doppeltransfizierten EpH4-Zellen zeigen die Entstehung der KFPs in unmittelbarer Nähe zu den Kontakten. In entstehenden Lamellipodien bilden sich zuerst die Adhäsionskomplexe und anschließend in ihrer direkten Nachbarschaft die Keratin-Vorläufer.

Abb. 16 zeigt fluoreszierende Lebendzellaufnahmen und Phasenkontrastaufnahmen (Film 4) eines sich ausbreitenden Lamellipodiums einer EpH4-Zelle (Abb. 16 A, Phasenkontrast), welche mit den Plasmiden pPaxillin-DsRed2 (Abb. 16 B) und pHK18-YFP (Abb. 16 C) transfiziert wurde. Das entstehende Lamellipodium in Abb. 16 A zeigt erst während seiner Ausbreitung (Abb. 16 A', nach 21 min) Paxillin-markierte FKs (Abb. 16 B'). Zum gleichen Zeitpunkt sind keine KFs detektierbar (Abb. 16 C'). Erst nach etwa 30 Minuten tauchen die ersten KFPs unterhalb der Plasmamembran, eingezeichnet als gelbe Linie, auf (Abb. 16 C''). Die übereinander gelegten Bilder in Abb. 16 D verdeutlichen die Ko-Lokalisierung der KFPs mit den Adhäsionen (Pfeile in D'''). Die 17 minütige, vergrößerte Bildsequenz in Abb. 16 E veranschaulicht die Bildung eines Paxillin-markierten FKs (Pfeilspitzen) gefolgt von der Entstehung eines Keratinvorläufers in direkter Nachbarschaft (Pfeile).

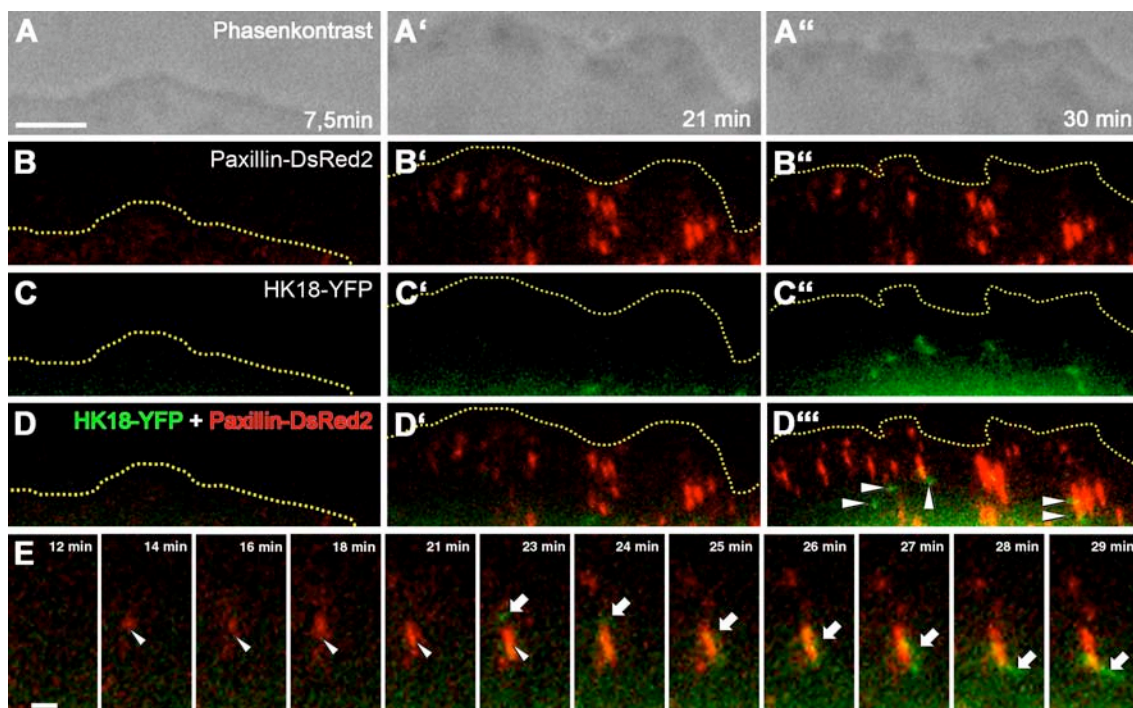


Abb. 16: KFPs entstehen in der Nähe von Paxillin-markierten FKs. Dargestellt sind Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen sowie Phasenkontrastaufnahmen (Film 4) einer EpH4-Zelle, die mit HK18-YFP-cDNA (grün) und Paxillin-DsRed2-cDNA (rot) transfiziert wurde. Zunächst bilden sich die FKs (B) in dem entstehenden Lamellipodium (A). Erst nach etwa 30 min können die ersten KFPs im Lamellipodium detektiert werden (Pfeile in D'''); diese befinden sich in direkter räumlicher Nähe zu den FKs (siehe vergrößerte Sequenz eines FKs im Ausschnitt E). Größenbalken 10 μ m.

KFPs entstehen an reifen fokalen Adhäsionen

Weiterhin wurde das FA-Adhäsionsprotein Zyxin gekoppelt an RFP zusammen mit fluoreszierenden K18-Proteinchimären in EpH4-Zellen transfiziert, um zu untersuchen, ob auch die reifen Adhäsionskontakte an der Bildung von KFPs beteiligt sind. Zyxin ist Bestandteil reifer FAs und wird erst in den Adhäsionskomplex integriert, wenn das Lamellipodium stabilisiert ist (GEIGER *et al.*, 2001). Lebendzellaufnahmen der doppeltransfizierten Zellen zeigen die Entstehung der KFPs in mittelbarer Nähe zu den reifen FAs. Abb. 17 D zeigt Bilder verschiedener Zeitabstände des Films 5, welche eine EpH4-Zelle mit einem ausgebreiteten Lamellipodium dargestellt. Deutlich ist die Entstehung der KFPs an den FAs nachzuvollziehen. Diese Zelle wurde mit HK18-YFP-cDNA (Abb. 17 B') und RFP-Zyxin-cDNA (Abb. 17 B'') transfiziert. Zur besseren Veranschaulichung wurden die an den FAs gebildeten KFPs anhand des Filmes bis zu ihrer Entstehung rückwärts verfolgt und diese Position in der über die gesamte Filmelänge projizierten Zyxin-Bildsequenz dargestellt (Abb. 17 C, in Amira 4 durchgeführt). Abb. 17 C zeigt die Entstehung der Filamentvorläufer an der Spitze der FAs. In Bereichen zwischen zwei Lamellipodien, in denen keine FAs auftreten (moduliert durch die gelbgepunktete Linie), konnten kaum KFPs nachgewiesen werden. Die dreiminütige, vergrößerte Bildsequenz in Abb. 17 D veranschaulicht die Bildung eines KFPs in direkter Nachbarschaft (innerhalb vier Pixel) einer Zyxin-markierten FA (markiert durch die Pfeilspitze).

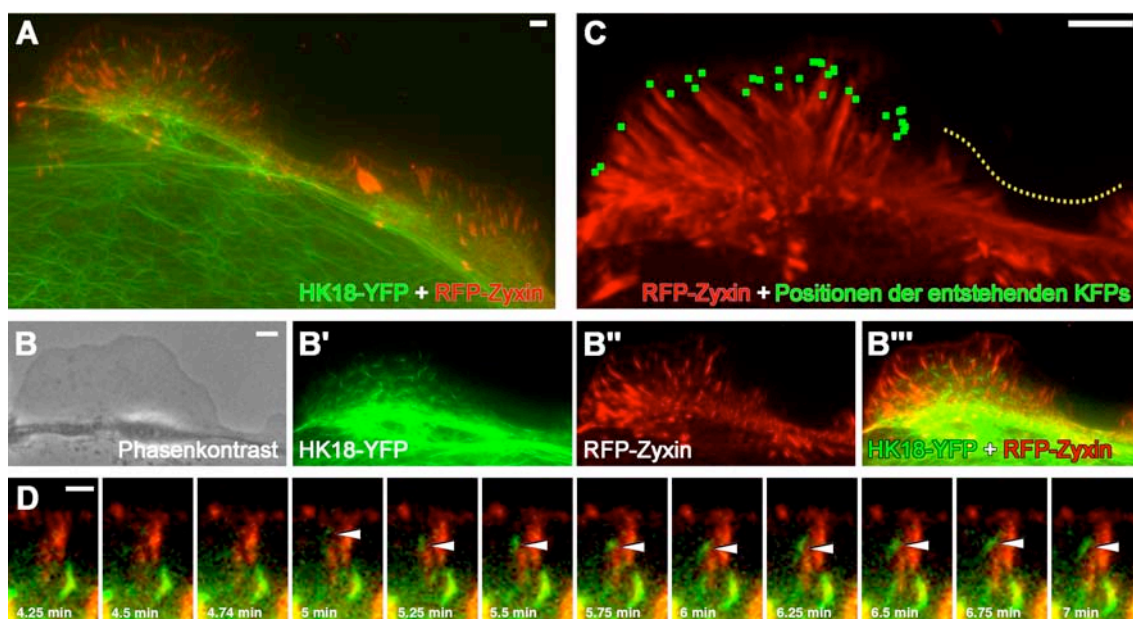


Abb. 17: KFPs entstehen in der Nähe von Zyxin-markierten FAs. (A) Lebendzellaufnahmen (Film 5) eines Ausschnittes einer EpH4-Zelle transfiziert mit cDNAs kodierend für HK18-YFP (B', grün) und RFP-Zyxin (B'', rot). Das linke Lamellipodium aus (A) ist in (B, Phasenkontrast), (C, HK-YFP) und (D, RFP-Zyxin) vergrößert dargestellt. (C) Projektion der 200 Zyxin-RFP darstellenden Bilder mit den manuell eingezeichneten Positionen der entstehenden KFPs. In Bereichen ohne FAs findet keine KFP-Bildung statt (gepunktete Linie). (D) Die vergrößerte Bildsequenz verdeutlicht die Bildung der Filamentvorläufer an den FAs (Pfeile). Größenbalken: 10 μm .

4.1.4.3 Talin-shRNA reduziert die Bildung von KFPs

Kurze haarnadelartige RNA-Sequenzen (shRNA, *short hairpin* RNA) bilden dsRNA mit einer Länge 21 Nucleotiden, welche spezifisch die Proteinexpression durch die Anlagerung an die jeweilige mRNA verhindern (PADDISON *et al.*, 2002). Das FA-Strukturprotein Talin wird sowohl in frühen FKs als auch in reifen FAs eingebaut (ZAIDEL-BAR *et al.*, 2004), weshalb der Knock-Down von Talin zu Störungen in den Adhäsionen führen sollte. Für den Knock-Down wurden zunächst shRNA-Expressionsplasmide hergestellt. Im Plasmid pTER-GFP wurde EGFP zu einem durch mRFP und zum anderen durch ECFP ersetzt, um mit weiteren farblich markierten Proteinen arbeiten zu können. Hierfür wurde die mRFP-cDNA mit den Primern 03-88 und 04-72 (siehe Tabelle 14) durch eine PCR amplifiziert, das Produkt mit NheI und XbaI geschnitten und in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor pTER-GFP einligiert. Das resultierende Plasmid wurde pTER-mRFP bezeichnet. Für das blau-fluoreszierende Expressionskonstrukt pTER-CFP wurde die EGFP-cDNA in pTER-GFP über eine Restriktion mit AgeI und PmeI durch ECFP-cDNA aus pCFP-N1 ersetzt. Die *annealten* shRNA-Sequenzen (siehe 3.2.1.10. und Tabelle 30) wurden nach Restriktion mit BglII und HindIII in den Vektor pTER-mRFP eingefügt. Das resultierende Plasmid wurde pshOligo-Talin-RFP bezeichnet. Die bereits in das Plasmid pTER-mRFP erfolgreich inklonierten shRNA-Oligonucleotide wurden über eine HindIII- und EcoRI-Restriktion ausgeschnitten und in pTER-CFP wieder eingefügt. Das resultierende Plasmid wurde pshOligo-Talin-CFP benannt.

Um die Spezifität der shRNA-Oligos testen zu können, wurden funktionslose Kontroll-shRNA-Oligos in die Plasmide pTER-mRFP und pTER-CFP eingefügt. Zum einen wurde das Kontroll-Oligo nach Verdau mit den Enzymen BglII und HindIII in den Vektor pmRFP-N1 eingefügt (pshKontroll-Oligo-RFP). Zum anderen wurde die mRFP-cDNA in pshKontroll-Oligo-RFP durch ECFP-cDNA nach Restriktion mit AgeI und PmeI ausgetauscht (pshKontroll-Oligo-CFP).

Knock-Down von Talin in EK18-1-Zellen inhibiert die KFP-Bildung

In EK18-1-Zellen, in denen Talin durch Transfektion von shOligoTalin-RFP bzw. shOligoTalin-CFP herunterreguliert wurde, ist die Entstehung von KFPs gehemmt. In Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen der transfizierten Zellen konnte während der gesamten Aufnahmedauer fast keine Bildung von KFPs beobachtet werden.

Abb. 18 zeigt verschiedene Lebendzellaufnahmen von transfizierten EK18-1-Zellen, in denen Talin durch herunterreguliert wurde (siehe Film 6). Die Synthese der Talin-shRNA ist durch die Ko-Expression von mRFP bzw. ECFP ersichtlich. Abb. 18 A zeigt Lebendzellaufnahmen aus Film 6. Dargestellt ist eine EK18-1-Zelle 48 Stunden nach der Transfektion; in Abb. 18 A' ist die Expression des CFP-Markers für die Talin-shRNA ersichtlich. Die übereinandergelegten Bilder in Abb. 18 A'' offenbaren den Verlust der KFPs im Lamellipodium der EK18-1-Zelle (Pfeile). Transfektion eines rot-

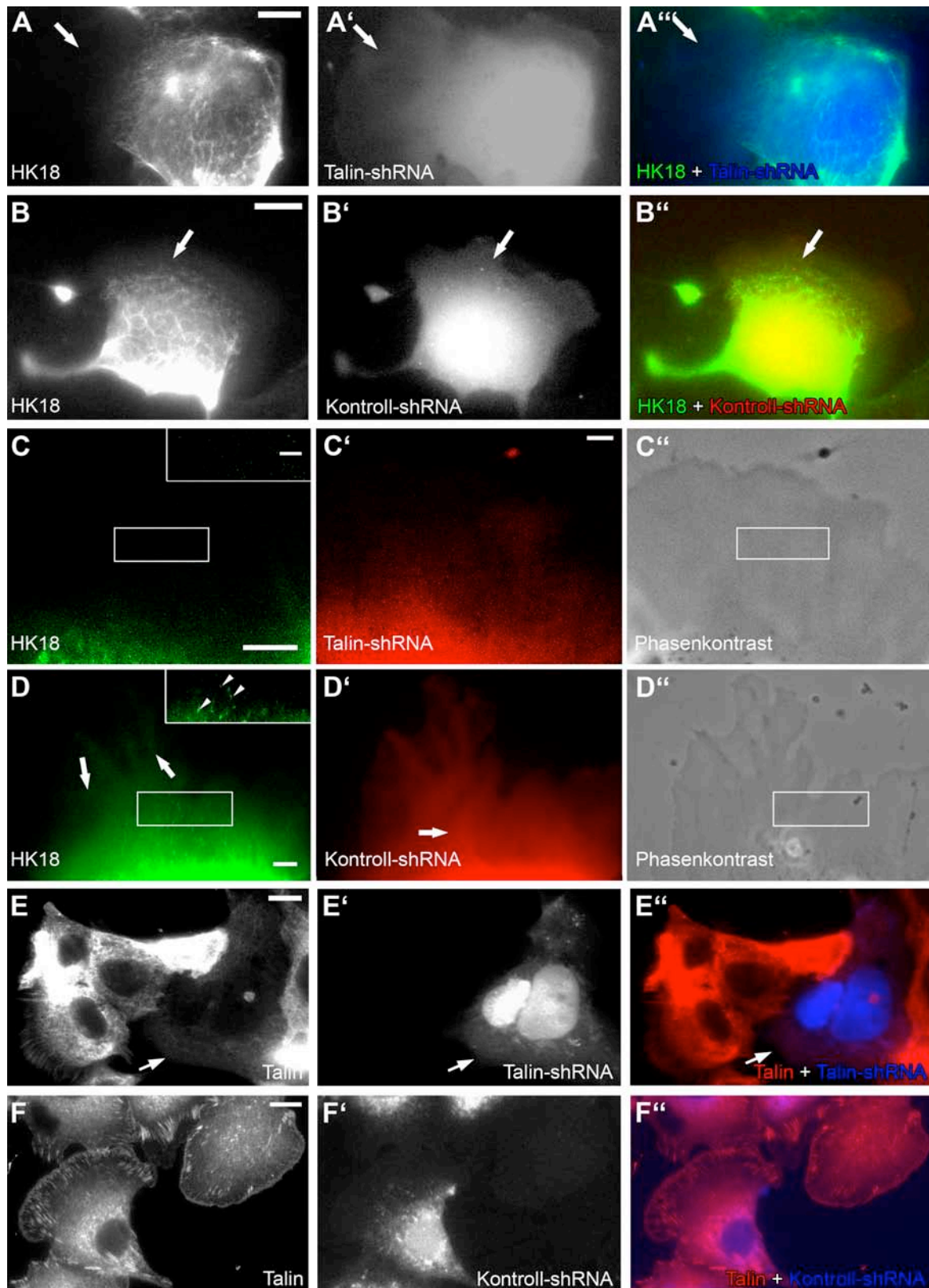


Abb. 18: Knock-Down von Talin in EK18-1-Zellen durch die Expression von Talin-spezifischer shRNA. (A-D) Lebendzellaufnahmen (Film 6) von Talin-shRNA-positiven Zellen (A', C') zeigen fehlende KFPs in der Zellperipherie (A, A'' und C, C''); welche in Zellen, die mit einem Kontroll-shRNA-Konstrukt transfiziert wurden, vorhanden sind (B, B'' und D, D''). Der spezifische Knock-Down wurde durch Antikörperfärbung kontrolliert (E, F). Fixierte und Talin-shRNA-synthetisierende Zellen (E') weisen kaum Talin-spezifischen FAs mehr auf (E, E'', Pfeile). Zellen, die mit dem Kontroll-shRNA-Konstrukt transfiziert wurden (F'), besitzen hingegen Talin-positive FAs (F, F''). Größenbalken: 10 μ m.

markierten Kontroll-shRNA-Konstrukts (Abb. 18 B') in EK18-1-Zellen resultiert in normaler KFP-Bildung (Pfeile in Abb. 18 B und B''). Betrachtet man eine Ausschnittsvergrößerung der Peripherie von EK18-1-Zellen, welche mit dem Plasmid pshOligoTalin-RFP transfiziert wurden, wird ein Schwund der KFPs in der Zellperipherie sowie der Rückzug der Filamente in die perinukleäre Region deutlich (Abb. 18 C, siehe auch vergrößerter Ausschnitt). Die Transfektion der mRFP-markierten Kontroll-shRNA-Konstrukte zeigen hingegen die normale Bildung von KFPs (Abb. 18 D, Pfeile im vergrößerten Ausschnitt).

Der spezifische und effiziente Knock-Down von Talin durch die Transfektion der shRNA-Konstrukte wurde durch immunozytochemische Analysen überprüft. EpH4-Zellen wurden mit dem Talin-shRNA-Oligo (Abb. 18 E) sowie dem Kontroll-shRNA-Oligo transfiziert (Abb. 18 F, Fehlfarbdarstellung) und 48 Stunden später mit 3% Paraformaldehyd fixiert. Eine Fixierung mit Methanol und Aceton führt zum Auswaschen der löslichen blauen bzw. roten Fluoreszenz, so dass positive Zellen nicht mehr zu erkennen waren. Nach Digitonin- und BSA-Behandlung erfolgte die Inkubation mit dem monoklonalen anti-Talin-Antikörper 8D4 in Kombination mit einem Cy2- bzw. Cy3-gekoppelten Sekundär-Antikörper. Die mit Talin-shRNA-Oligos transfizierte Zelle in Abb. 18 E' weist keine Talin-spezifischen FAs mehr auf (E, E'', Pfeile), nicht-transfizierte Zellen hingegen bilden Talin-markierte FAs aus (rechte Zellen in E', E''). Zellen, die das Kontroll-shRNA-Oligo herstellen (Abb. 18 F'), zeigen Talin-positive FAs (F, F'').

4.1.4 FA-abhängige KFP-Bildung ist unabhängig von Zelltyp und der Keratinisofom

In nicht-epithelialen SW-13-Zellen bilden sich ebenfalls KFPs in räumlicher Nähe der FAs

SW-13-Zellen stammen aus der Nebenniere und synthetisieren keine endogenen zytoplasmatischen IFs (VENETIANER *et al.*, 1983). Durch Transfektion von fluoreszenzmarkierten FA-Proteinen in diese Zellen sollte untersucht werden, ob die beobachtete Bildung der KFPs an den Adhäsionskomplexen in Epithelzellen von zelltypspezifischen Faktoren bestimmt wird. Der SK8/18-2-Zellklon synthetisiert stabil das Keratindimer 8 und 18 bestehend aus HK8-CFP und HK18-YFP (WÖLL *et al.*, 2005). Lebendzellaufnahmen dieser Zellen, die mit RFP-Zyxin-cDNA transfiziert wurden, zeigen ebenfalls die Bildung der KFPs an FAs (siehe Film 7).

Abb. 19 zeigt die Zellperipherie (A, Phasenkontrast) einer mit RFP-Zyxin-cDNA transfizierten SK8/18-2-Zelle (A''), die ein grün-fluoreszierendes Keratinnetzwerk besitzt (A'). Entstehende KFs können in enger Nachbarschaft zu den Zyxin-markierten FAs detektiert werden (Pfeile in der übereinandergelegten Darstellung in Abb. 19 B). Auch hier wurden die neu gebildeten KFPs anhand des Filmes bis zu ihrer Entstehung rückwärts verfolgt und diese Position in das projizierte rote Fluoreszenzkanalbild eingetragen. Abb. 19 A''' verdeutlicht die räumliche Nähe der entstehenden KFPs zu den FAs. In der Raum-Zeit-Darstellung in Abb. 19 C ist die Bildebene entlang der X-Achse (in rot dargestellt) und Y-Achse (in grün dargestellt) ausgebreitet, die gelbe Achse entspricht der

gefilmten Zeit. Die statischen FAs sind als orange Säulen abgebildet; der grüne Fluoreszenzkanal bewegt sich entlang der gelben Zeitachse. Neu gebildete KFPs entstehen an den säulenartigen FAs, vier sind farblich markiert (Abb. 19 C). Anschließend vergrößern sie sich und wandern in Richtung des Zellzentrums. Abb. 19 D zeigt einen vergrößerten Ausschnitt der Peripherie aus Film 7. Die 47-minütige Bildsequenz (Film 8) zeigt die wiederholte Bildung von KFPs an einer Zyxin-markierten FA (Minute 2,5; 17,5 und 37,5). Mehrere KFPs fusionieren miteinander und werden in Richtung Zellzentrum transportiert.

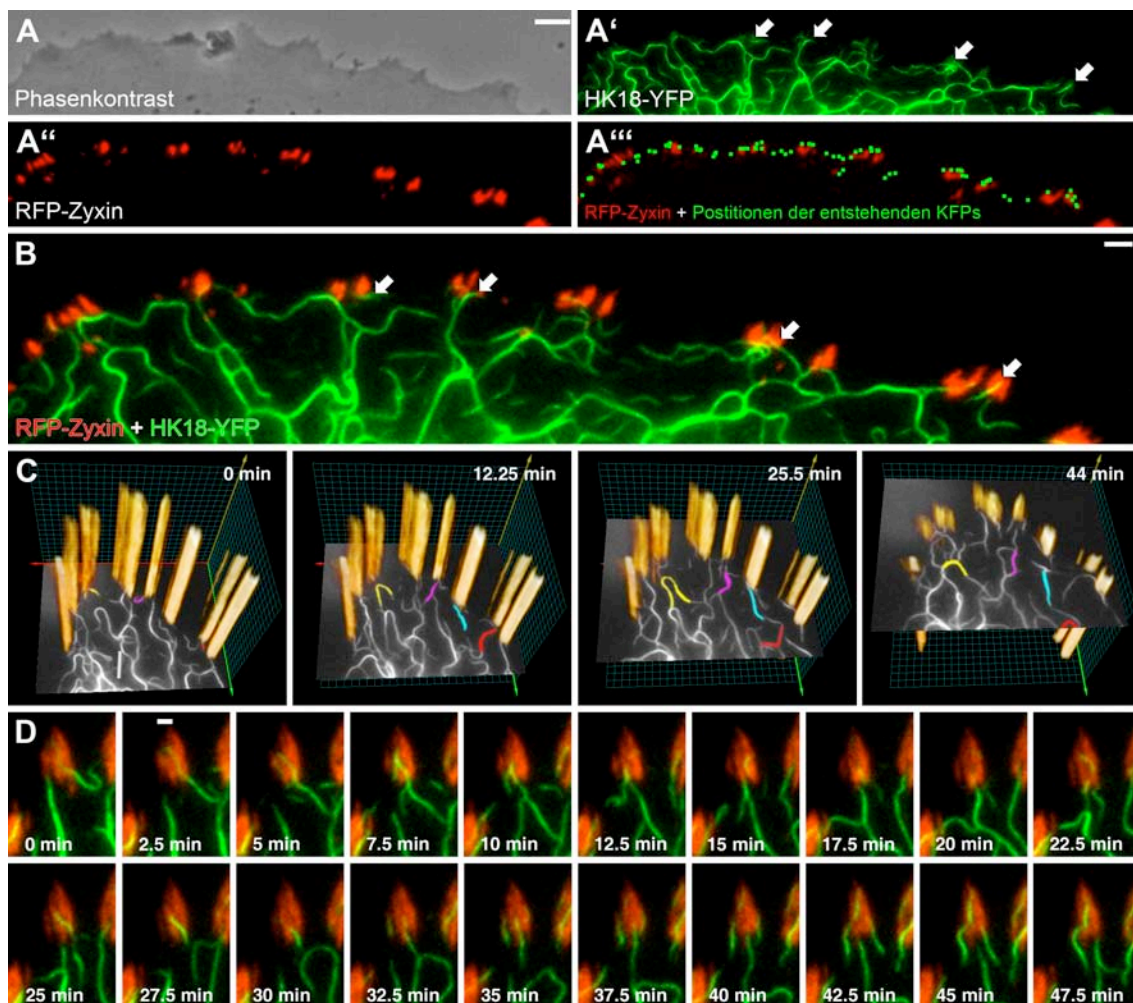


Abb. 19. Bildung von KFPs in unmittelbarer Nähe von FAs in nicht-epithelialen SW-13-Zellen. (A) Lebendzellaufnahmen (Film 7) einer mit RFP-Zyxin-cDNA transfizierten SK8/18-2-Zelle. Der vergrößerte Zellrand ist in (B) dargestellt. (A''') Projektion aller 200 Bilder des roten Fluoreszenzkanals mit den Positionen, bei denen die KFPs zuerst detektiert wurden. (C) Die 4D-Darstellung zeigt die statischen, als orange Säule dargestellten Adhäsionen und vier farblich markierte KFPs, welche an den Säulen entstehen und sich nach innen bewegen. (D) Die 47-minütige, hoch vergrößerte Bildsequenz aus Film 8, stellt zwei FAs dar. Mehrere KFPs bilden sich an einem FA, wachsen und fusionieren miteinander und wandern schließlich in Richtung des Zellzentrums. Messungen und Projektionen wurden von R. Windoffer durchgeführt. Größenbalken: 10 μm .

Keratin 14-Filamentvorläufer entstehen ebenfalls in enger Nachbarschaft zu FKs

Um zu überprüfen, ob die Bildung der KFPs an den Adhäsionskomplexen von Isotyp-spezifischen Faktoren bestimmt wird, wurde HK14-YFP-cDNA zusammen mit fluoreszenzmarkiertem Paxillin in EpH4-Zellen transfiziert. Lebendzellaufnahmen offenbaren ebenfalls die Bildung der K14-KFPs an FAs (siehe Film 9). Abb. 20 stellt die Transfektion von Paxillin-DsRed2-cDNA (A) und HK14-YFP-cDNA (A') dar: Die KFPs entstehen in enger Nachbarschaft zu den FAs (siehe übereinandergelegte Darstellung in Abb. 20 A'').

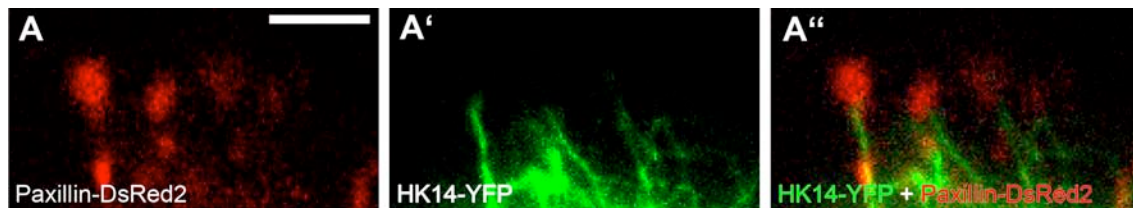


Abb. 20: KFPs entstehen Keratinisoforn-unspezifisch an Adhäsionskontakten. Lebendzell-Doppelfluoreszenzaufnahmen (Film 9) von EpH4-Zellen transfiziert mit Paxillin-DsRed2-cDNA (A) zusammen mit HK14-YFP-cDNA (A'). Die Filamentvorläufer entstehen im Bereich der rot-fluoreszierenden Adhäsionskomplexe (A'', B''). Größenbalken: 10 μ m.

4.1.5 FAs bestimmen die Bildung von pathologischen EBS-Aggregaten

Mutierte EBS-Keratine entstehen ebenfalls an fokalen Kontakten in MCF7-Zellen

Mutierte Keratine sind beispielsweise für die Hautkrankheit *Epidermolysis bullosa simplex* verantwortlich (siehe 2.2.1). In der Zellperipherie entstehen KFPs, welche sich nicht zu Filamenten, sondern nur zu kurzen, granula-artigen Keratinaggregaten entwickeln und sich schnell wieder auflösen (WERNER *et al.*, 2004).

Um den Entstehungsort dieser Keratingranula näher zu untersuchen, wurde das Plasmid pPaxillin-DsRed2 in MT5K14-26-Zellen, welche das mutierte Keratin 14R125C herstellen, transfiziert. Lebendzellaufnahmen dieser Zellen demonstrieren die Bildung dieser mutierten Keratingranula ebenfalls in direkter Nachbarschaft zu den FAs (siehe Film 10).

Abb. 21 A zeigt fluoreszierende Zeitrafferaufnahmen zweier MT5K14-26-Zellen, die Paxillin-DsRed2 synthetisieren. Die Zellperipherie ist als Ausschnitt in Abb. 21 B-B'' dargestellt. In der Zellperipherie befinden sich die runden Keratingranula; perinukleär sind noch Reste des Netzwerkes zu sehen. Die Fluoreszenzaufnahme läßt eine enge räumliche Nähe zwischen den Paxillin-markierten FKs (Abb. 21 B) und den mutierten Keratingranula (Abb. 21 B') erkennen (Abb. 21 B''). Eine Projektion aller Bilder des grünen Fluoreszenzkanals demonstriert die Wanderungsbewegung der Granula und ihr Verschwinden in einer distinkten Zone am Rand der Zellperipherie (Abb. 21 D). Die neu gebildeten KFPs wurden anhand des Filmes bis zu ihrer Entstehung rückwärts verfolgt und diese Position in das projizierte rote Fluoreszenzkanalbild eingetragen, welches die enge Nachbarschaft der entstehenden Keratingranula zu den FKs verdeutlicht (Abb. 21 D'). Die Bildsequenz in Abb. 21 C entspricht Film 11

und zeigt die wiederholte Bildung der mit 1-4 bezeichneten KFPs an einem durch Paxillin-DsRed2-markierten, vergrößert dargestellten FK.

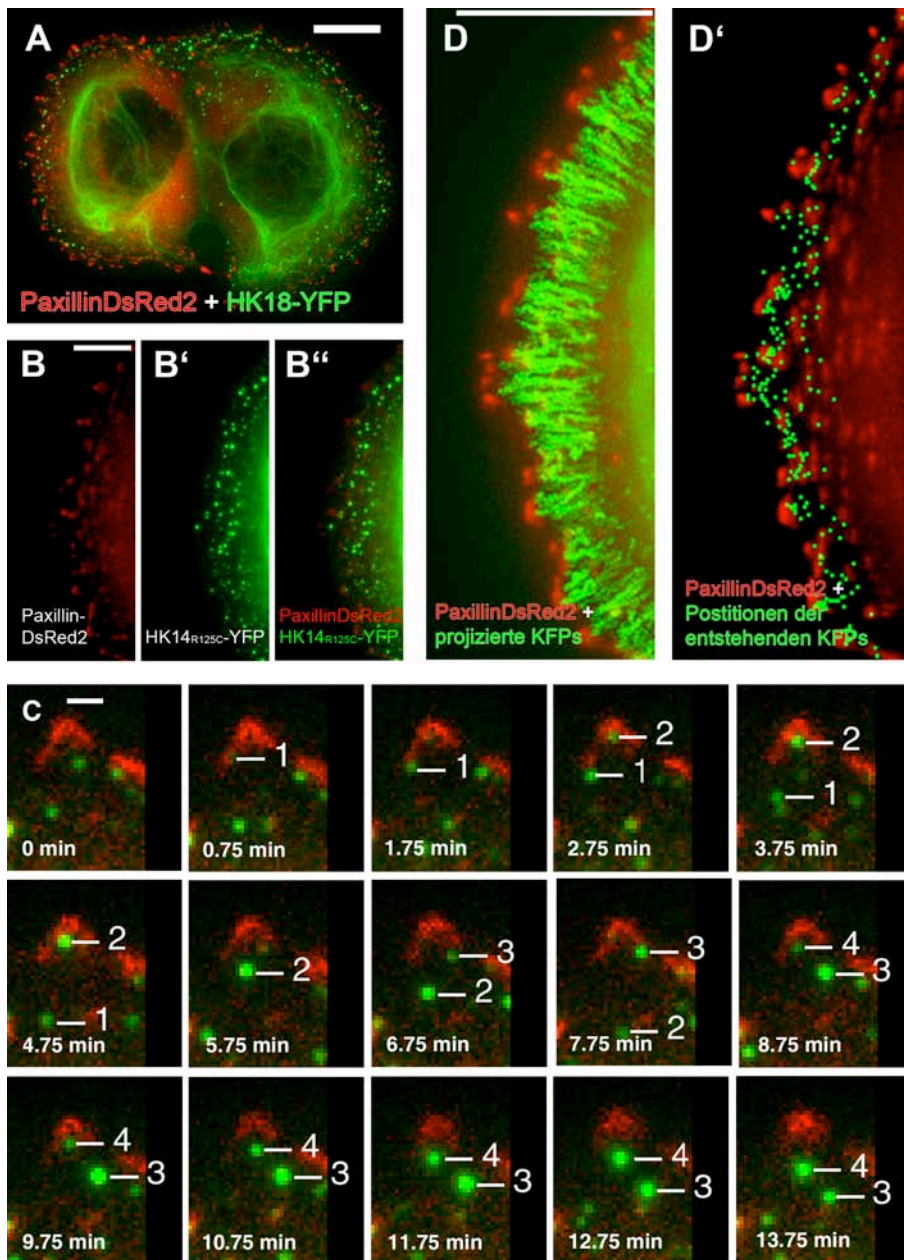


Abb. 21:
EBS-mutierte
Keratingranula
entstehen
ebenfalls an FAs.

Lebendaufnahmen (Film 10) von MT5K14-26 Zellen, die das FK-Protein Paxillin gekoppelt an DsRed2 herstellen, zeigen die Bildung der KFPs an FAs (A,B,C). Innerhalb weniger Minuten entstehen mehrere Granula in der Nähe eines Kontaktes. Die vergrößerte Zeitserie aus Film 11 zeigt eine FA in der Zellperipherie von (C). Die Darstellung der manuell definierten Entstehungsorte der KFPs zusammen mit der Projektion der Paxillin-Bilder zeigt die enge räumliche Nähe zwischen den entstehenden Keratingranula und den FAs (D). Größenbalken: 10 µm.

Mutierte EBS-Keratingranula entstehen in EpH4-Zellen ebenfalls an FAs

Um zu überprüfen, ob die beobachtete Bildung der mutierten Keratingranula in den MCF7-Zellen von zelltypspezifischen Faktoren determiniert sind, wurde die Plasmide pmRFP-Zyxin und pHK14_{R125C}-YFP in EpH4-Zellen transfiziert. Auch hier konnte in Lebendzellaufnahmen der transfizierten Zellen die Bildung der mutierten Keratingranula an den FAs beobachtet werden (siehe Film 12). Abb. 22 zeigt Lebendzellaufnahmen aus Film 12. Die synthetisierten Keratingranula sind in grün, (A') das FA-Protein Zyxin in rot dargestellt (A). In der übereinander gelegten Darstellung beider Bilder wird die Ko-Lokalisierung der Keratinaggregate an den FAs deutlich (A'').

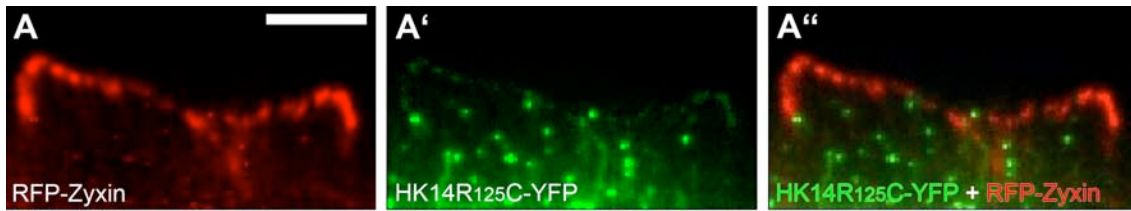


Abb. 22: Mutierte EBS-Keratingranula entstehen in Eph4-Zellen ebenfalls an FAs. Die Zeitrafferaufnahmen (Film 12) zeigen die Transfektion von Eph4-Zellen mit RFP-Zyxin-cDNA (A) sowie HK14R125C-YFP-cDNA (A'). Die KFPs entstehen ebenfalls im Bereich der rot-fluoreszierenden FAs (A''). Größenbalken: 10 μm .

Der Entstehungsort und der Entstehungszeitpunkt der KFPs wurden durch rückwärtiges Abspielen der Zeitrafferserien (Filme 4, 5, 7 und 10) determiniert. Alle KFPs, die während der aufgenommenen Zeit entstanden sind, wurden bei hoher Vergrößerung rückwärts verfolgt, bis sie knapp über der Hintergrundfluoreszenz noch detektiert wurden. Der Keratinpartikel musste mindestens 4 Pixel (etwa 120 x 120 nm) groß sein, um als entstehender Partikel gewertet zu werden. Diese Positionen wurden in Amira 4 manuell markiert und in die projizierten Bilder der FA-markierten Fluoreszenzkanäle übertragen. Mit Hilfe der Image-Pro Plus-Software wurden die Distanz zwischen den entstehenden Keratinpartikeln und der nächsten FA gemessen.

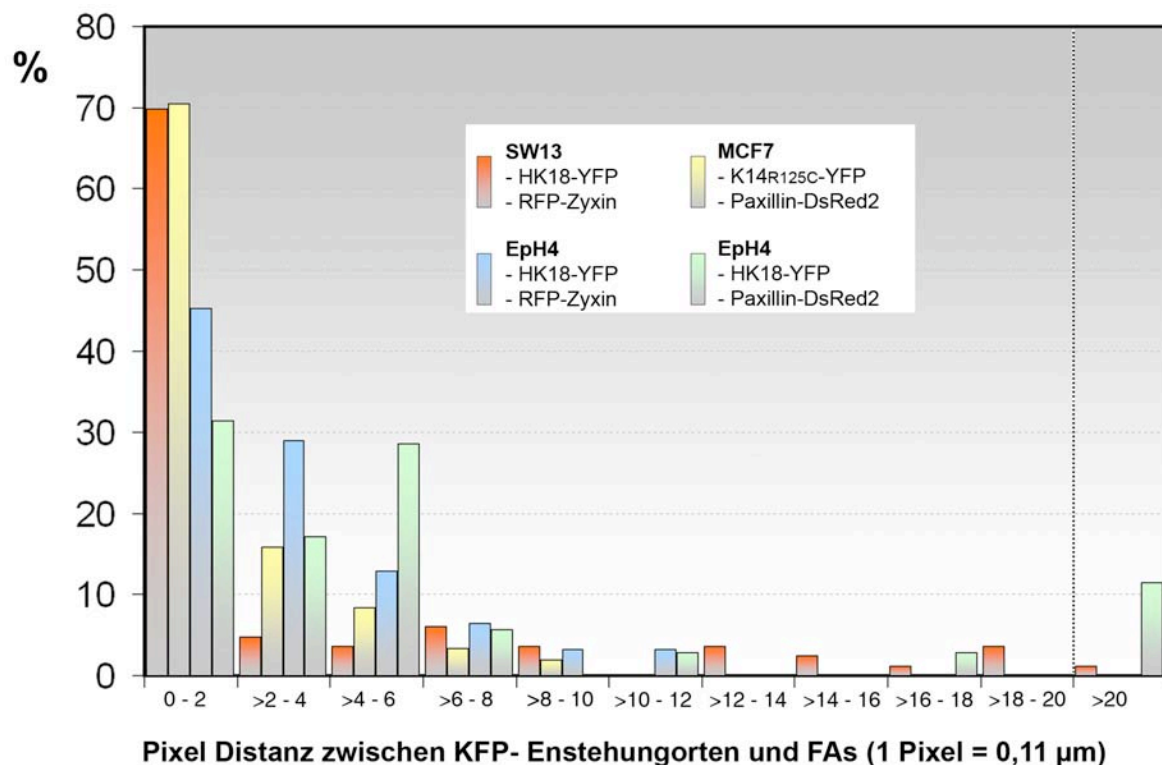


Abb. 23: Prozentuale Auswertung der Initiierung entstehender KFPs an FAs. Die Distanzen zwischen den entstehenden KFPs und den Adhäsionskomplexen in verschiedenen Zelllinien (SW-13, MCF7, Eph4) sind auf der X-Achse aufgetragen. Der größte Anteil der gebildeten KFPs liegt in einem FA oder innerhalb von 2 Pixel (= 0,2 μm) bis zum nächsten FA (Y-Achse).

Abb. 23 zeigt ein mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Excel erstelltes Diagramm, welches die Entfernung der entstehenden KFPs in Bezug zu den nächst gelegenen Adhäsionskomplexen in den untersuchten Zelllinien darstellt. Der größte Anteil der gebildeten KFPs ist von den markierten FAs überlagert oder liegt innerhalb von 2 Pixel (= 0,2 μm) bis zum nächsten FA.

Tabelle 44 fasst die beobachteten Initiationsereignisse von KFPs an den Adhäsionskomplexen (innerhalb von 2 Pixel) in Prozent zusammen. In allen untersuchten Zelllinien, einschließlich der Zellen, welche die mutierte EBS-Keratingranula herstellen, liegt die Nukleationsrate der KFPs an den FAs über 75%. Als Nukleation wird die Initiierung der Filamentbildung definiert.

Tabelle 44: KFP-Initiationsereignisse in Prozent, die innerhalb von 0,2 μm der FA in verschiedenen Zelllinien beobachtet wurden.

Zelltyp	FA- Marker	Nukleationsrate an FAs	Abbildung/Film	N (= KFPs)
EpH4	Paxillin	75 %	16/4	35
EpH4	Zyxin	87 %	17/5	31
SW-13	Zyxin	77 %	19/7 und 8	83
MCF-7	Paxillin	93 %	21/10 und 11	264

Der Knock-Down von Talin in MT5K14-26-Zellen führt zum Verlust der Keratingranula

MT5K14-26-Zellen, welche das mutierte EBS-Keratin 14 synthetisieren, wurden ebenfalls mit Talin-shRNA-Konstrukten transfiziert. Die Auswirkungen des Talin-Knock-Downs auf die Bildung der mutierten EBS-Keratingranula wurde in Fluoreszenz-Lebendzellaufnahmen 48 Stunden nach der Transfektion dokumentiert (siehe Film 13). Sowohl in EK18-1- als auch in MT5K14-26-Zellen, welche mit anti-Talin shRNA-Konstrukten transfiziert wurden, konnte eine Reorganisation des Keratinnetzwerkes beobachtet werden. In beiden Zelllinien wurden kaum noch KFPs in der Peripherie gebildet. Die verbleibenden KFs waren um den Nukleus herum zusammengezogen. In Kontrollexperimenten konnten keinerlei derartige Veränderungen beobachtet werden.

Abb. 24 A zeigt zwei MT5K14-26-Zellen, die rechte ist mit dem Talin-spezifischen shRNA-Konstrukt transfiziert (A') und weist im Gegensatz zu der nicht-transfizierten linken Zelle keine Keratingranula in der Zellperipherie auf (A''). Das verbliebene Keratinnetzwerk ist um den Nukleus zusammengezogen (Abb. 24 A und A''). MT5K14-26-Zellen, die mit dem Kontroll-shRNA-Oligo transfiziert wurden (Abb. 25 B'), zeigen keinerlei derartige Veränderungen (Abb. 24 B und B'').

Hochauflösende Detailaufnahmen weiterer transfizierter MT5K14-26-Zellen bestätigen diese Beobachtungen. MT5K14-26-Zellen (Abb. 24 C') wurden mit dem Talin-shRNA-Konstrukt transfiziert und zeigen ebenfalls eine Depletion der Keratingranula in der Zellperipherie (C, siehe vergrößerter Ausschnitt). Auch während der gesamten Aufnahmedauer der Filme konnte keine Bildung von KFPs

beobachtet werden. In der Zellperipherie von mit Kontroll-shRNA-Konstrukten behandelten Zellen (Abb. 24 D') sind hingegen Keratingranula und KFPs nachweisbar (D, siehe Pfeile im vergrößerten Ausschnitt).

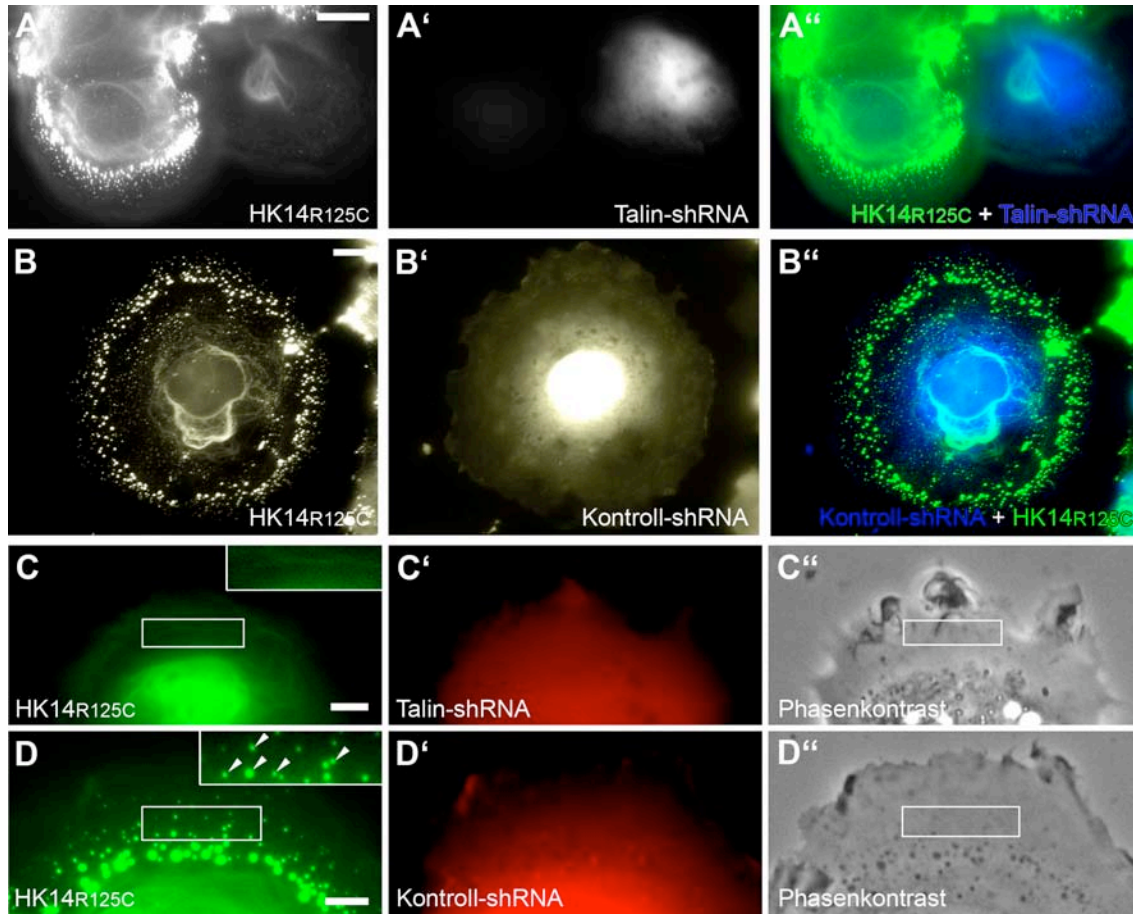


Abb. 24: Knock-Down von Talin in MCF7-Zellen, welche stabil das mutierte K14_{R125C} herstellen, durch die Expression von Talin-spezifischer shRNA. (A ,C) Lebendzellaufnahmen von MT5K14-26-Zellen, die mit farblich markierten Talin-shRNA-Konstrukten transfiziert wurden (A', C'), weisen keine Keratingranula mehr auf (A, A'' und C, C'' mit vergrößertem Ausschnitt aus Film 13). Untransfizierte Zellen (linke Zelle in A) oder Zellen, die mit Kontroll-shOligos transfiziert wurden (B und D, Falschfarbendarstellung in B'', LSM) zeigen im Gegensatz dazu normale Keratingranula und KFPs (D, Pfeile im vergrößerten Ausschnitt). Größenbalken: 10 µm

Die spezifische und effiziente Herunterregulation von Talin durch die Transfektion der shRNA-Konstrukte wurde durch Antikörperfärbungen mit Hilfe des monoklonalen Talin-Antikörper 8D4 nachgewiesen. 48 Stunden nach Transfektion mit den shRNA-Konstrukten wurden die MT5K14-26-Zellen mittels PFA fixiert und mit dem anti-Talin-Antikörper in Kombination mit einem Cy3-gekoppelten Sekundär-Antikörper inkubiert. MT5K14-26-Zellen, welche mit dem anti-Talin-shRNA-Oligo transfiziert wurden, besitzen keine Keratingranula und weisen keine Talin-spezifischen FKs mehr auf. Zusätzlich ist das Keratinnetzwerk um den Zellkern zurückgezogenen.

In Abb. 25 sind MT5K14-26-Zellen dargestellt, die mit den shRNA-Konstrukten transfiziert und anschließend mit dem anti-Talin-AK behandelt wurden. In der Zellperipherie sind keine

Keratingranula mehr zu sehen, allerdings können Desmosomen beobachtet werden (Abb. 25 A). In Abb. 25 A' ist die mRFP-Markierung des transfizierten Talin-shRNA-Oligos dargestellt, in A'' die Talin-AK-Markierung. Die übereinandergelegten Aufnahmen in Abb. 25 A''' verdeutlichen den Verlust der Keratingranula sowie der FAs. Eine untransfizierte MT5K14-26-Zelle ist in Abb. 25 B dargestellt, die vergrößerte Zellperipherie in B' und B'': Die Zelle weist Talin-positive FKs (Abb. 25 B') und normale Keratingranula auf (Abb. 25 B''). Die vergrößerte Darstellung von Talin-shRNA-synthetisierenden Zellen in Abb. 25 C'' verdeutlicht die Abwesenheit von FKs (C) und Keratingranula (C') in der Zellperipherie (C''').

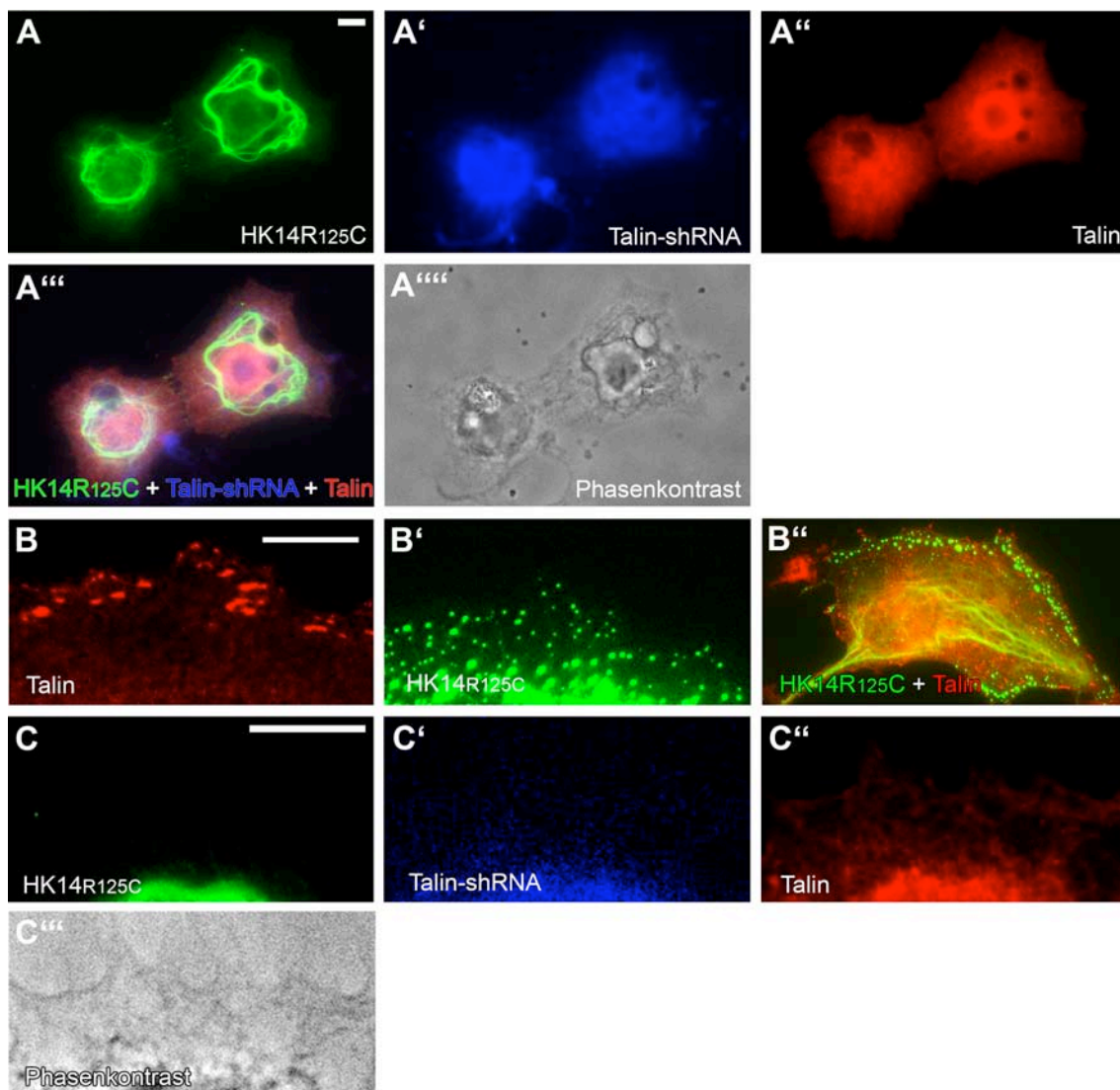


Abb. 25: Nachweis von Talin mittels Antikörperfärbung in fixierten MT5K14-26-Zellen, die mit Talin-spezifischer shRNA transfiziert wurden. (A, C) Fluoreszenzaufnahmen von Talin-shRNA-herstellenden, PFA-fixierten Zellen (A', C'') zeigen, dass durch einen Talin-spezifischen AK zusammen mit einem Cy3-markierten Sekundär-AK FKs in nicht mehr nachweisbar sind. Die Vergrößerung der Zellperipherie (C''') verdeutlicht die Abwesenheit von Talin-positiven FAs (C) und KFPs (C'). (B) Nicht- transfizierte Zellen weisen hingegen normale Keratingranula (B'') und Talin-positive FKs auf (B'). Größenbalken: 10 µm.

4.1.6 FAs bestimmen die Bildung von pathologischen PC-Aggregaten

Um die Allgemeingültigkeit der Nukleation von KFPs an Adhäsionskomplexen zu untersuchen, wurde eine weitere Keratinisoform, K6a, untersucht. Verschiedene Mutationen in K6a-Genen führen zu der Hautkrankheit *Pachyonychia congenita* (siehe 2.2.2), bei der ebenfalls keine vollständigen Keratinfilamente mehr ausgebildet werden. Nach Transfektion mutierter K6a-YFP-cDNAs werden nur noch Keratinaggregate detektiert (HICKERSON *et al.*, 2006). Um zu untersuchen, ob diese durch eine andere Mutation verursachten Granula ebenso wie die EBS-Keratingranula in unmittelbare Nähe zu FAs gebildet werden, sollte zunächst ein geeignetes Zellkulturmodell mit verschiedenen stabilen Zellklonen hergestellt werden. Diese sollten anschließend mit fluoreszierenden cDNAs, die für FA-Proteine kodieren, transfiziert und mittels Lebendzellaufnahmen untersucht werden. Zudem sollte das FA-Protein Talin herunterreguliert und die Effekte ebenfalls in Lebendzellaufnahmen untersucht werden.

Generierung der PK6a-5-, PK6aN171K-1- und PK6aN171del-2-Zellklone aus PLC-Zellen

Für die Etablierung eines Zellkulturmodells, welches Klone mit fluoreszierenden Wildtyp-K6a sowie verschiedene fluoreszierende K6a-Mutanten enthält, ist es wichtig, möglichst identische Transfektions-Effizienzen sowie eine homogene Expression zu erreichen. Demzufolge wurde das retrovirale Gentransfersystem Retro X (BD Bioscience) für die Herstellung der stabilen verwendet. Hierfür mussten als erstes retrovirale Expressionsplasmide mit den entsprechenden Konstrukten kloniert werden.

Die cDNAs HK6a-YFP, HK6aN171K-YFP und HK6aN171del-YFP wurden durch Verdau mit den Enzymen XhoI und NotI aus ihren Ursprungsvektoren pHK6a-YFP, pHK6aN171K-YFP und pHK6aN171del-YFP herausgeschnitten und zwischen die retrovirale Erkennungssequenzen 5'- und 3'-LTR in den Vektor pLNCX2 nach Verdau mit den gleichen Enzymen einligiert. Die resultierenden Plasmide wurden mit rHK6a-YFP, rHK6aN171K-YFP und rHK6aN171del-YFP bezeichnet (siehe Tabelle 45).

Die Transfektion der Plasmide (15 µg DNA) in die Verpackungszelllinie PT67 erfolgt mit Hilfe von Calcium-Chlorid wie in 3.2.3.3.2.1 beschrieben. Das weitere Vorgehen erfolge wie in 4.1.1 bzw. in 3.2.3.3 beschrieben. Die hergestellten PC-Zellklone sind in Tabelle 45 aufgelistet.

Tabelle 45: Hergestellte PC-Zellklone

Plasmid	Zelllinie	Zelltyp
rHK6a-YFP	PK6a-5	<i>Homo sapiens</i> , hepatozelluläres Karzinom
rHK6aN171K-YFP	PK6a-N171K-1	<i>Homo sapiens</i> , hepatozelluläres Karzinom
rHK6aN171del-YFP	PK6a-N171del-2	<i>Homo sapiens</i> , hepatozelluläres Karzinom

Der Zellklon PK6a-5 synthetisiert das wildtypische K6a-Gen gekoppelt an YFP und zeigt gleichmäßig ausgeprägte Keratinnetzwerke (Abb. 26 A). Die Zellklone PK6aN171K-1 und PK6aN171del-2 weisen kein Netzwerke mehr auf, sondern bilden Keratinaggregate, so genannte Granula (Abb. 26 A' und A''). Transiente Transfektionen der Konstrukte HK6aN171K-YFP und HK6aN171del-YFP zeigen ebenfalls die Bildung von Keratingranula (HICKERSON *et al.*, 2006). Von allen drei Zelllinien wurden mehrere Klone erzeugt, die alle die gleiche Verteilung der fluoreszierenden KFs bzw. Keratingranula aufwiesen. Die PK6aN171del-2-Zellen sind im Vergleich zu den beiden anderen Klonen kleiner und wachsen nur in großen Kolonien; sie lassen sich auch nach Trypsin-Behandlung kaum vereinzeln (Abb. 26 A''). Die Keratingranula der PK6aN171del-2-Zellen gleichen sich stark in Form und Länge; hingegen weist die PK6aN171K-1-Zelllinie Granula unterschiedlicher Größe auf. Des Weiteren besitzen einige Zellen noch ein perinukleäres Restnetzwerk sowie kleine Filamentstücke in der Peripherie (Abb. 26 A').

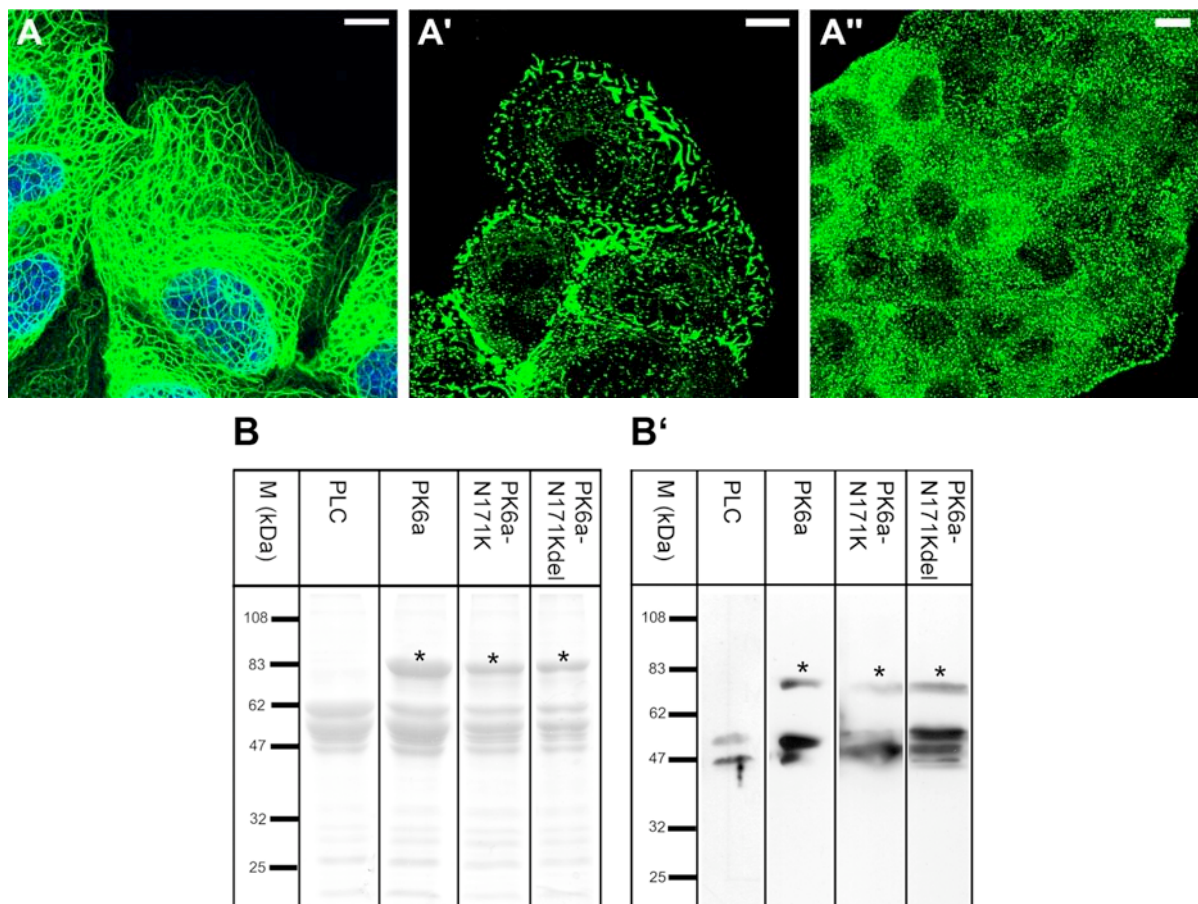


Abb. 26: Konfokales Fluoreszenzaufnahmen zeigen eine Übersicht über die verschiedenen PK6a- Zellklone. (A) PK6a-5-Zellen zeigen ein normales filamentöses Keratinnetzwerk, (A') PK6aN171K-1- und (A'') PK6aN171del-2-Zellen hingegen Keratingranula. Die Keratingranula der PK6aN171del-2-Zellen sind gleichmäßiger ausgeprägt als die der PK6aN171K-1-Zellen, welche zusätzlich kurze Filamentstücke sowie z. T. perinukleäre Restnetzwerke synthetisieren. (B) Die spezifische Expression der fluoreszierenden Proteine wurde nach SDS-Auftrennung von Keratinextrakten der verschiedenen Zelllinien mit Coomassie-Blau-Färbung (B) und Markierung durch einen pan-Keratin-Antikörper nach Western-Blot-Transfer (B') nachgewiesen; die fluoreszierenden Fusionsproteine sind mit Sternchen gekennzeichnet. Die endogenen Keratine 8 und 18 der PLC-Zellen besitzen eine Größe von 54 bzw. 48 kDa. Größenbalken: 10 μ m.

Der Nachweis der fluoreszierenden Keratinkonstrukte erfolgte proteinbiochemisch. Keratinextrakte der verschiedenen Zellklone wurden per SDS-Gel aufgetrennt und die Keratine mittels Coomassie-Blau angefärbt (Abb. 26 B). Zudem wurden die Keratinproteine nach Western-Blot-Transfer durch einen HRP-gekoppelten pan-Keratin-Antikörper und folgender ECL nachgewiesen (Abb. 26 B'). PLC-Zellen exprimieren K8 (54 kDa) und K18 (48 kDa). Der stabilen Zellklone PK6a-5, PK6aN171K-1 und PK6aN171Kdel-2 synthetisiert zusätzlich das K6a-YFP-Fusionsprotein (87 kDa, mit * gekennzeichnet).

Keratin 6a-Vorläufer entstehen in der Zellperipherie

Die dynamischen Eigenschaften der K6a-Granula bzw. der K6a-Filamente wurden zunächst mit Hilfe von Lebendzellaufnahmen in den neu generierten PC-Zelllinien untersucht. In allen drei Zelllinien konnte die Entstehung von KFPs in der Zellperipherie beobachtet werden (siehe Filme 14, 15, und 16).

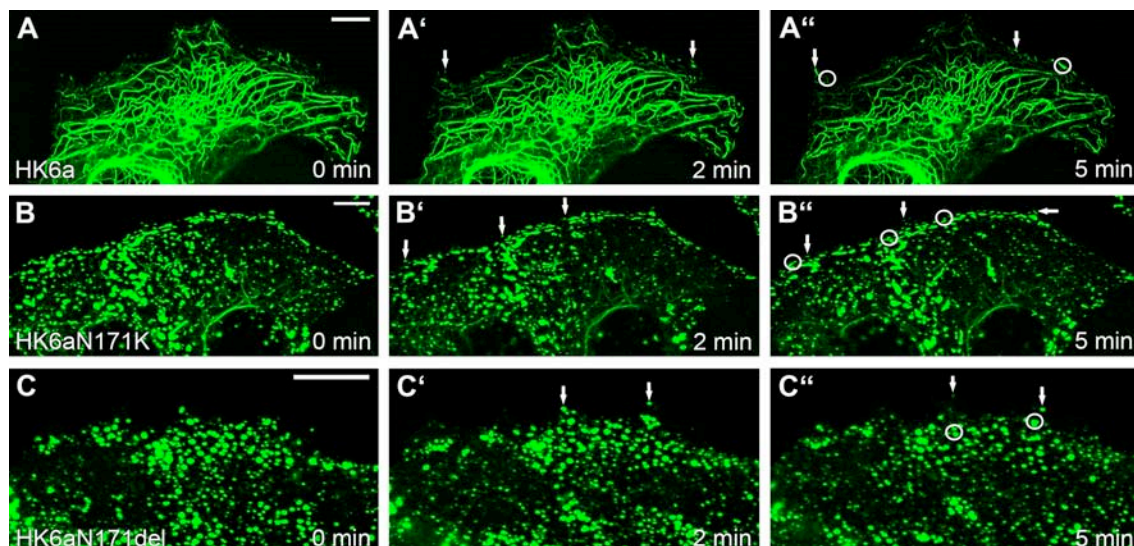


Abb. 27: Entstehung und Dynamik von KFPs in den verschiedenen PC-Zellklonen. Einzelbilder aus konfokalen Lebendzellaufnahmen der verschiedenen PC-Zelllinien (Film 14, 15 und 16). (A) KFPs werden in PK6a-5-Zellen in Nachbarschaft zur Plasmamembran gebildet und bewegen sich in Richtung des Zellinneren, wo sie mit weiteren Filamenten verschmelzen. (B - C) In den PK6aN171K-1- und PK6aN171del-2-Zellen werden Keratinaggregate in der Zellperipherie gebildet, auch diese wandern zentripetal und fusionieren mit anderen Granula, lösen sich aber nach kurzer Zeit wieder auf. Größenbalken: 10 μm .

In der PK6a-5-Zelllinie entstehen neue KFPs in der Nähe der Plasmamembran (Film 14 und Abb. 27 A). Die Pfeile in Abb. 27 A' und A'' zeigen auf die neu entstehende KFPs, welche sich zentripetal bewegen und dort mit anderen Filamenten fusionieren (Abb. 27, die Kreise in A'' markieren die Fusionen). Auch in den beiden Zelllinien, welche die mutierten Keratine synthetisieren, entstehen die Keratinaggregate in der Zellperipherie und wandern in Richtung Zellzentrum (Abb. 27 B und C). In PK6aN171K-1-Zellen wachsen die entstehenden runden Granula in die Länge und lagern sich an ihren Enden zu kurzen Filamentstücken zusammen (Film 15). In PK6aN171del-2-Zellen hingegen existieren nur runde Keratingranula, die kein Längenwachstum aufweisen aber auch miteinander zu größeren

Granula verschmelzen (Film 16). Die Pfeile in Abb. 27 B' und B'' sowie in Abb. 27 C' und C'' weisen auf die neuentstehende Granula hin, die Kreise in Abb. 27 B'' und C'' auf die Fusion. Keratingranula sowie Filamentstücke lösen sich in einer distinkten Zone am Rand der Zellperipherie wieder auf. In PK6aN171K-1-Zellen (Abb. 27 B) ist diese Zone durch das Nichtvorhandensein von Keratinfilamentstücken gekennzeichnet. In PK6aN171del-2-Zellen (Abb. 27 C) treten nur kleine Keratingranula in dieser Zone auf. In der Zellmitte existieren in beiden Klonen ebenfalls kleinere Keratingranula, die sich schnell und ungerichtet bewegen. Das perinukleäre Rest-Keratinnetzwerk in den PK6aN171K-1-Zellen bleibt unverändert (Abb. 27 B).

Desmosomen zeigen keine Veränderung durch die Anwesenheit der PC-Aggregate

Zell-Zell-Verbindungen verbinden die IFs verschiedener Epithelzellen und werden von verschiedenen desmosomalen Proteinen gebildet. Diese Transmembranproteine gewährleisten die Kraftübertragung über den Interzellularspalt hinweg an die Nachbarzellen (GODSEL *et al.*, 2005). Ob die Ausbildung von Desmosomen durch die beiden PC-Mutationen verändert ist, sollte durch einen immunzytologischer Nachweis der desmosomalen Komponente Desmoglein 2 überprüft werden.

Alle drei Zelllinien weisen in konfokalen Laserscanning-Aufnahmen eine normale Desmosomenfärbung auf; es ist kein Unterschied zwischen den Zellen der PC-Mutanten und des K6a-Wildtyp zu erkennen. Abb. 28 zeigt die Ko-Lokalisierung der Desmoglein2-markierten Desmosomen mit den Keratingranula in der Zellperipherie (Pfeile in A'' und B'').

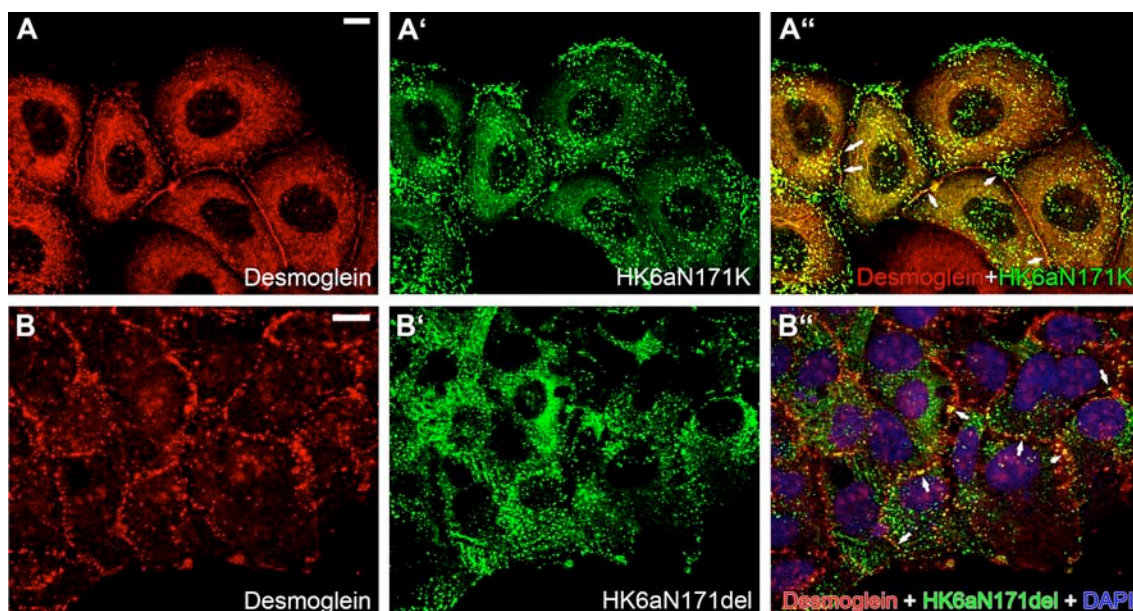


Abb. 28: Desmosomen zeigen keine Veränderung durch die Anwesenheit der PC-Aggregate. Der Nachweis der Desmosomen erfolgte durch Antikörperfärbung mit einem Antikörper gegen den C-Terminus von Desmoglein 2 und einem Cy3-gekoppelten Sekundär-Antikörper. Immunfluoreszenzaufnahmen (LSM) der Methanol und Aceton fixierten PK6aN171K-1- (A) und PK6aN171del-2-Zellen (B) zeigen alle ein ähnliches Desmosomen-Muster sowie eine Ko-Lokalisierung der Desmosomen mit KFPs in der Zellperipherie (Pfeile in A'' und B''). Größenbalken: 10 μ m. Die Antikörperfärbung sowie die Aufnahme der Abbildung 28 B wurden von Eva-Maria Oesau im Rahmen ihres von mir betreuten Fortgeschrittenen II Praktikums durchgeführt.

PC-Keratingranula kolokalisieren mit fokalen Adhäsionskomplexen

Um zu untersuchen, ob die in den PC-Mutanten gebildeten KFPs auch an FAs gebildet werden, wurde zunächst überprüft, ob das FK-Strukturprotein Paxillin und die Serin-Threonin-Kinase FAK in den mutierten Zelllinien normal hergestellt werden. Hierfür wurden Keratinextrakte sowie Gesamtzellextrakte der PK6a-5-, PK6aN171K-1- und PK6aN171del-2-Zellen proteinbiochemisch über ein SDS-Gel aufgetrennt und nach anschließendem Western-Blot-Transfer mit verschiedenen Antikörpern behandelt. In beiden Zelllinien wurde Paxillin und FAK-Y nachgewiesen.

Paxillin besitzt ein Molekulargewicht von 68 kDa und wurde sowohl in Keratinextrakten (Abb. 29 A) als auch in Gesamtzellextrakten (Abb. 29 A') nachwiesen. Die schwächere Bande der PK6aN171K-a-Zelllinie kam vermutlich durch einen geringeren Probenauftrag zu Stande. Die FAK besitzt ein Molekulargewicht von 125 kDa und wurde in PK6aN171K-1- und PK6aN171del-2-Gesamtzellextrakten detektiert; die Bande aus der PK6aN171del-1-Aufreinigung ist ebenfalls schwächer (Abb. 29 B).

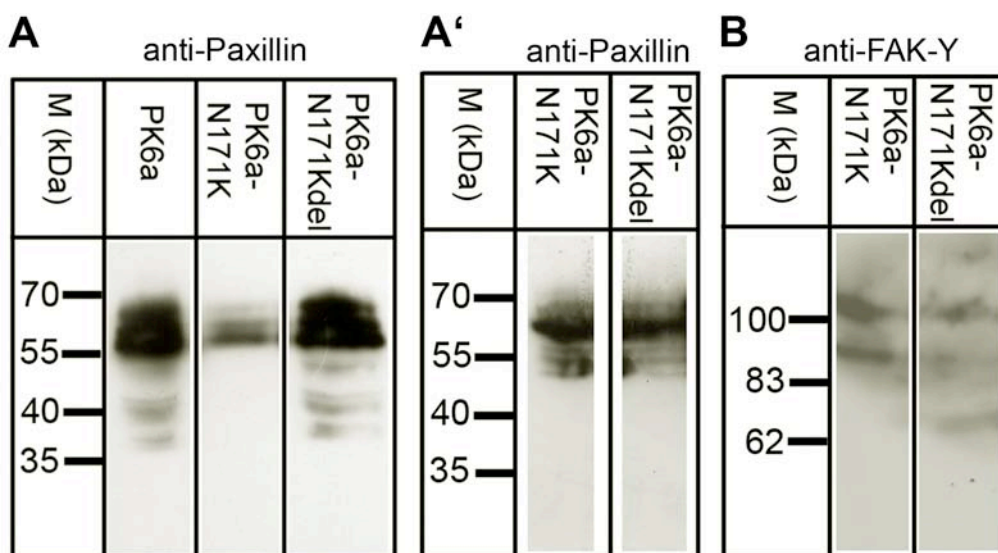


Abb. 29: Proteinbiochemischer Nachweis der FA-Proteine Paxillin und FAK-Y in den verschiedenen PC-mutierten Zelllinien. Die aufgetragenen Proben wurden aus Keratinextrakten (A) sowie Gesamtzellextrakten (A' und B) hergestellt. Paxillin wurde nach proteinbiochemischer Auftrennung und Western-Blot mit einem anti-Paxillin-Antikörper und einem HRP-gekoppelten Sekundär-Antikörper in beiden Extrakten als Bande bei etwa 68 kDa nachgewiesen. (B) Die Antikörpermarkierung mit einem phosphospezifischen anti-FAK-Antikörper und einem Sekundär-Antikörper mit gekoppelter HRP nach Western-Blot-Transfer weist die aktivierte FAK in Gesamtzellextrakten von PK6aN171K-1- und PK6aN171del-2-Zellen nach.

Weiterhin wurden die mutierten PC-Zelllinien mit fluoreszenzmarkierten FA-Proteinen transfiziert. Konfokale Lebendzellaufnahmen von PK6aN171K-1- und PK6aN171del-2-Zellen zeigten die Ko-Lokalisierung der Keratingranula mit den fluoreszierenden Adhäsionskomplexen.

Abb. 30 zeigt PK6aN171K-1- sowie PK6aN171del-2-Zellen, welche mit RFP-Zyxin-cDNA transfiziert wurden.

Die Keratingranula (Abb. 30 A') befinden sich in enger räumlicher Nähe zu den Zyxin-markierten FAs in der Zellperipherie (Abb. 30 A''). Im Bereich des linken Zellrandes fällt die Ko-Lokalisierung der länglichen Keratinaggregate mit den reifen langgezogenen Kontakten auf. Auch in den PK6aN171del-2-Zellen wurden neuentstehende Keratingranula an Zyxin-markierten FAs in der Zellperipherie nachgewiesen (Abb. 30 B'').

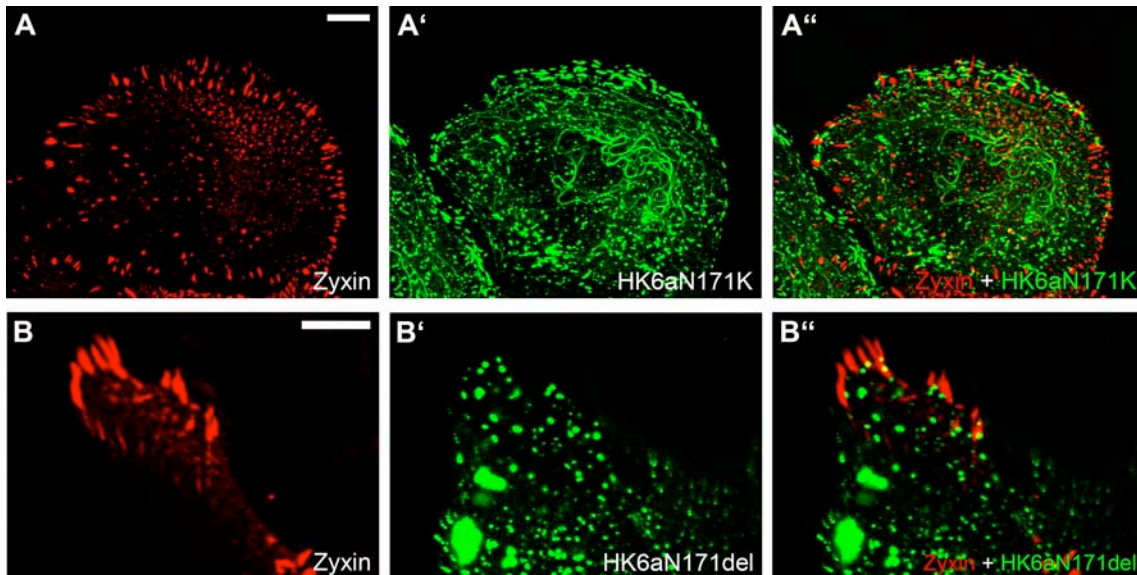


Abb. 30: Ko-Lokalisierung von Keratingranula und FAs in PK6aN171K-1- und PK6aN171del-2-Zellen. Beide Zelllinien wurden mit RFP-Zyxin-cDNA transfiziert. Konfokale Lebendzellaufnahmen transfizierter PK6aN171K-1- (A) und PK6aN171del-2- (B) Zellen zeigen die Lokalisierung der Keratingranula in direkter Nachbarschaft zu den Zyxin-markierten FAs in der Zellperipherie (A'', B''). Größenbalken: 10 μ m.

Der Knock-Down von Talin durch die Expression von Talin-spezifischer shRNA führt zum Verlust der Keratingranula

Durch die Transfektion des Konstruktes shOligoTalin-CFP sollte die Bildung von FAs gestört werden, wie es schon erfolgreich in EK18-1- und MT5K14-26-Zellen durchgeführt worden war (siehe Abb. 18 und 24). Es sollte überprüft werden, ob diese von einer anderen Mutation verursachten Keratingranula ebenfalls wie die EBS-Granula depletiert werden. Hierfür wurden von beiden Zelllinien 48 Std nach der Transfektion Lebendzellaufnahmen angefertigt. In der PK6aN171K-1-Zelllinie sind zum einen Keratingranula in der Peripherie nicht mehr nachweisbar, zum anderen findet eine perinukleäre Aggregation von Filamentstücken statt (siehe Abb. 31 A und B).

In transfizierten Zellen, die noch Netzwerkreste ausbilden (Abb. 31 B), sind ebenfalls keine Granula in der Peripherie mehr erkennbar; außerdem wird ein schwaches Netzwerk ausgebildet (Abb. 31 B und B''). Die Expression der Talin-shRNA ist durch das Vorhandensein von blauer Fluoreszenz ersichtlich (Abb. 31, A', B' und C'). In PK6aN171del-2-Zellen, welche mit Talin-shRNA-Oligos transfiziert wurden, konnten jedoch keine Veränderungen in der Verteilung oder Form der Keratingranula festgestellt werden (Abb. 31 C und D).

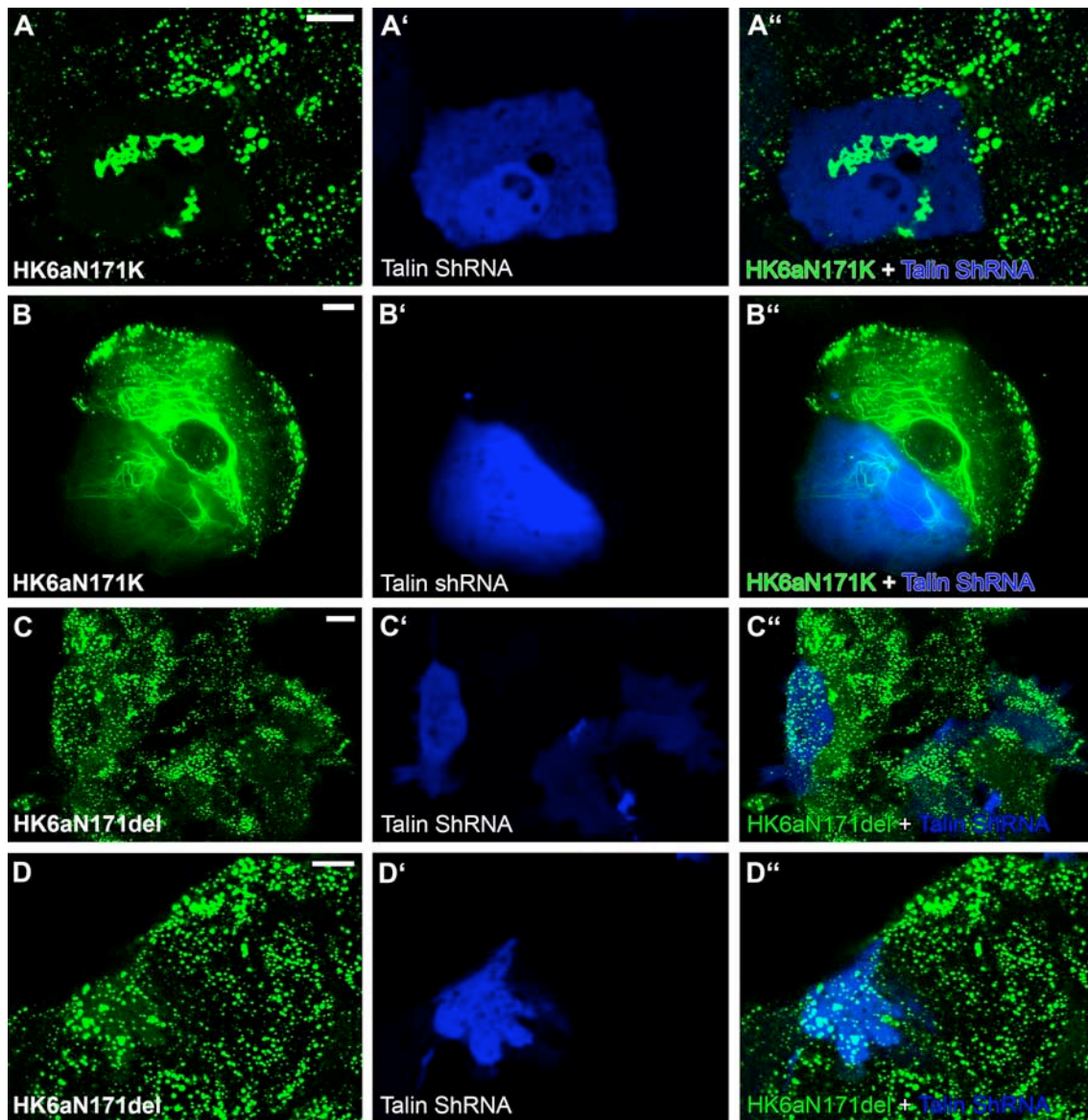


Abb. 31: Der Knock-Down von Talin durch die Expression von Talin-spezifischer shRNA führt zum Verlust der Keratingranula und induziert Reorganisation der Keratinproteine. (A, B) Lebendzellaufnahmen mit Talin-shRNA-cDNA transfizierten PK6aN171K-1-Zellen zeigen ein Verschwinden peripherer Keratingranula. (A) Keratinbruchstücke oder Rest-Netzwerke (B) sind perinukleär noch nachzuweisen. (C) Transfizierte PK6aN171del-2-Zellen weisen keine Veränderung der Keratingranula auf. Diese sind in normaler Größe der gesamten Zelle verteilt. Die Größenbalken betragen jeweils 10 μm ; die Abb. A, C und D wurden am LSM durchgeführt. Kontrollexperimente mit einem unspezifischen shRNA-Konstrukt (shKontroll-Oligo-CFP) zeigten keine Veränderungen der Keratinaggregate (hier nicht gezeigt).

4.1.7 KFPs werden in einem Aktin-abhängigen Prozeß zentripetalwärts transportiert

KFPs werden im Aktin-reichen Zellkortex in unmittelbarer Nachbarschaft zu FAs gebildet, welche das Aktinzytoskelett in der extrazellulären Matrix verankern. Da die KFPs in den nicht-epithelialen SK8/18-Zellen Aktin- und Mikrotubuli-abhängig transportiert werden, sollte der KFP-Transport in Epithelzellen durch Hemmung der Aktinfilamente sowie der Mikrotubuli in Zeitrafferaufnahmen untersucht werden.

In Aktin-enthaltenden Lamellipodien entstehen neue Keratinnetzwerke

Polymerisierende Aktinfilamente bilden Lamellipodien und sorgen für deren Ausbreitung in die Bewegungsrichtung der Zellen (LAI *et al.*, 2008). Um die genauen Vorgänge in Lamellipodien zu beobachten, wurden Doppeltransfektionen von HK18-YFP-cDNA und Aktin-mRFP-cDNA in EpH4 Zellen durchgeführt. Lebendzellaufnahmen der transfizierten Zellen zeigten, dass in sich entwickelnden Lamellipodien neue Keratinnetzwerke etabliert werden.

Abb. 32 zeigt Einzelbilder verschiedener Zeitabstände aus Film 17 einer HK18-YFP- und Aktin-RFP-synthetisierenden Zelle, welche ein Lamellipodium entwickelt (Pfeil in Abb. 32 A). Das entstehende Lamellipodium enthält reichlich kortikales Aktin (Abb. 32 A'' und A'''), aber noch keine KFs (Abb. 32 A' und A'''). Wenige Minuten nach der Ausbreitung des Lamellipodiums (Abb. 32 B) können KFPs detektiert werden (Pfeile in B' und B'''). Diese wandern zentripetal, fusionieren miteinander und etablieren schließlich ein neues Netzwerk in dem Lamellipodium (Abb. 32 C' und C'''). Aktin oder Aktin-bindende Proteine scheinen somit in Lamellipodien eine Voraussetzung zu schaffen, die die Bildung von KFPs erlaubt.

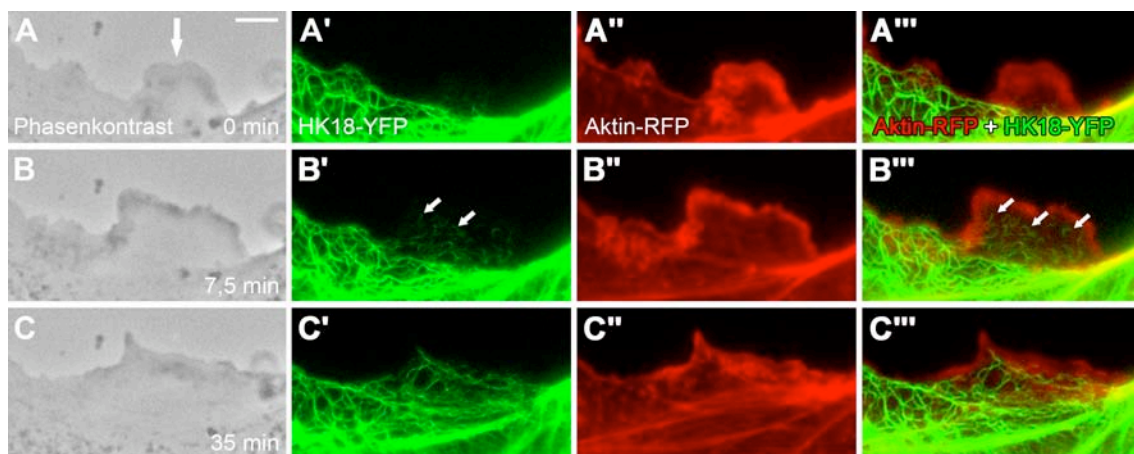


Abb. 32: KFPs bilden sich am Rand Aktin-haltiger Lamellipodien. Lebendzellaufnahmen (Film 17) von EpH4-Zellen, die mit pHK18-YFP (A'-C') und pAktin-RFP (A''-C'') transfiziert wurden. Zunächst wurden große Mengen Aktin in der sich ausbreitenden Zellfront nachgewiesen (Phasenkontrast in A). Nach etwa 7 min werden die ersten KFPs im Lamellipodium detektiert (Pfeile in B' und B'''), welche schließlich ein neues Netzwerk etablieren (C'''). Größenbalken: 10 μ m

Die Zerstörung von Mikrofilamenten durch Cytochalasin D und Mikrotubuli durch Nocodazol beeinflusst die Keratindynamik

Durch die Zerstörung von Mikrofilamenten und Mikrotubuli sollte der Einfluss dieser Zytoskelett-Komponenten auf die Dynamik der KFs untersucht werden (WÖLL *et al.*, 2005).

EK18-1-Zellen wurden mit jeweils 100 μ M Nocodazol bzw. 1 μ M Cytochalasin D für eine Stunde behandelt, um die Wirkung auf MT, MF und KFs zu untersuchen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen sowie die Färbung der MFs mittels TexasRed-gekoppeltem Phalloidin. Zudem wurde Tubulin durch einen anti-Tubulin-Antikörper und einen Cy3-gekoppelten Sekundär-Antikörper

markiert. Die KFs wurden durch das synthetisierte Plasmid rHK18-YFP detektiert. Als Kontrolle wurden unbehandelte EK18-1-Zellen gleichzeitig und auf gleiche Art und Weise wie die behandelten Zellen markiert. Die unbehandelten Zellen bilden ausgebreitete Keratin-, Aktin- und Mikrotubuli-Netzwerke (siehe Abb. 33 A und B).

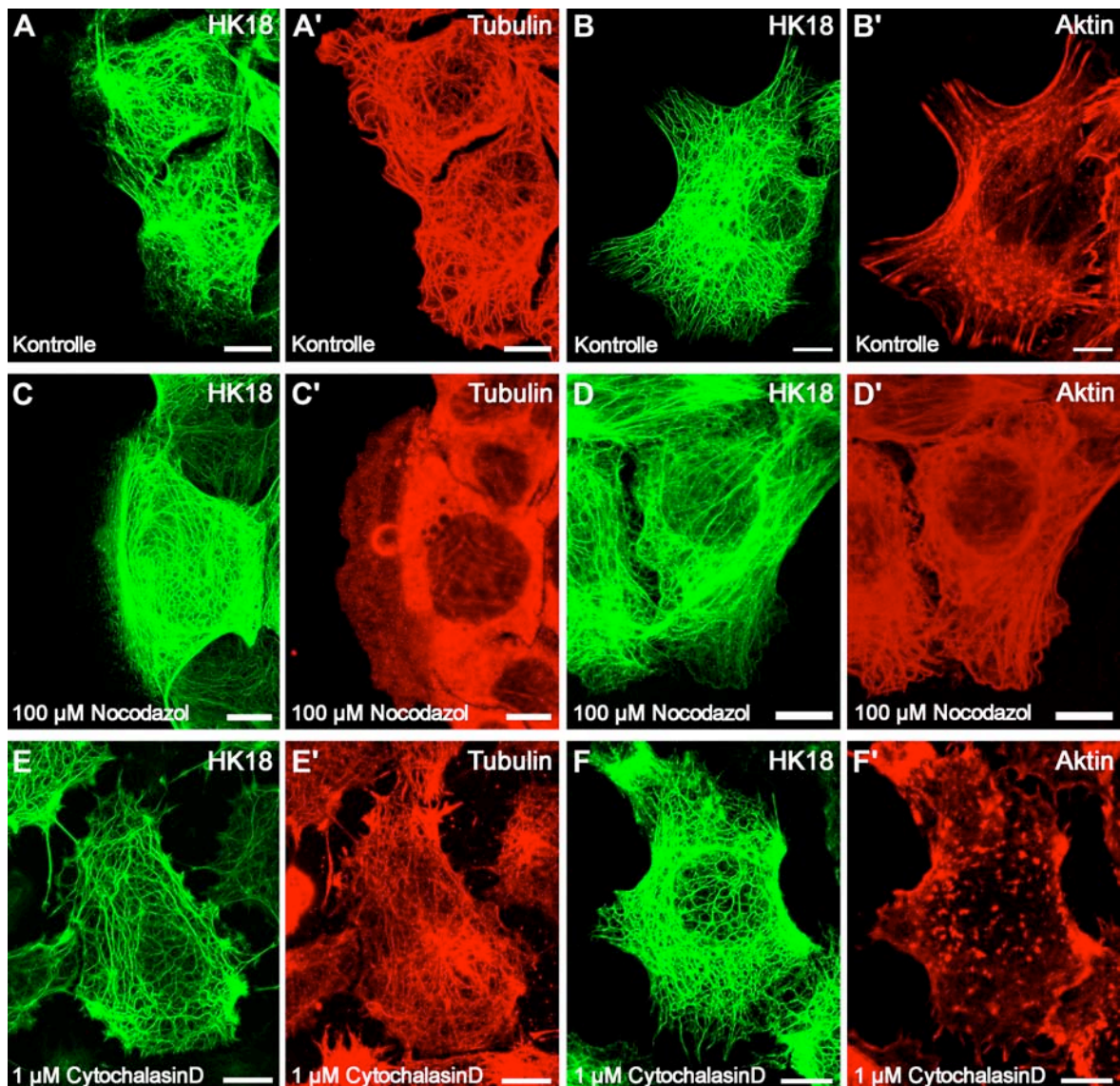


Abb. 33: Zerstörung der Mikrofilamente durch Cytochalasin D und der Mikrotubuli durch Nocodazol in EK18-1-Zellen. (A, B): Unbehandelte Kontrollzellen besitzen ausgebreitete Keratin- (A, B), Mikrotubulus- (A') und Aktin-Netzwerke (B'). Der Nachweis von Aktin erfolgte nach Fixierung der Zellen mit Methanol und Aceton durch Markierung mit TexasRed gekoppelten Phalloidin; Mikrotubuli wurden durch einen anti- β -Tubulin-Antikörper und einen Cy3-gekoppelten Sekundär-Antikörper markiert. (C-D) Konfokale Laserscanning-Aufnahmen der mit 100 μ M Nocodazol behandelten Zellen zeigen zerstörte Mikrotubuli (C'), welches aber keinen Einfluss auf Keratin- (C, D) und Aktinnetzwerke (D') hat. (E-F) Die mit 1 μ M Cytochalasin D-behandelten Zellen besitzen keine intakten Aktinfilamente mehr (F'); Keratin- (E, F) und Mikrotubuli-Netzwerke bleiben hingegen vollständig (ebenfalls konfokale LSM-Aufnahmen). Größenbalken: 10 μ m.

Die Zellen, die mit Nocodazol behandelt wurden, weisen zerstörte Mikrotubuli auf (Abb. 33 C'), Keratin- und Aktinfilamente bleiben hingegen unbeeinflusst (Abb. 33 C, D und D'). Die Behandlung mit Cytochalasin D führte zum Zusammenbruch des Aktinnetzwerks (Abb. 33 F'), es sind keine

Filamente mehr nachweisbar. Die KFs sind aufgrund der Zellkontraktion leicht zusammengezogen (Abb. 33 E und F); Mikrotubuli weisen keinerlei Veränderung auf (Abb. 33 E'). Somit sind die verwendeten Drogen für Hemmung der MF bzw. MT und folgender Untersuchung der KFs gut geeignet.

KFPs werden hauptsächlich durch Aktin-abhängigen Transport zentripetal bewegt

Die Dynamik der Keratinnetzwerke in Abhängigkeit von MF und MT wurde nach Drogenzugabe in EK18-1-Zellen mittels Lebendzellmikroskopie untersucht. Nach Inhibierung der MF wird der KFP-Transport gestoppt, nach Hemmung der MT findet dieser weiterhin statt.

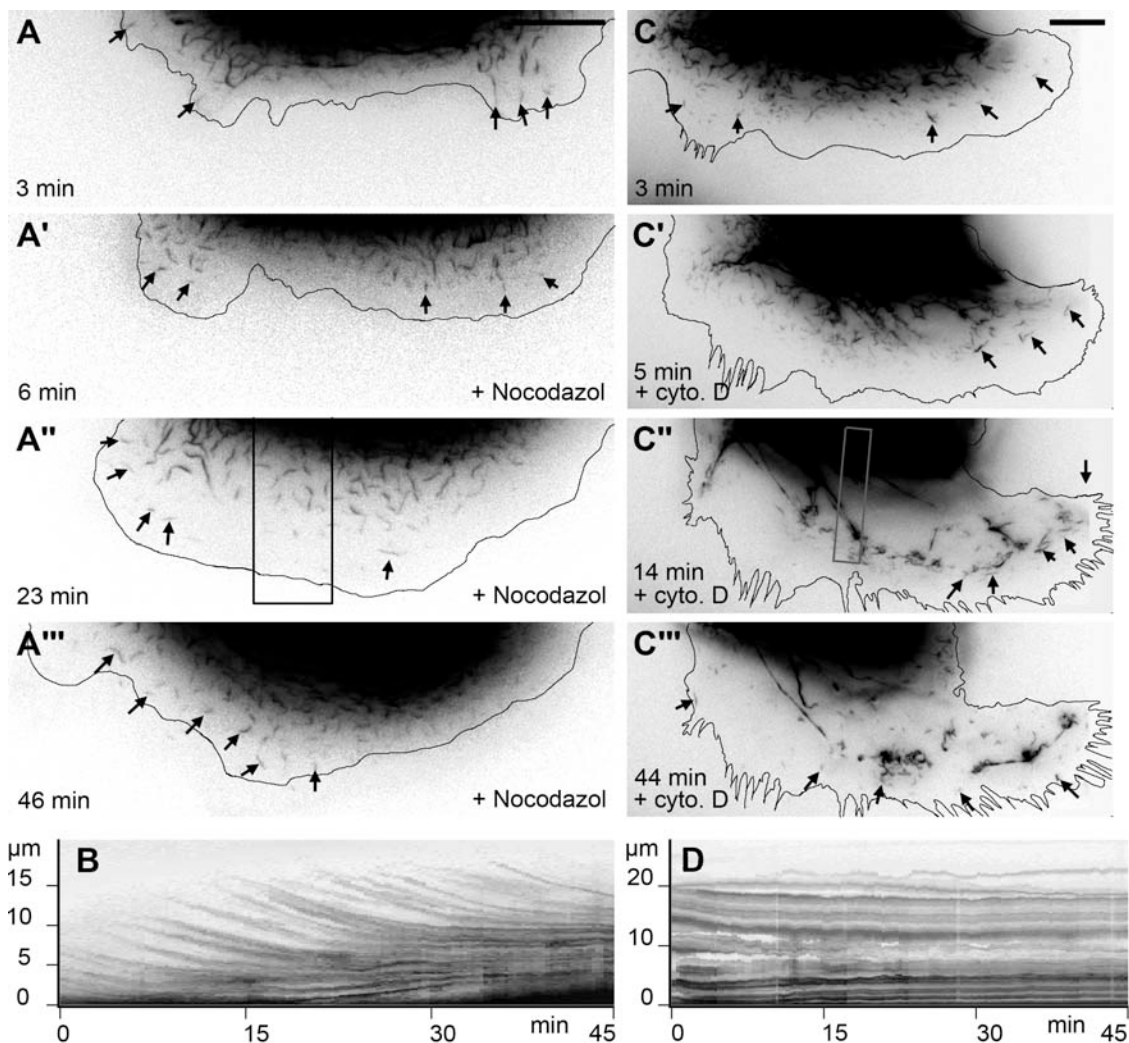


Abb. 34: KFPs werden hauptsächlich durch Aktin-abhängigen zentripetal transportiert. Die Aufnahmen der Lebendzellserien Film 18 (A und B) und Film 19 (C und D) zeigen EK18-1-Zellen, die mit 100 μM Nocodazol bzw. 1 μM Cytochalasin D behandelt wurden. Vor Drogenzugabe wurden jeweils 50 Bilder aufgenommen (A, C, jeweils nach 3 min). (A-B) Nocodazol-behandelte Zellen bilden weiterhin KFPs in der Zellperipherie (Pfeile in A'-A'''). Auch der zentripetale Transport bleibt unverändert (Kymogram in B). (A-C) Die Behandlung mit Cytochalasin D führt zu einem Zusammenziehen des Keratinnetzwerkes (C'-C'''); KFPs werden aber weiterhin in der Peripherie gebildet (Pfeile in C'-C'''). Die KFPs verbleiben in der Zellperipherie, der Transport ist vollständig blockiert (Kymogramme in D). Die Kymogramme stammen aus den eingezeichneten Ausschnitten in A und C und beinhalten nur die Zeit nach Drogenzugabe. Größenbalken: 10 μm .

Abb. 34 zeigt Zeitrafferserien der Peripherie von EK18-1-Zellen, welche jeweils mit 100 μ M Nocodazol (Abb. 35 A und Film 18) bzw. mit 1 μ M Cytochalasin (Abb. 34 B, Film 19) behandelt wurden. Der Zellrand wurde nachträglich durch Übereinanderlegen der Fluoreszenz- und der entsprechenden Phasenkontrastbilder mit Hilfe eines Zeichenbrettes (Digitizer 2 UD-1218-R A3, WACOM) eingezeichnet. Vor der Zugabe der Drogen wurden jeweils 50 Bilder aufgenommen. Abb. 34 A und C zeigen die Bildung der KFPs in unbehandelten Zellen jeweils drei min nach Beginn der Aufnahme (Pfeile). Nach Zugabe von Nocodazol kann auch nach längerer Dokumentation keine Veränderung des Keratinnetzwerkes beobachtet werden (nach 45 min, Abb. 34 A'''). KFPs entstehen weiterhin in der Zellperipherie und werden zentripetal transportiert (Pfeile). Das Kymogramm verdeutlicht den kontinuierlichen KFP-Transport (Abb. 34 B).

Nach der Zugabe von Cytochalasin D kontrahiert das Keratinnetzwerk der EK18-1-Zellen bereits wenigen Minuten (Abb. 34 C'). KFPs werden immer noch in der Zellperipherie gebildet (Pfeile in Abb. 34 C', C'' und C'''), ein Transport findet allerdings nicht mehr statt. Die Filament-Vorläufer bleiben statt dessen in der Peripherie hängen. Das Kymogramm verdeutlicht den unterbrochenen Transport (Abb. 34 D). Somit scheint der einwärts-gerichtete kontinuierliche Transport der Vorläufer hauptsächlich von Aktinfilamenten abhängig zu sein.

4.1.8 Keratinfilamentabbau trägt zur Keratinfilamentbildung bei

Die Bildung von Keratinnetzwerken erfolgt durch Entstehung kurzer Filamenten, den KFPs, in der Zellperipherie an fokalen Adhäsionskomplexen. Diese werden durch einen Aktin-abhängigen Transport in Richtung Zellzentrum bewegt, fusionieren miteinander und werden anschließend in das periphere Netzwerk integriert.

Die Entstehung der Vorläufer in der Zellperipherie sowie der schnelle Aufbau neuer Netzwerke z. B. nach der Mitose wurde bereits in A431-, PLC- und nicht epithelialen SW-13-Zellen beschrieben (WINDOFFER *et al.*, 2004; WÖLL *et al.*, 2005). Unklar bleibt weiterhin, ob die KFPs *de novo* an der Plasmamembran synthetisiert werden oder ob ein ständiger Auf- und Abbau aus Untereinheiten stattfindet.

Mittels verschiedener Fluoreszenzaufnahmen sollte der Turnover des Keratinnetzwerkes untersucht werden. Es sollte geklärt werden, wie der Aufbauprozess funktioniert und ob weiterhin ein Abbau der Filamente stattfindet. Hierfür sollte ein photoaktivierbares Keratinkonstrukt hergestellt werden, mit dessen Hilfe verschiedene Teile des Keratinfilament-Netzwerks in unterschiedlichen Regionen der Zelle in Lebendzellaufnahmen beobachtet und verfolgt werden. Zudem sollten Fusionsexperimente von Zellen, die unterschiedlich fluoreszierende Keratinisoformen synthetisieren, durchgeführt werden. Hierfür mussten zunächst erst rotfluoreszierende Keratinkonstrukte hergestellt werden. Des

Weiteren sollte mittels spezifischer Inhibitoren die Proteinbiosynthese gehemmt und Zeitrafferaufnahmen angefertigt werden.

Photoaktivierung von Keratinfilamenten zeigt ihren Abbau und damit einen kontinuierlichen Keratinkreislauf

Photoaktivierung bezeichnet die Umwandlung eines photoaktivierbaren, nicht fluoreszierenden Moleküls in einen fluoreszierenden Status durch intensive Bestrahlung. Patterson und Lippincott-Schwartz beschrieben 2002 eine photoaktivierbare Variante des *Green Fluorescent Protein* (GFP), welches nach intensiver Bestrahlung mit UV-Licht einer Wellenlänge von 405 nm die Fluoreszenzintensität um etwa das 100-fache erhöht. Das photoaktivierbare GFP (pa-GFP) eignet sich somit hervorragend für die Untersuchung von intrazellulären Proteindynamiken durch die Verfolgung von selektiv photoaktivierten Molekülen (PATTERSON und LIPPINCOTT-SCHWARTZ, 2002).

Für die Untersuchung von KFs wurde zunächst ein photoaktivierbares K8-Konstrukt generiert, HK8-paGFP. Pa-GFP wurde von George Patterson in Form des Vektors pPA-GFP-N1 zur Verfügung gestellt (PATTERSON und LIPPINCOTT-SCHWARTZ, 2002). K8 wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme BamHI und EcoRI aus pHK8-ECFP ausgeschnitten und das 1,5 kb große Fragment in pPA-GFP-N1 wieder einligiert. Der resultierende Vektor pHK8-paGFP wurde in PLC-Zellen transfiziert.

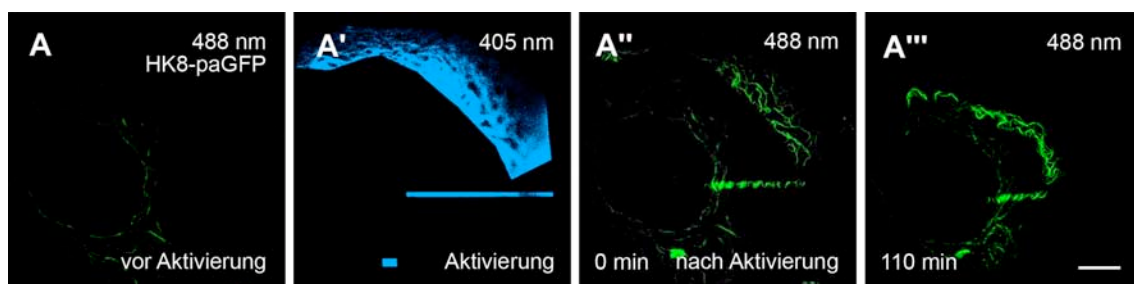


Abb. 35: Photoaktivierung von KFs in distinkten Zellbereichen. (A) Konfokale Lebendzellaufnahmen (Film 20) von PLC-Zellen, die mit HK8-paGFP-cDNA transfiziert wurden. Aktivierte und zentripetal wandernde KFs in der Zellperipherie kompaktieren sich zu dickeren Filamentbündeln (A' und A''). Perinukleäre aktivierte Filamente (unterer Zellbereich, A) verlieren Fluoreszenzaktivität (A'''). Größenbalken: 10 μm .

Jeweils eine Hälfte einer transfizierten Zelle oder einzelne Zellbereiche (erkennbar durch sehr schwache Hintergrundfluoreszenz in blauen Kanal) wurde durch einen einzigen ROI-Scan (*region of interest-scan* mit Hilfe des FRAP-Wizard der LASF-Software, Leica) mit UV-Licht (405 nm) bei 100%iger Laser-Leistung photoaktiviert. Direkt im Anschluss wurden Lebendzellaufnahmen nach unterschiedlichen Zeitabständen bei 488 nm, der Anregungswellenlänge des GFP, generiert. Die Ergebnisse der Aktivierung von KFs in unterschiedlichen Regionen der transfizierten PLC-Zellen sind in Abb. 35-38 zusammengefasst.

Die Verfolgung von KFs in verschiedenen Zellbereichen lässt sich durch Photoaktivierung von unterschiedlichen Regionen in der Zelle erreichen. Abb. 35 und Film 20 zeigen konfokale

Zeitrafferaufnahmen von PLC-Zellen, welche mit HK8-paGFP-cDNA transfiziert wurden. In Abb. 35 A ist die Zelle vor der Photoaktivierung (488 nm), in Abb. 35 A' während der Photoaktivierung durch Bestrahlung mit 405 nm Laserlicht dargestellt.

Die Aktivierung von KFs im Randgebiet des Zytoplasmas zeigt die Kompaktierung und Fusion der photoaktivierten Moleküle zu dickeren Filamenten und ihre Bewegung in Richtung Zellzentrum (Abb. 35 A'' und A'''). Der in der unteren Zellregion aktivierte Streifen (Abb. 35 A') verliert während der Aufnahmedauer an Fluoreszenzintensität in der Zellperipherie, in der Zellmitte hingegen bleibt die Fluoreszenzstärke konstant (Abb. 35 A'''). Das aktivierte rechteckige Segment im ganz unteren Zellbereich verliert ebenfalls kontinuierlich an Fluoreszenzintensität (Abb. 35 A'-A''').

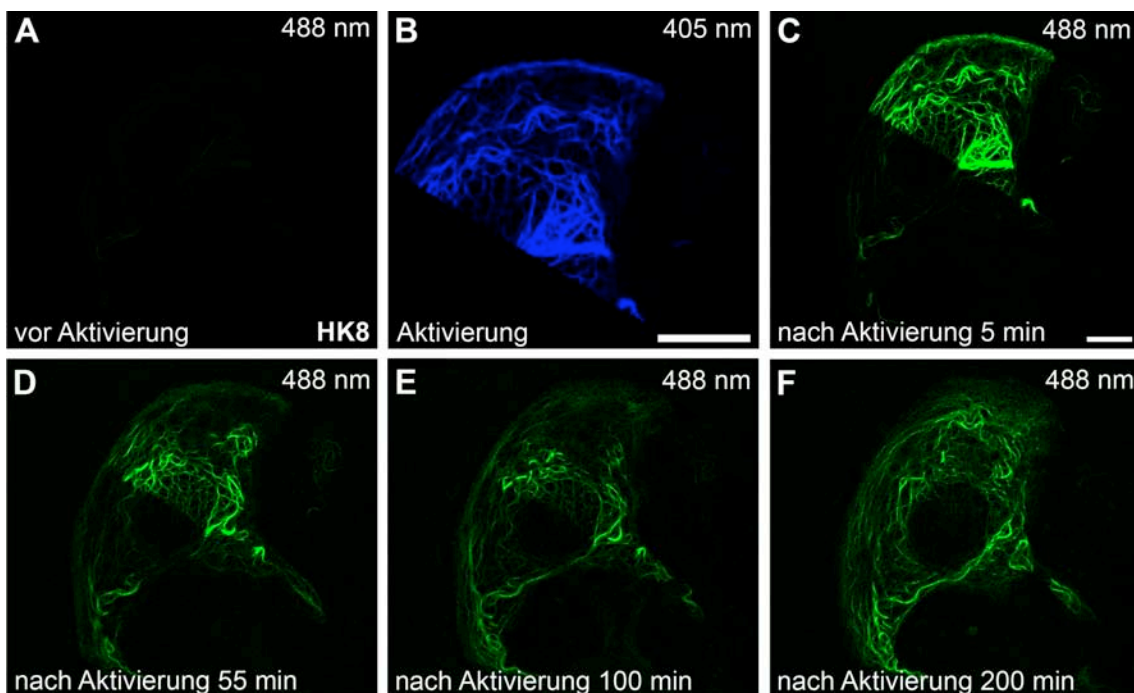


Abb. 36: Photoaktivierung von KFs in PLC-Zellen. (A) Konfokale Lebendzellaufnahmen mit dem Plasmid pHK8-paGFP transfizierte PLC-Zellen zeigen kein Fluoreszenzsignal bei 488 nm. Erst nach Photoaktivierung der oberen Zelhälfte durch einen ROI-Scan bei 405 nm und 100%-iger Laserintensität (B) können fluoreszierende KFs nachgewiesen werden (C). Lebendzellaufnahmen bei 488 nm zeigen die Reorganisation der Filamente, bis wieder ein komplettes Keratinnetzwerk vorliegt (C- F). Größenbalken: 10 μ m.

Abb. 36 A zeigt eine Aufnahme bei 488 nm einer PLC-Zelle vor der Photoaktivierung. In der Aufnahme sind keine fluoreszierenden Moleküle zu erkennen. Die Aktivierung erfolgte anschließend in der oberen Zelhälfte durch einmalige Bestrahlung mit UV-Laserlicht bei 100% Intensität. Die Aufnahme in Abb. 36 B bei 405 nm zeigt fluoreszierende KFs in der oberen, photoaktivierten Zelhälfte. Anschließende Lebendzellaufnahmen zeigen das Auftauchen fluoreszierender KFs in der unteren, nicht aktivierten Zelhälfte (Abb. 36 C-F). Nach drei Stunden ist ein vollständiges Keratinnetzwerk zu erkennen (Abb. 36 F).

In Abb. 37 erfolgte die Photoaktivierung der in PLC-Zellen transfizierten HK8-paGFP-cDNA in der linken Zelhälfte (Abb. 37 A). Konfokale Zeitraffer-Lebendzellaufnahmen (Film 21) bei 488 nm zeigen,

dass fluoreszierende Keratine zunächst in der Zellperipherie in der nicht-aktivierten, rechten Zellhälfte auftauchen (Abb. 37 A'). Die Fluoreszenzintensität in der photoaktivierten Zellhälfte nimmt ab. Nach knapp vier Stunden weist die Zelle ein gleichmäßig fluoreszierendes Keratinnetzwerk auf (Abb. 37 A'', siehe auch Abb. 36 F). Fluoreszenzintensitätsmessungen verdeutlichen die Abnahme der Intensität in der nicht-aktivierten Zellhälfte (grüner Balken) und Zunahme der Intensität in der aktivierten Zellhälfte (roter Balken).

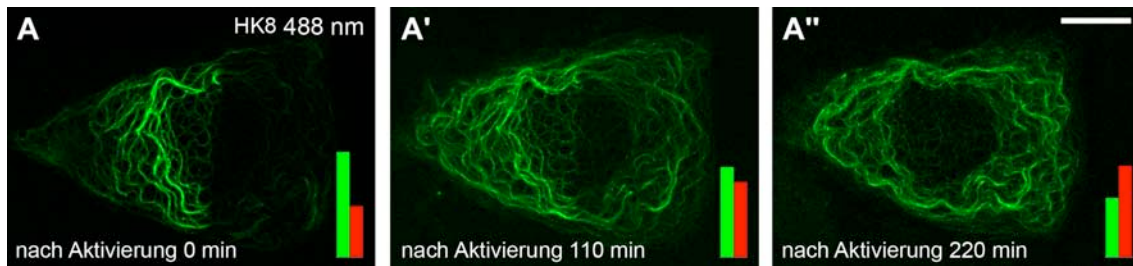


Abb. 37: Zeitraffer-Laserscanningaufnahmen von photoaktivierten KFs in der linken Zellhälfte. Die Aufnahmen erfolgten bei 488nm nach der Transfektion des Plasmids HK8-paGFP in PLC-Zellen transfiziert (Film 21, A). Fluoreszierende KFs tauchen zuerst in der Zellperipherie der nicht-aktivierten Zellhälfte auf (A'). Nach über drei Stunden besitzt die Zelle ein im gesamten Zytoplasma ausgebreitetes Keratinnetzwerk (A''). Die Fluoreszenzintensitätsmessungen verdeutlichen die Abnahme der Intensität in der nicht-aktivierten Zellhälfte (grün) und Zunahme der Intensität in der aktivierten Zellhälfte (rot). Die Messungen wurden von R. Windoffer durchgeführt. Größenbalken: 10 μ m.

Um Vergleiche zwischen dem konstitutiv exprimierten HK18-Netzwerk und dem photoaktivierten HK8-Netzwerk bezüglich ihrer Verteilung und Dynamik herzustellen zu können, wurde zunächst ein rotfluoreszierendes K18-Konstrukt generiert. Für die Herstellung des Vektors pHK18-mRFP wurde das 1,3 kb große K18-Fragment aus pHK18-YFP durch Restriktion mit den Restriktionsenzymen EcoRI und SacII ausgeschnitten und in pmRFP-N1 wieder einligiert.

Im Anschluß erfolgte die Doppel-Transfektion der Plasmide pHK8-paGFP und pHK18-RFP in PLC-Zellen. Nach Photoaktivierung der unteren Zellhälfte einer doppelt-transfizierten PLC-Zelle mit 405 nm Laserlicht wurden Lebendzellserien zum einen bei 488 nm zur Detektion von HK8-paGFP und zum anderen bei 561 nm zur Detektion von HK18-RFP im Abstand von 10 min aufgenommen. Auch hier treten fluoreszierende KFs zuerst in der Peripherie der nicht-aktivierten Zellhälfte auf.

Abb. 38 zeigt die Aufnahmen von K8 (A-D) und K18 (A'-D') zu gleichen Zeitpunkten. Die Vergrößerung in Abb. 38 D zeigt, dass die Positionen beider Keratinnetze übereinstimmen; die stärkste Deckung findet sich in der Zellperipherie. Dieser Bereich zeigt eine orange Färbung in der überlagerten Darstellung in Abb. 38 D''. In der perinukleären Region wird die Ko-Lokalisierung schwächer, es sind nur rote und grüne Filamente zu sehen.

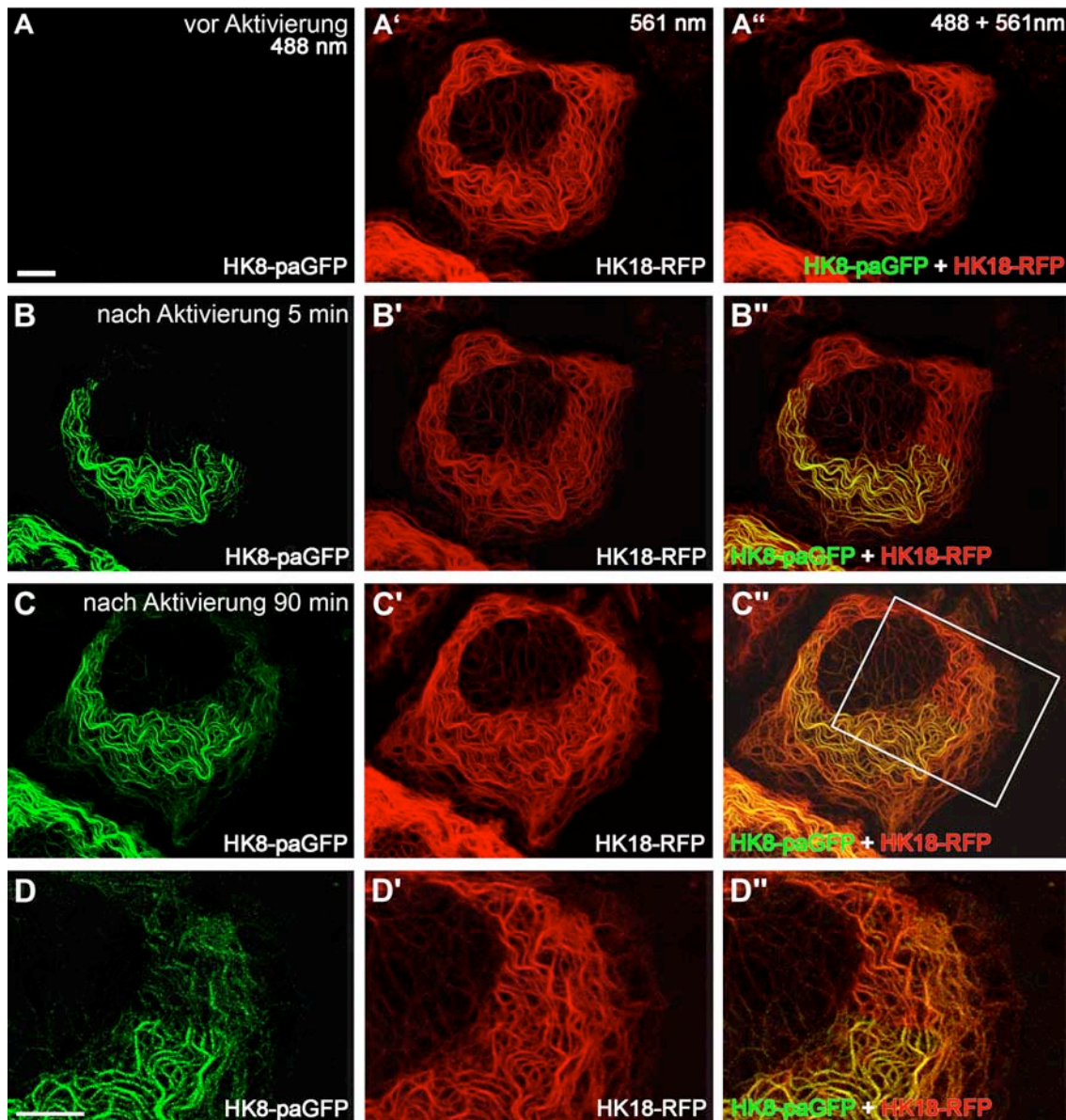


Abb. 38 Ko-Verteilung der endogenen HK18- und photoaktivierten HK8-Netzwerke. (A) Konfokale Lebendzellaufnahmen einer PLC-Zelle, die mit HK8-paGFP-cDNA und HK18-RFP-cDNA transfiziert wurde. (B) Die Photoaktivierung erfolgte in der unteren Zelhälfte. (C und Vergrößerung in D): In der Zellperipherie der nicht-aktivierten Zelle kann der Aufbau des HK8-Netzwerks in Übereinstimmung mit dem HK18-Netzwerks nachgewiesen werden. Die stärkste Ko-Lokalisierung ist dabei in der Zellperipherie zu beobachten (C''- und D''); verdeutlicht durch die orange Färbung in der übereinandergelegten Darstellung. Größenbalken: 10 μm .

Alle drei Versuche zeigen die Entstehung von fluoreszierenden KFs in der nicht-aktivierten Zelhälfte. Diese sind zuerst in der Zellperipherie detektierbar: hier findet eine kontinuierliche Neubildung statt. Anschließend wandern sie in Richtung Zellzentrum und bauen somit ein neues Netzwerk auf. Die Fluoreszenzintensität nimmt in der aktivierten Zelhälfte ab. Diese neugebildeten fluoreszierenden KFs können nur durch den Abbau von fluoreszierenden Filamenten in der aktivierten Zelhälfte entstehen. Offenbar finden kontinuierliche Auf- und Abbau- Zyklen von Keratinfilamenten statt (Turnover). Der Aufbau des Netzwerkes findet in der Peripherie, der Abbau im perinukleären

Zellbereich statt. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität in der Zellmitte spricht zum einen für die Verschmelzung von KFs und zum anderen für den Abbau der Filamente in der perinukleären Region.

Keratinnetzwerke bilden sich in der Zellperipherie von fusionierten Zellen

Für die weitere Untersuchung des Keratinnetzwerk-Turnovers mit einer alternativen Methode sollten Zellen generiert werden, welche mit unterschiedlichen fluoreszierenden Proteinen gekoppelte Keratinnetzwerke besitzen. Hierfür wurde zunächst eine stabile Zelllinie, die rotfluoreszierendes K8 synthetisiert, hergestellt.

Eine höhere Fluoreszenzintensität als mRFP besitzt das neu hergestellte „Fruitcolour-Farbprotein“ mCherry (*Monomeric cherry (Red) Fluorescent Protein*; SHANER *et al.*, 2004; von Roger Tsien zur Verfügung gestellt). Zunächst wurde aus pRSET-B-mCherry das 750 bp große mCherry-Fragment durch Restriktion mit BamH1 und Not1 ausgeschnitten und in pEYFP-N1, in dem zuvor das CFP-Fragment durch Verdau mit den gleichen Enzymen entfernt wurde, eingefügt. Das resultierende Plasmid wurde pmCherry benannt. Anschließend wurde die ECFP-cDNA des pHK8-CFP-Vektors nach Restriktion mit BamHI und BsrGI durch mCherry-cDNA aus dem Plasmid pmCherry (siehe oben), ersetzt. Das resultierende Plasmid wurde pHK8-mCherry bezeichnet.

Der stabile Zellklon PK8-7 wurde mittels Lipofectamine-basierter Transfektion des Vektors pHK8mCherry von PLC-Zellen wie in 3.2.3.2.2 beschrieben generiert.

Die Verschmelzung von PK18-5-Zellen, welche grünfluoreszierendes K18 synthetisieren, und PK8-7-Zellen, welche rotfluoreszierendes K8 synthetisieren, wurde mit Hilfe von Polyethylenglykol (siehe 3.2.3.8.) erreicht. Die Zellen beider Zelllinien wurden zusammen ausgesät und nach dem Absetzen nach etwa 4 Std mit 50%-igem Polyethylenglykol behandelt. Anschließend wurden nach verschiedenen Zeitabständen (1-5 Std) konfokale Laserscanning-Aufnahmen angefertigt, um die Dynamik der gemischten Netzwerke zu untersuchen. Es wurde beobachtet, dass der Aufbau des neuen gemeinsamen KF-Netzwerks in den fusionierten Zellen in der Zellperipherie stattfindet.

Abb. 39 A und B zeigen fusionierte Zellen nach drei Stunden (lebend, A) und nach fünf Stunden (fixiert, B) nach der Verschmelzung. Das Heterokaryon in Abb. 39 A- A'' besitzt zwei Zellkerne, welche mit N1 und N2 bezeichnet sind. Der linke Nukleus N1 ist von der HK8-mCherry produzierenden Zelle abgeleitet (Abb. 39 A), der rechte Nukleus N2 von der HK18-YFP produzierende Zelle (Abb. 39 B). Beide Netzwerke überlagern sich in der Zellperipherie der Hybridzelle, was durch die gelb-orange Fluoreszenz in der übereinandergelegten Darstellung in Abb. 39 A'' erkennbar ist. Um die zwei Zellkerne herum sind getrennte HK8- (rot) und HK18- (grün) Netzwerke sichtbar.

Die fusionierte Zelle in Abb. 39 B weist einen ähnlichen Zustand auf. Auch hier die sind die verschiedenen Netzwerke in der Zellperipherie des Heterokaryons ko-lokalisiert: Die übereinandergelegten Bilder in Abb. 39 B'' weisen eine gelb-orange Fluoreszenz in der Peripherie des Heterokaryons auf. Die ehemaligen Netzwerke der fusionierten Zellen sind um die drei Zellkerne herum zu sehen: N1 (rot, HK8-mRFP), N2 (grün, HK18-YFP) und N3 (ebenfalls grün, HK18-YFP).

Diese Fusionsversuche bestätigen den durch Photoaktivierungsversuche beobachteten KF-Turnover mit der Entstehung der Filamente in der Peripherie und den Abbau in der Zellmitte, da die Vermischung der verschiedenen Netzwerke zuerst in der Zellperipherie auftritt.

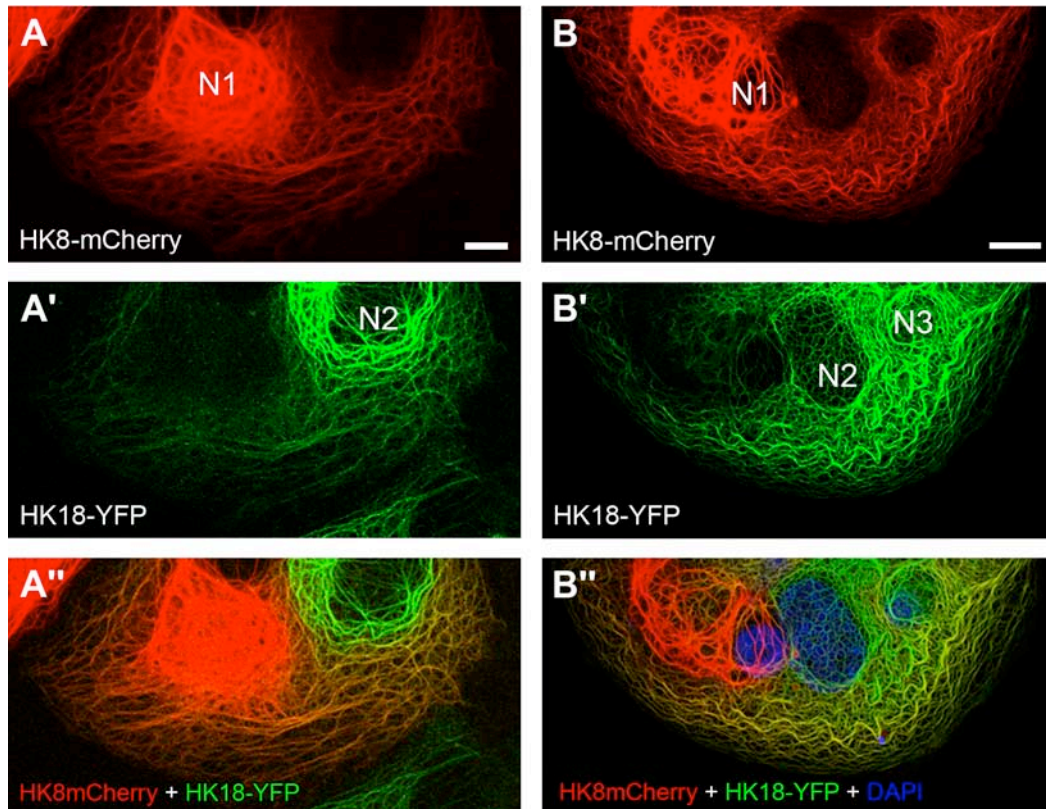


Abb. 39: Der Aufbau des KF-Netzwerks findet in fusionierten Zellen in der Zellperipherie statt. Konfokale Lasersanning-Aufnahmen von Heterokaryen, welche durch Behandlung von PK18-5- und PK8-7-Zellen mit 50%-igem PEG hergestellt wurden. Die rot- und grünfluoreszierenden Keratinnetzwerke sind in der Peripherie der fusionierten Zellen überlagert (A, nach 3 Stunden, B nach 5 Stunden), welches durch die gelb-orange Fluoreszenz deutlich zu erkennen ist. Die perinukleären Bereiche weisen nur die einzelnen Netzwerke der ehemaligen Zellen auf. Die jeweiligen Zellkerne der fusionierten Zellen sind mit N beschriftet (A'' und B''). Größenbalken: 10 μ m

Der Keratin-Turnover persistiert in Gegenwart von Translationsinhibitoren

Da völlig unklar ist, ob Keratinfilamente *de novo* synthetisiert werden oder ob ein ständiger Auf- und Abbau aus Untereinheiten stattfindet, sollte die Proteinbiosynthese gehemmt und Zeitrafferaufnahmen der inhibierten Zellen angefertigt werden.

Die Proteinbiosynthese lässt sich durch den Einsatz von Translationinhibitoren wirksam hemmen. Cycloheximid ist ein aus dem Pilz *Streptomyces griseus* gewonnenes Glutarimid-Antibiotika und hemmt die Bindung der Aminoacyl-tRNA Peptidyltransferase an den 60 S-Ribosomen und somit den Transfer der Aminosäuren von den Aminoacyl-tRNAs auf die entstehende Peptidkette. Das Nucleosid-Antibiotikum Puromycin stammt ebenfalls aus einem Pilz (*Streptomyces alboniger*) und induziert einen vorzeitigen Kettenabbruch durch Anbindung als Strukturanaloga zum 3'-Ende der Tyrosyl-tRNA.

PK18-5-Zellen wurden in getrennten Versuchen jeweils mit einem der beiden Translationsinhibitoren behandelt, um zu überprüfen, ob die Bildung der KFs in der Zellperipherie abhängig von der Proteinbiosynthese verläuft. 17 μM Cycloheximid und 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Puromycin wurden eingesetzt, da diese Konzentration nach 3 Stunden zum Absterben der Zellen führt (WINDOFFER *et al.*, 2000). Lebendzellaufnahmen zeigen nach Behandlung der PK-18-5-Zellen mit beiden Inhibitoren eine persistierende KFP-Bildung (siehe Film 22 und 23).

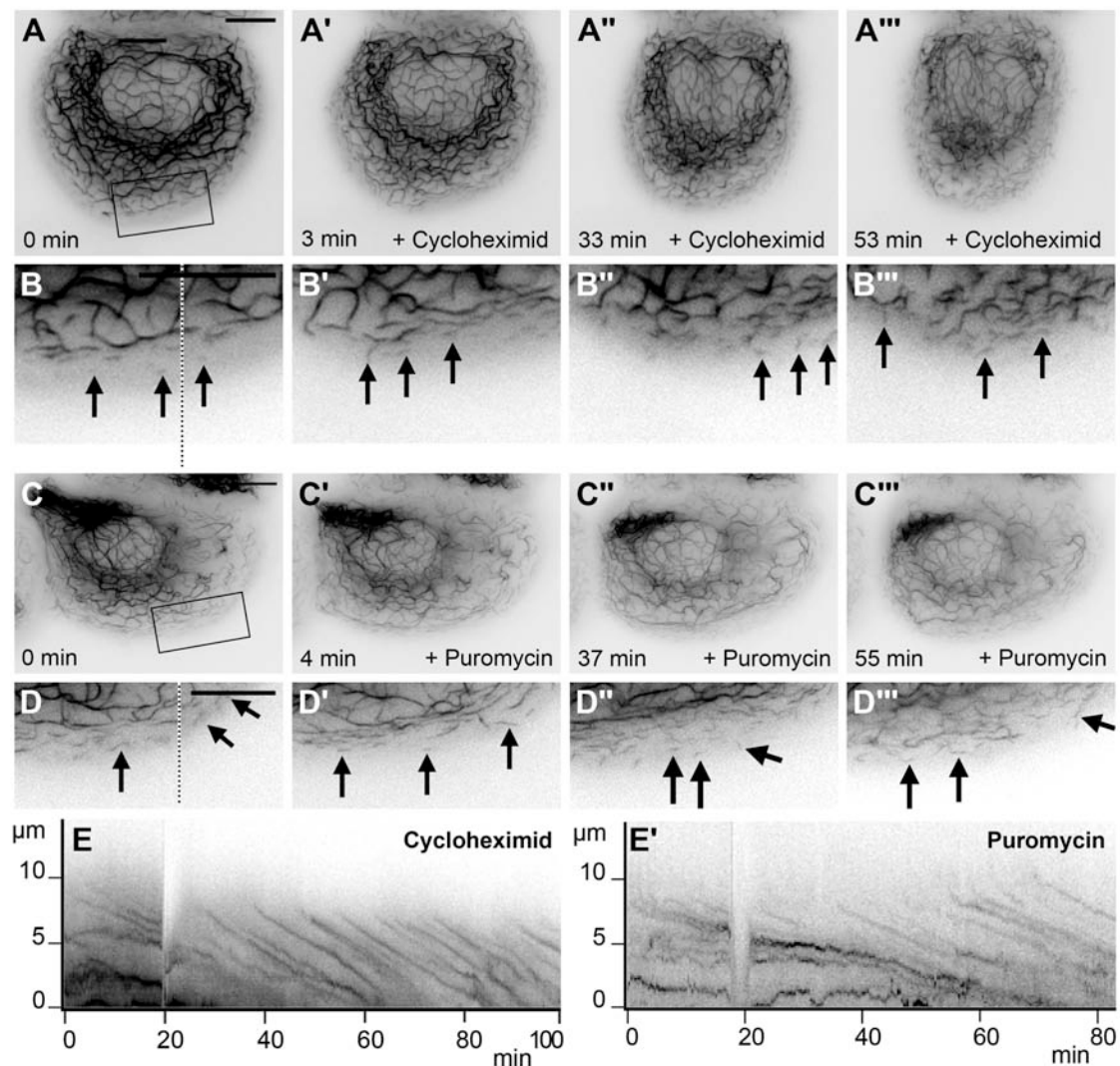


Abb. 40: Die Bildung von KFPs persistiert auch in Gegenwart von Translationsinhibitoren. Zeitraffer-Aufnahmen von PK18-5-Zellen vor und nach Zugabe von Cycloheximid (Film 22) und Puromycin (Film 23). (A-B) Nach Zugabe von 17 μM Cycloheximid werden weiterhin Filamentvorläufer in der Zellperipherie gebildet (Pfeile in den Vergrößerungen B-B''', welche der eingezeichneten Box in A entspricht) und nach innen transportiert. (C-D) Gleiches wird nach Zugabe von 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Puromycin beobachtet (Pfeile in den Vergrößerungen D-D''', welche der eingezeichneten Box in C entspricht). Die Raum-Zeit-Diagramme sind auch den Ausschnitten in B und D (gestrichelte Linien) entstanden und verdeutlichen die kontinuierliche Bildung und den zentripetalen Transport der KFPs (E und E'). Größenbalken: 10 μm .

Zunächst wurden die Zellen vor der Drogenzugaben gefilmt. Abb. 40 zeigt verschiedene Zeitabstände des Films 22, bei dem die PK18-5 Zellen mit Cycloheximid behandelt wurden. KFPs bilden sich in der

Zellperipherie und werden anschließend zentripetal transportiert (Abb. 40 A und Ausschnitte in B mit Pfeilen). Nach 20 min wird Cycloheximid-haltiges Hanks-Hepes-Medium zugegeben und ohne Unterbrechung weitergefilmt. Die Bildung von Keratinvorläufern lässt sich weiterhin in der Zellperipherie in der Nähe der Plasmamembran beobachten (Abb. 40 A'-A''' und Pfeile im Ausschnitt B'-B'''). Auch 53 min nach Drogenzugabe wird die Bildung von KFPs nicht gestoppt (Abb. 40 A''' und B''').

Abb. 40 C und D zeigen Zeitraffer-Aufnahmen von PK18-5-Zellen nach Zugabe von 2 µg/ml Puromycin (Film 23). KFPs werden kontinuierlich in der Zellperipherie gebildet. Die Pfeile in Abb. 40 C'-C''' und im Ausschnitt D'-D''' verweisen auf die neu entstehenden KFPs. Auch hier wird 55 min nach Drogenzugabe die Bildung von KFPs immer noch beobachtet (Abb. 40 C''' und D''').

In beiden Versuchen ziehen sich die Zellen zusammen und sterben etwa 5-8 Std nach Drogenzugabe; die Bildung der KFs findet allerdings bis zum Zelltod weiterhin statt.

Die Kymograme in Abb. 40 E und E' verdeutlichen die unbeeinflusste Bildung von KFs und ihren zentripetalen Transport nach der Drogenzugabe (Abb. 40 E, Cycloheximid nach 20 min; E' Puromycin nach 18 min, entstanden aus den Ausschnitten in B und D).

Da durch die Zugabe von Cycloheximid bzw. Puromycin keine Translation mehr stattfindet, kann die Bildung der KFPs in den behandelten Zellen nicht auf Neubildung durch Proteinbiosynthese beruhen. Die gebildeten Filamentvorläufer müssen sich aus einem Pool, der durch den Abbau von Filamenten (in der perinukleären Region) gefüllt wird, rekrutiert haben. Demzufolge findet ein kontinuierlicher Turnover statt.

4.2 Regulation und Modulation der Dynamik von IF-Netzwerken

Das Zytolinkerprotein Plectin besitzt N-terminal eine Aktin-Binde-Domäne (ABD) und C-terminal eine IF-Bindedomäne und ist somit in der Lage, verschiedene Komponenten des Zytoskelettes miteinander zu verbinden. Damit könnte es die Verbindung zwischen MF und den zentripetal wandernden KFPs herstellen. Da bei verschiedenen Plectin-Isoformen eine Lokalisierung an FAs nachgewiesen wurde und hypersphosphorylierte Keratingranula mit Plectin assoziiert sind, sollte untersucht werden, ob Plectin einen Einfluss auf die KF-Bildung besitzt.

4.2.1. Spezifische Plectinisoformen ko-lokalisieren mit naszierenden KFPs

In der Maus wurden zahlreiche N-terminale Plectin-Isoformen beschrieben, die durch alternatives Spleißen der ersten Exons entstehen und zell- und entwicklungspezifisch unterschiedliche synthetisiert werden (FUCHS *et al.*, 1999; REZNICZEK *et al.*, 2003). Im Menschen sind vier alternativ gespleißte erste Exons bekannt (ZHANG *et al.*, 2004), weitere N-terminale Isoformen sind kürzlich

beschrieben worden (Arto Maatta und Lorna McInroy, University of Durham, UK). Die Isoformen Plectin 1A-1K beinhalten die Exone 1 bis Exon 8.

Im Anhang befindet sich ein manuell mit Hilfe des Programms McClade erstelltes Alignment dieser Isoformen, welches innerhalb der ersten 500 bp große Sequenzunterschiede aufweist. Ab Position 561, welche dem Exon 6 entspricht, sind die Sequenzen der Isoformen wieder identisch.

Mit Hilfe von Antikörperfärbungen und Fluoreszenzaufnahmen sollten die Plectin-Isoformen näher charakterisiert werden. Durch Doppeltransfektionen der Plectin-Isoformen und FA-Proteinen sollte geklärt werden, ob die Isoformen ein FA-spezifisch lokalisiert sind. Darüber hinaus sollte überprüft werden, ob die Isoformen in verschiedenen Epithelzellen synthetisiert werden.

Nach Umklonierung der Plectin-Isoformen in rotfluoreszierende Vektoren sollte in Keratin-exprimierenden Zellen mittels Lebendzellaufnahmen untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen Plectin und der KF-Bildung besteht.

Die N-terminalen Plectin-Isoformen werden zelltypspezifisch exprimiert

Die Hilfe der Real-Time-PCR wurde überprüft, inwieweit die verschiedenen Plectin-Isoformen in Epithelzellen synthetisiert werden.

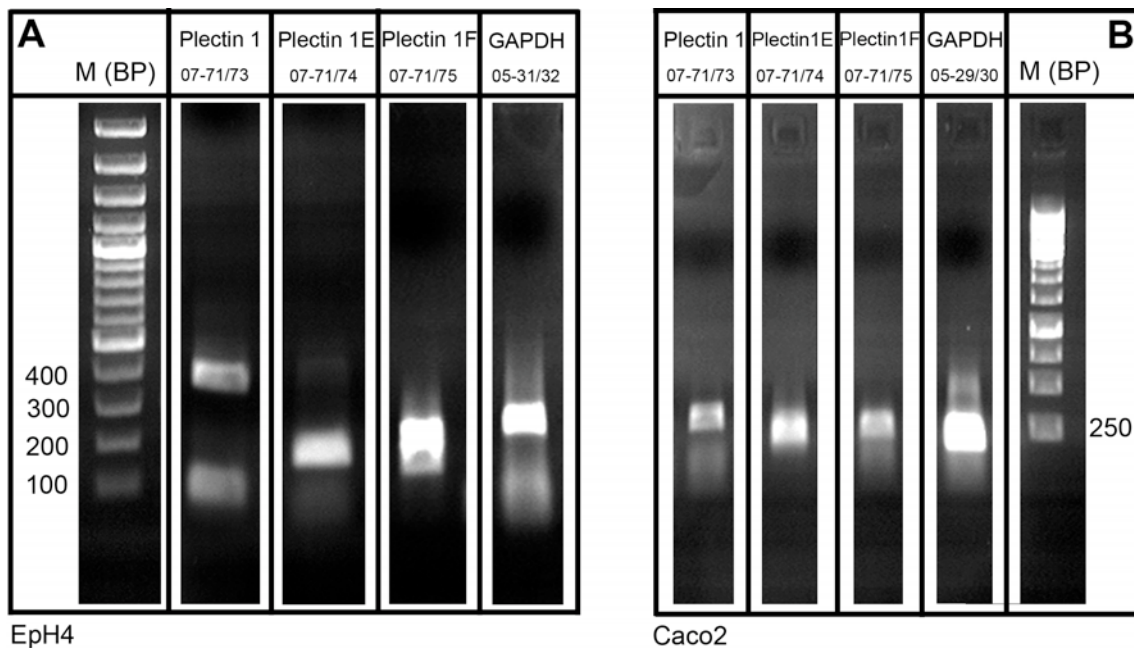


Abb. 41: Nachweis von Plectin-Isoformen durch quantitative Real-Time-PCR in murinen und humanen Epithelzellen mittels Isoform-spezifischer Primer. Aus EpH4- und Caco2-Zellen wurde RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. (A) Gelelektrophoretische Auftrennung der Real-Time-PCR-Produkte ausgehend von cDNA aus murinen EpH4-Zellen (A) bzw. ausgehend von humanen Caco2-Zellen (B). In beiden Epithelzelllinien konnten die Plectin-Isoformen 1 (Primer 07-71/73), 1 E (Primer 07-71/74) und 1 F (Primer 07-71/75) nachgewiesen werden. Die Produkte weisen leicht unterschiedliche Größen im Vergleich Maus/Mensch auf. Als Kontrolle dienten die Produkte der Reaktion mit GAPDH-Primern (05-31/32 für die murinen EpH4-Zellen und 05-29/30 für humane Caco2-Zellen).

Die Plectin-Isoformen 1, 1E und 1F wurden mit Isoform-spezifischen Primern, welche die Exone 1 bis 4 umfassen (siehe Tabelle 17 und 18) in murinen und humanen Epithelzelllinien untersucht. Der reverse Primer 07-71 bindet an das Ende von Exon 4, die isoformspezifischen Primer 07-73 (Plectin 1), 07-74 (Plectin 1E) und 07-75 (Plectin 1F) an Anfang des Exons 1 (genaue Positionen im Alignment im Anhang). Als Kontrolle dienten Maus- und Mensch-spezifische GAPDH-Primer (05-31/32 bzw. 05-29/30). Erwartet wurden Fragmente zwischen 200 und 400 bps. Zunächst wurde RNA aus murinen EpH4-Zellen und humanen Caco2-Zellen isoliert und anschließend eine cDNA-Synthese durchgeführt (siehe 3.2.1.1 und 3.2.1.3). Ausgehend von der cDNA wurde die Real-Time-PCR wie in 3.2.1.6 beschrieben durchgeführt.

Plectin-Isoform-spezifische Antikörper lokalisieren unterschiedlich in verschiedenen Zellen

Lorna McInroy (University of Durham, UK) stellte ebenfalls polyklonale Antikörper, die gegen den N-Terminus der beiden Isoformen Plectin 1 und Plectin 1F gerichtet sind, her. In humanen Darmadenokarzinomzellen (SW-480) zeigte sie, dass der anti-Plectin 1F-Antikörper, der nur gegen das erste Exon gerichtet ist, eine Anfärbung von fokalen Adhäsionskomplexen aufweist (unpublizierte Beobachtungen). Immunzytochemische Markierungen mit beiden Isoform-spezifischen Antikörpern sollten die Lokalisation in EpH4-, PLC- sowie Caco2-Zellen klären.

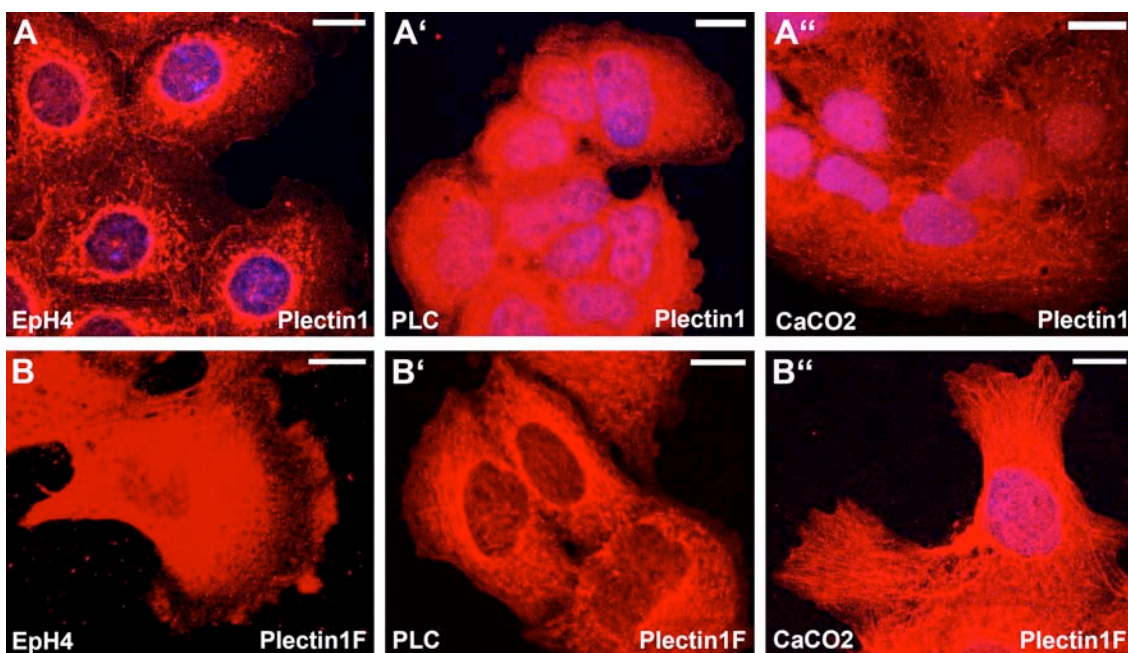


Abb. 42: Immunzytologischer Nachweis der Plectin-Isoformen 1 und 1F. (A) Konfokale Fluoreszenzaufnahmen von Methanol und Aceton fixierten EpH4-, PLC- und Caco2-Zellen zeigen eine zytoplasmatische Anfärbung nach Inkubation mit dem anti-Plectin 1-Antikörper und einem Cy3-gekoppeltem Sekundär-Antikörper. EpH4- und Caco2-Zellen weisen außerdem eine Anfärbung filamentartiger Strukturen auf; in EpH4-Zellen ist des Weiteren die Zellperipherie angefärbt (A'). (B) Die Behandlung mit dem anti-Plectin 1F-Antikörper zusammen mit einem Cy3-gekoppeltem Sekundär-Antikörper führt zu einem filamentartigen Muster in allen drei untersuchten Zelllinien. In der EpH4-Zelle sind weiterhin die Randbereiche der Lamellipodien angefärbt. Größenbalken: 10 µm.

Abb. 42 A - A'' zeigt eine zytoplasmatische Verteilung des anti-Plectin 1-Antikörpers in allen drei Zelllinien, in EpH4- Caco2-Zellen werden zusätzlich filamentartige Strukturen angefärbt (Abb. 42 A und A''). Nur in EpH4-Zellen ist weiterhin die Zellperipherie markiert (Abb. 42 A). Der anti- Plectin 1F-Antikörper weist eine filamentartige Verteilung im gesamten Zytoplasma in allen drei Zelllinien auf (Abb. 42 B-B''). In EpH4-Zellen sind die Randbereiche der Lamellipodien deutlich markiert (Abb. 42 B). Eine distinkte Anfärbung von fokalen Adhäsionskomplexen konnte in keiner Markierung eindeutig nachgewiesen werden.

Plectin ko-lokalisiert mit Keratinfilamenten und PC-mutierten Keratingranula

Um einen potentiellen Zusammenhang zwischen Plectin und der KF-Bildung zu untersuchen, wurde zunächst ein immunzytologischer Nachweis der verschiedenen Plectin-Isoformen in Zellen, die fluoreszierende Keratine synthetisieren, durchgeführt.

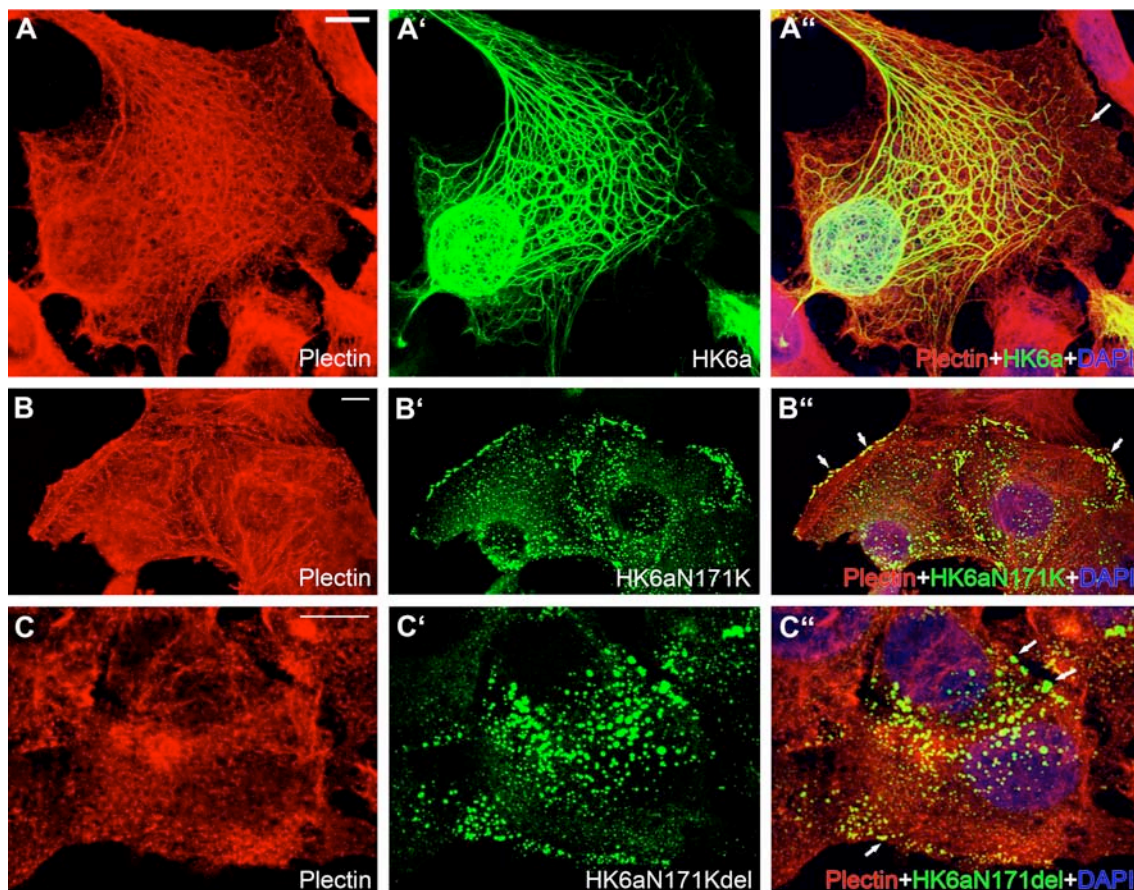


Abb. 43: Nachweis von Plectin 1 durch Antikörperfärbung in Zellen, die fluoreszierende Keratine synthetisieren. Verschiedene PLC-Zellklone wurden mit Methanol und Aceton fixiert und mit einem AK gegen Plectin und einem Cy3-gekoppelten Sekundär-Antikörper behandelt. Die LSM-Aufnahmen zeigen fixierte PK6a-5- (A), PK6aN171K-1- (B) PK6aN171del-2- (C) Zellen. (A, B) Plectin ist in den in PK6a- und PK6aN171K-Zellen filamentös verteilt. KFs und Plectin ko-lokalisieren vor allem in der Zellmitte (A''), Keratingranula und Plectin in der Zellperipherie (B'', Pfeile). In PK6aN171del-2-Zellen weist Plectin hingegen eine diffuse Verteilung auf (C); die Bruchstücke in der Peripherie ko-lokalisieren mit den Keratinaggregaten (C'', Pfeile). Größenbalken: 10µm.

Zunächst wurden die verschiedenen K6a-Zelllinien mit einem anti-Plectin 1-AK inkubiert, um zu untersuchen, ob KFs sowie durch die mutierten Keratine entstandenen Keratingranula mit Plectin ko-lokalisieren.

Die Zelllinien PK6a-5 und PK6aN171K-1 zeigen beide ein filamentöses Plectinmuster (Abb. 43, A und B). Die abgebildete PK6a-5-Zelle weist eine Ko-Lokalisierung von Plectin und Keratin im gesamten Zytoplasma auf; in der äußersten Zellperipherie sind nur Plectinfilamente und keine KFs, jedoch Keratin-Vorläufer zu sehen (Abb. 43 A'', Pfeile). In den PK6aN171K-1-Zellen sind Plectin und Keratingranula nur in der äußersten Peripherie gleich verteilt (Abb. 43 B'', Pfeile). In den PK6aN171del-2-Zellen hingegen erscheint das Plectin-Netzwerk in der Peripherie nicht mehr filamentös (Abb. 43 C). Interessanterweise sind kleine Brückstücke zu erkennen, die mit den Keratingranula ko-lokalisieren (Abb. 43 C'', Pfeile).

Plectin 1E und Plectin 1F lokalisieren an FAs

Weiterhin sollte die Lokalisierung der Plectin-Isoformen 1E und 1F mit Hilfe von Transfektion spezifischer pGFP-N2-Vektoren, welche die Exone 1 bis 8 des N-Terminus beinhalten, untersucht werden (Plasmide wurden von L. McInroy, University of Durham, UK, zur Verfügung gestellt).

Lebendzellaufnahmen von EpH4-Zellen, welche mit den Plasmiden pPlectin1E-GFP sowie pPlectin1F-GFP transfiziert wurden, zeigen die Lokalisation beider Isoformen an fokalen Adhäsionskomplexen sowie an Aktin-Stressfasern.

Abb. 44 A und B zeigen konfokale LSM-Aufnahmen von EpH4-Zellen, welche mit Plectin1F-GFP-cDNA und Paxillin-DsRed2-cDNA (Abb. 44 A) sowie RFP-Zyxin-cDNA (Abb. 44 B) transfiziert wurden. Plectin 1F markiert in beiden Bildern Aktin-Stressfasern (Abb. 45 A' und B'), welche mit FAs ko-lokalisieren (Abb. 44 A'' und B''). In den konfokalen Lebendzellaufnahmen der EpH4-Zellen, die mit Plectin1E-GFP-cDNA und Paxillin-DsRed2-cDNA (Abb. 44 C) sowie RFP-Zyxin-cDNA (Abb. 44 D) transfiziert wurden, wird ebenfalls eine Ko-Lokalisierung der Plectin-1E-markierten Stressfasern (Abb. 44 C' und D') mit den FAs beobachtet (Abb. 44 C'' und D'').

Zusammenfassend lokalisieren beide Isoformen an Aktin-Stressfasern. Plectin 1F ko-lokalisiert mit langgezogenen, reifen Adhäsionskomplexen (Abb. 45 A und B), Plectin 1E hingegen mit kleineren FAs (Abb. 45 C und D).

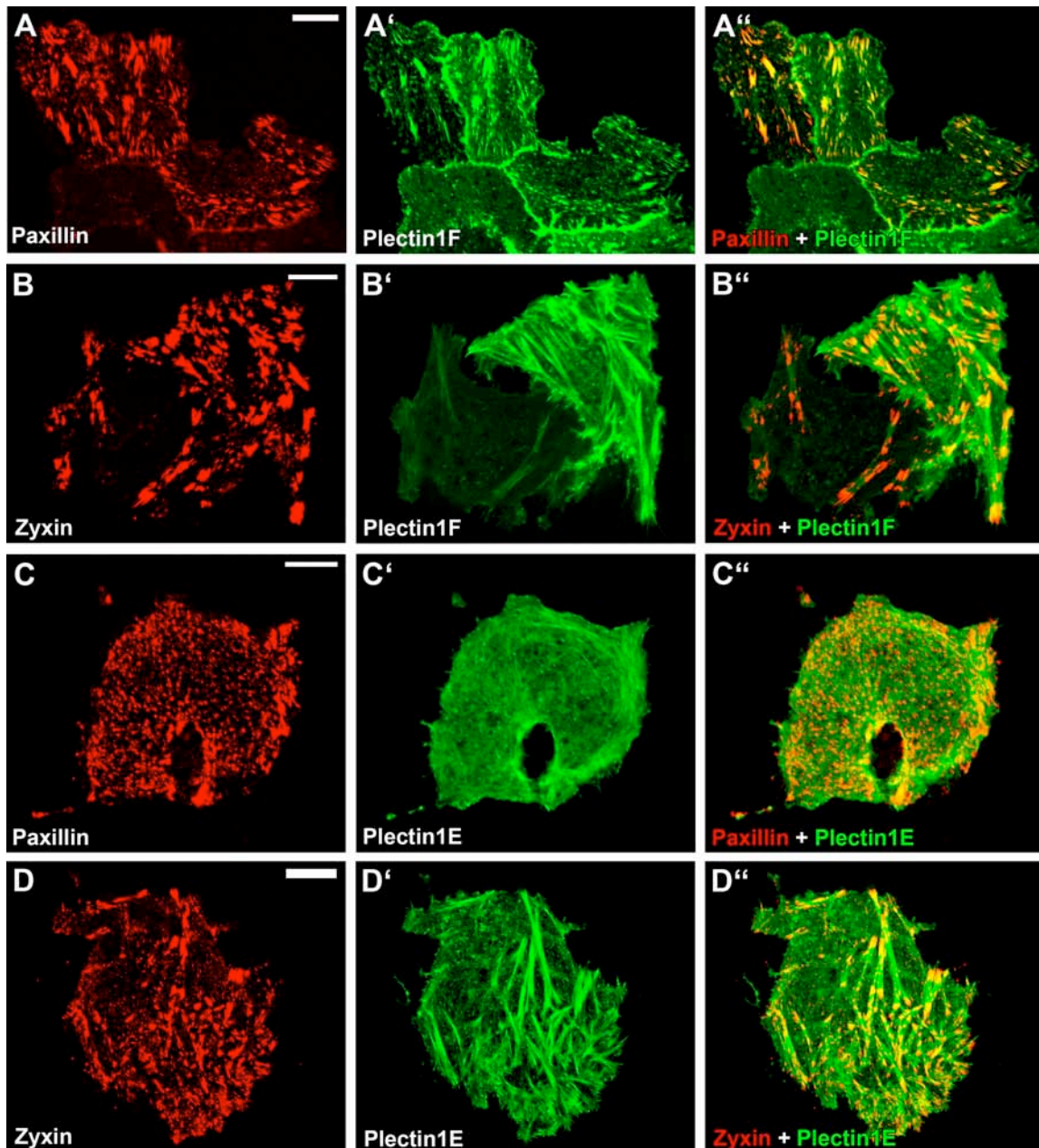


Abb. 44: Plectin1E-GFP und Plectin1F-GFP lokalisieren an fokale Adhäsionskomplexe und Aktin-Stressfasern: Konfokale Lebendzellaufnahmen der ko-transfizierten Isoformen für Plectin1F-GFP-cDNA sowie Plectin1E-GFP-cDNA und fluoreszierenden Adhäsionsmarkern in EpH4-Zellen. Plectin1F lokalisiert an Adhäsionen (A') und Stressfasern (B'), welche mit Paxillin-DsRed2- bzw. RFP-Zyxin-markieren FAs ko-lokalisieren (A'', B''). Plectin 1E ist ebenfalls an Stressfasern nachweisbar (D') und lokalisiert an kleinen FKs (C'), die mit der Paxillin-DsRed2-Markierung übereinstimmen (D''). Größenbalken: 10 μ m.

KFPs ko-lokalisieren mit Plectin 1E und Plectin 1F im Bereich von FAs

Zur Überprüfung der postulierten Verbindung zwischen MF und den zentripetal wandernden KFPs über Plectin sollte untersucht werden, ob eine Assoziation zwischen Plectin und KFPs nachweisen werden kann.

Zunächst wurde eine AK-Markierung mit dem anti-Plectin1F-Antikörper von fixierten EK18-1-Zellen durchgeführt. Konfokale LSM-Aufnahmen zeigen die Ko-Verteilung von Plectinfilamenten und Keratinfilamenten (Abb. 45 A). Da der anti-Plectin1F-Antikörper prominent in Lamellipodien

lokalisiert (Abb. 45 A'') und Plectin 1F im Bereich von Adhäsionskomplexen auftritt (Abb. 45 A), sollte zudem in Lebendzellenaufnahmen untersucht werden, ob KFPs auch an Plectin-markierten FAs entstehen.

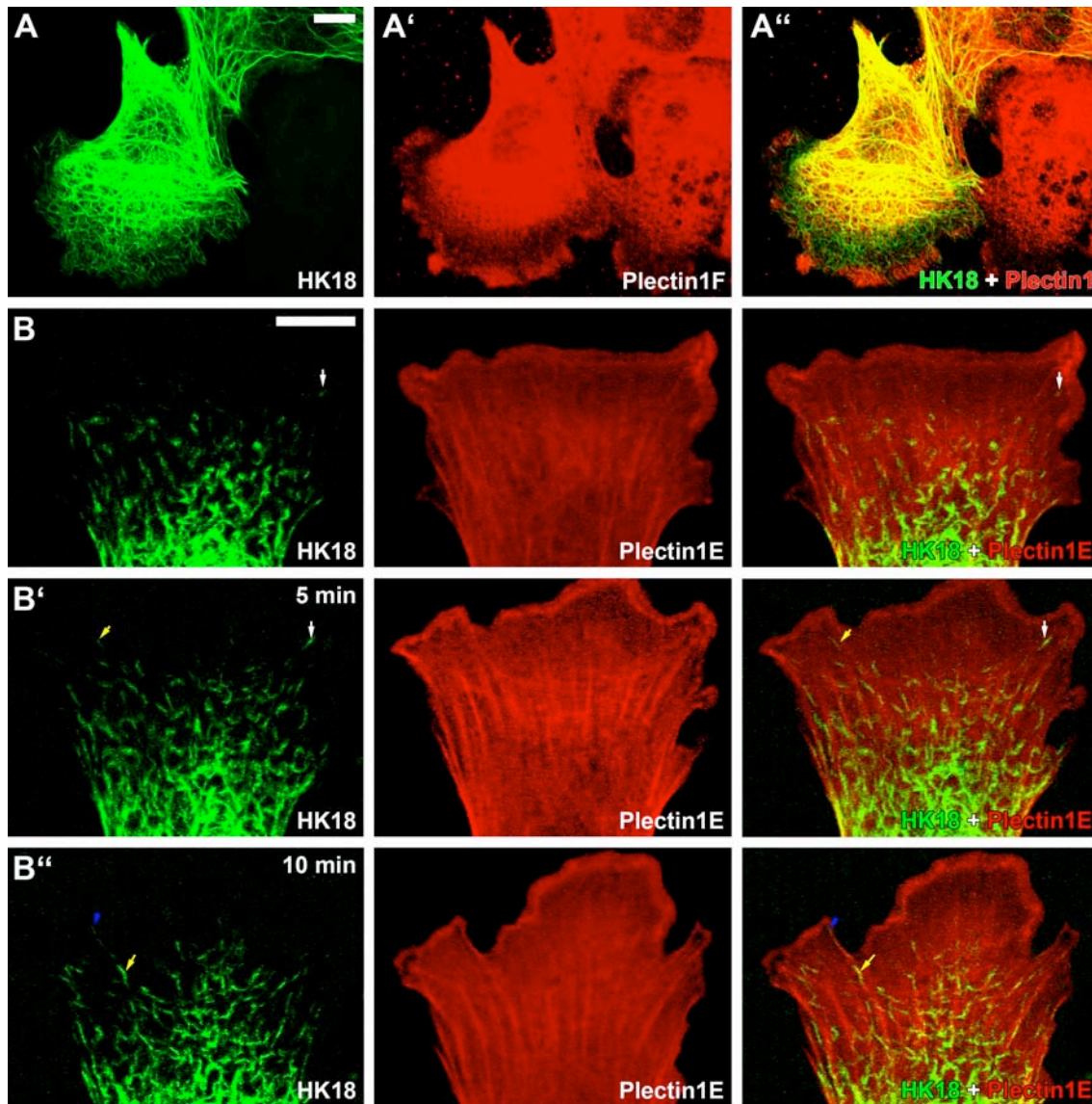


Abb. 45: KFPs ko-lokalisieren mit Plectin 1E. (A) EK18-1-Zellen wurden mit Methanol und Aceton fixiert und mit dem anti-Plectin1F-AK und einem Cy3-gekoppelten Sekundär-Antikörper behandelt. Die Keratin- und Plectin-Verteilung überlagern sich (gelb/orange Fluoreszenz in A''). (B) Die konfokale Zeitrafferaufnahme (Film 24) der Peripherie einer EK18-1-Zelle, welche mit Plectin1E-mRFP-cDNA transfiziert wurde, zeigt die Entstehung von KFPs in dem Plectin1E-markierten Rand des Lamellipodums in der Nähe der Plasmamembran (weißer Pfeil in B, gelber Pfeil in B' und in blauer Pfeil in B''). Die KFPs fusionieren miteinander und werden entlang den ebenfalls Plectin1E-markierten Stressfasern in Richtung Zellzentrum transportiert (gelbe Pfeile in B'- B''). Größenbalken: 10 μm .

Da die verfügbaren Plectin-Isoform-Konstrukte EGFP enthalten, mussten sie vor einer gemeinsamen Betrachtung mit Keratin-YFP-Konstrukten in eine andere Farbe umkloniert werden. Hierfür stand der Vektor pmRFP-C1 zur Verfügung. Dazu wurden Primer hergestellt, die eine BamH1-Schnittstelle aufweisen (siehe Tabelle 14). Plectin 1E-cDNA wurde mit den Primern 07-76 und 08-06 und Plectin

1F-cDNA mit den Primern 07-77 und 08-06 amplifiziert. Nach Aufreinigung der entstandenen Produkte wurden diese mit den Enzymen BamHI und HindIII geschnitten und in den mit den gleichen Enzymen aufgeschnittenen Vektor pmRFP-N1 einligiert. Die entstandenen Vektoren wurden pPlectin1E-mRFP sowie pPlectin1F-mRFP bezeichnet.

Um die Entstehung und Dynamik von KFPs zusammen mit den Plectin-markierten FAs beobachten zu können, wurden konfokale Zeitrafferaufnahmen von Zellen, die fluoreszenzmarkierte Keratin- und Plectin1E- bzw. Plectin1F-Konstrukte synthetisieren, erstellt.

Abb. 45 B und Film 24 zeigen konfokale Lebendzellaufnahmen der Zellperipherie einer EK18-1-Zelle, die Plectin1E-mRFP und HK18-YFP synthetisiert. KFPs entstehen am Rand des Plectin1E-markierten Lamellipodiums in der Nähe der Plasmamembran (weißer Pfeil in B, gelber Pfeil in B' und blauer Pfeil in B''). Die KFPs vergrößern sich, fusionieren miteinander und wandern durch die Zellperipherie hindurch an den Plectin-markierten Stressfasern entlang in Richtung Zellmitte (gelbe Pfeile Abb. 45 B' und B'').

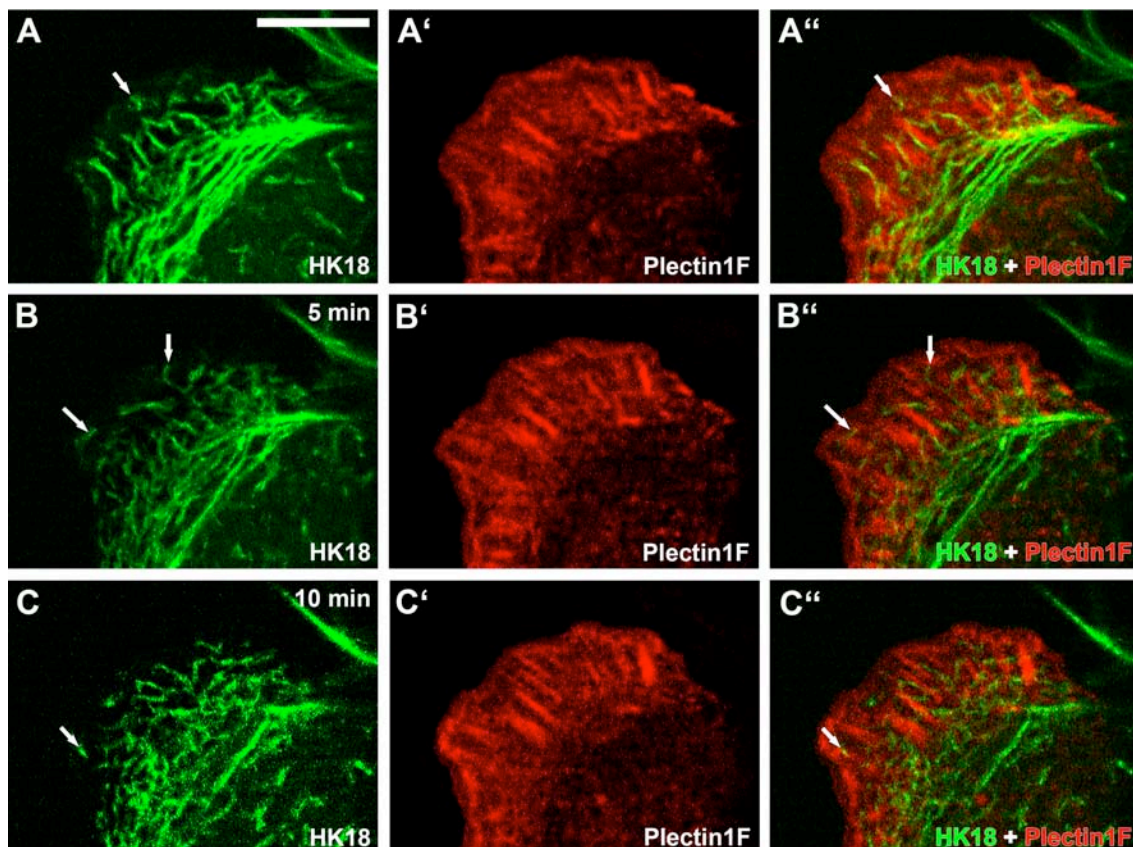


Abb. 46: KFPs ko-lokalisieren mit Plectin 1F. (A'-C') Konfokale Lebendzellaufnahmen (Film 25) von EK18-1-Zellen, welche mit Plectin1F-mRFP-cDNA transfiziert wurden, zeigen die Entstehung von KFPs in direkter Nachbarschaft zu den Plectin1F-markierten FAs (weißer Pfeil in A, A' und in B, B' nach 5 min Aufnahmezeit und in C, C' nach 10 min). Größenbalken: 10 μ m.

Abb. 46 zeigt konfokale Zeitrafferaufnahmen der Zellperipherie einer EK18-1-Zelle, die mit Plectin1F-mRFP-cDNA transfiziert wurde (Film 25). Die Plectin1F-mRFP markierten reifen FAs verändern sich

wenig über die gefilmte Zeit (Abb. 46 A'-C'). KFPs entstehen am peripheren Rand des Lamellipodiums (Pfeile in Abb. 46 A, B und C) in direkter Nachbarschaft zu den Plectin1F-markierten FAs, fusionieren mit weiteren KFPs und werden in Richtung des Zellzentrums transportiert (Pfeile in Abb. 46 B und C).

4.2.2 Modulation der FAK-Aktivität beeinflusst die Keratinfilament-Netzwerkorganisation

Die FAK spielt als Serin-Threonin-Kinase mit zahlreichen Phosphorylierungsstellen eine entscheidende Rolle in zahlreichen Signalwegen. Da sie den Auf- und Abbau der FAs koordiniert, sollte untersucht werden, ob die FAK in die Keratinnetzwerkorganisation involviert sein könnte. Hierfür sollten zunächst immunzytologische Untersuchungen mit einem phospho-spezifischen Antikörper in verschiedenen Keratin-exprimierenden Zelllinien durchgeführt werden. Des Weiteren sollte mit dominant-aktiven und dominant-negativen FAK-Konstrukten die FAK-Aktivität moduliert, und mit Hilfe von Lebendzellaufnahmen der Einfluß auf die Entstehung und Organisation des Keratinnetzwerkes untersucht werden.

Die aktivierte FAK ko-lokalisiert mit KFs und PC-mutierten Keratingranula

Die FAK ist eine Tyrosinkinase, die eine zentrale Rolle in der Signalverarbeitung und dem Auf- und Abbau der Adhäsionskomplexe einnimmt (ZAMIR und GEIGER, 2001). Die Autophosphorylierung am Tyrosin 397 wird unter anderem durch Bindung an Integrine ausgelöst, welche wiederum die Phosphorylierung weiterer FAK-bindender FA-Proteine nach sich zieht. Immunzytologische Färbungen mit einem Antikörper gegen die aktivierte FAK am Tyrosinrest 397 (FAK-Y) wurden an allen PK6a-Zellklonen durchgeführt, um zu überprüfen, ob auch hier die FAK mit KFPs ko-lokalisiert. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob Lokalisation und Expression von FAK in den PC-Keratin-Mutanten verändert ist.

LSM-Aufnahmen der immunzytologischen Färbungen zeigen die Ko-Lokalisierung der KFs sowie mutierter Keratingranula mit der aktivierten FAK. Abb. 47 zeigt die fixierten und mit dem phosphospezifischen anti-FAK-Y-Antikörper behandelten Zellen. PK6a-5- (Abb. 47 A) und PK6aN171K-1- (Abb. 47 B) Zellen weisen eine Lokalisierung der aktivierten FAK an Adhäsionskomplexen auf. Reife FAs sind in der Zellperipherie in der Nähe der Plasmamembran zu sehen, KFs innerhalb der gesamten Zelle. PK6aN171del-2-Zellen zeigen im Vergleich zu den beiden anderen Zellklonen eine diffuse Markierung in der gesamten Zelle und nur wenige FAs in der Zellperipherie (Abb. 47 C). Die KFPs in der PK6a-5-Zelle (Abb. 47 A'') sowie Keratingranula der PK6aN171K-1-Zelle (Abb. 47 B'') ko-lokalisieren mit der FAK. In der PK6aN171del-2-Zelle überlagern nur wenige Keratingranula mit den FAK-Y-markierten Adhäsionen (Abb. 47 C'').

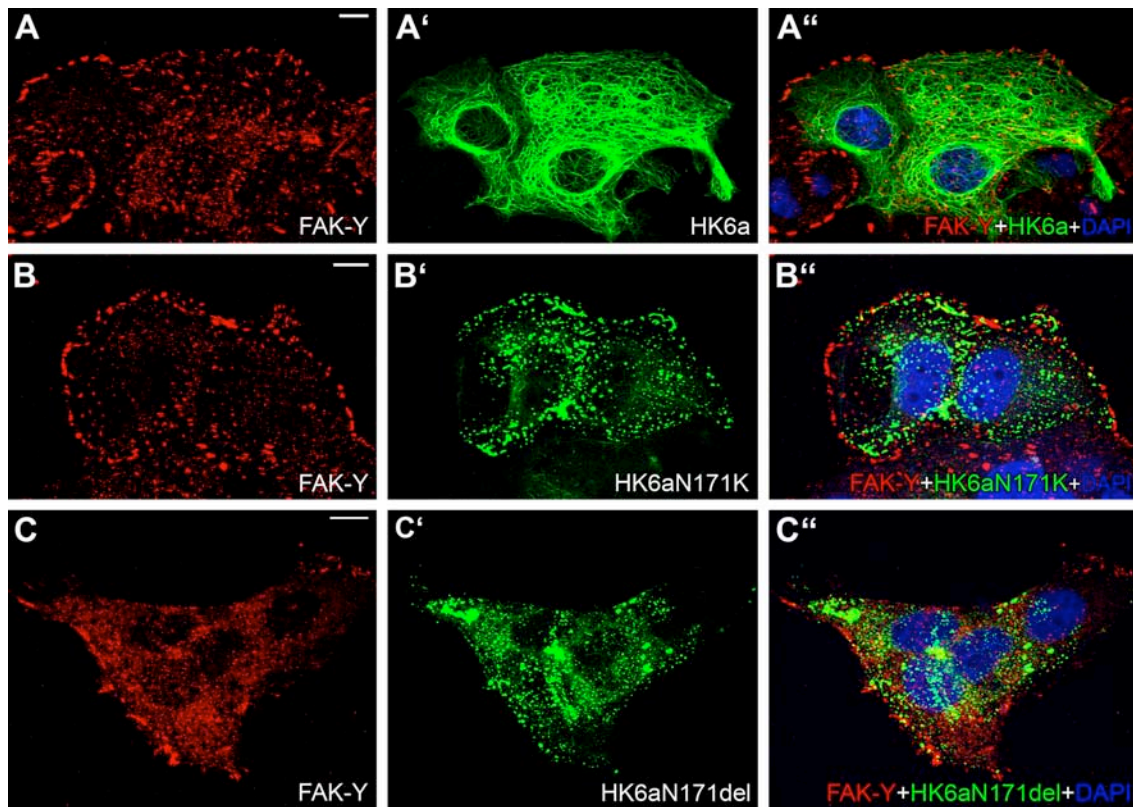


Abb. 47: Die aktivierte FAK ko-lokalisiert mit KFs und PC-mutierten Keratingranula. Laserscanning-Aufnahmen der aktivierten FAK (FAK-Y) nach Antikörperfärbung mit einem Antikörper gegen die phosphorylierte FAK am Y397 und einem Cy3-gekoppelten Sekundär-Antikörper der mit Methanol und Aceton fixierten PLC-Zellen. PK6a-5- (A) und PK6aN171K-1- (B) Zellen weisen eine periphere FAK-Färbung an FAs sowie KFs auf. PK6aN171del-2-Zellen zeigen weniger FAK-Y-markierte FAs sowie eine diffuse Verteilung von FAK-Y im Zytoplasma (C). KFPs der wildtypischen PK6a-5-Zellen (A'') sowie der mutierten PK6aN171K-1- und PK6aN171del-2-Zellen ko-lokalisieren mit den FAK-Y-markierten FAs (B'', C''); die Deletionsmutante in (C'') weist allerdings wenigere Überlagerungen auf. Größenbalken: 10 μm . Die immunocytoologischen Anfärbungen in Abb. 47 A und C wurde von Eva-Maria Oesau im Rahmen ihres von mir betreuten Fortgeschrittenen II Praktikums durchgeführt.

Die Überexpression der FAK beeinflusst die Keratinfilamentorganisation

Mit Hilfe von dominant-aktiven und dominant-negativen FAK-Konstrukten sollte der Einfluss der FAK auf die Keratinfilamentbildung untersucht werden. Eine dominant-aktive Form der FAK, superFAK, ist durch Punktmutation in der Kinasedomäne entstanden (GABARRA-NIECKO *et al.*, 2002).

Um den Einfluss der hyperphosphorylierten FAK auf die KF-Organisation und -Bildung zu untersuchen, wurden die Plasmide pGFP-superFAK und pHK18-RFP in EpH4-Zellen transfiziert.

Lebendzellaufnahmen der transfizierten EpH4-Zellen in zeigen eine Lokalisierung der superFAK an großen und langgezogenen, reifen Adhäsionskomplexen (Abb. 48 A'; Falschfarbendarstellung). Zusätzlich zu den perinukleären Filamenten existieren in den Lamellipodien der Zellen kleine Keratingranula (siehe Film 26). Abb. 48 B zeigt einen vergrößerten Ausschnitt der beiden Fluoreszenzaufnahmen aus Abb. 48 A''. Die Keratingranula ko-lokalisieren nur zum Teil mit den GFP-superFAK-markierten FAs. Keratingranula, die an den superFAK-markierten Adhäsionen entstehen (Abb. 48 B, weißer Pfeil) fusionieren mit anderen Granula (weißer Pfeil in Abb. 48 B') und bilden zu

einem geringen Teil KFPs (Abb. 48 B'', blauer Pfeil aus B'). Die Granula zeigen nur teilweise eine gerichtete Einwärtsbewegung, die meisten Granula bewegen sich schnell und ungerichtet (siehe Film 26).

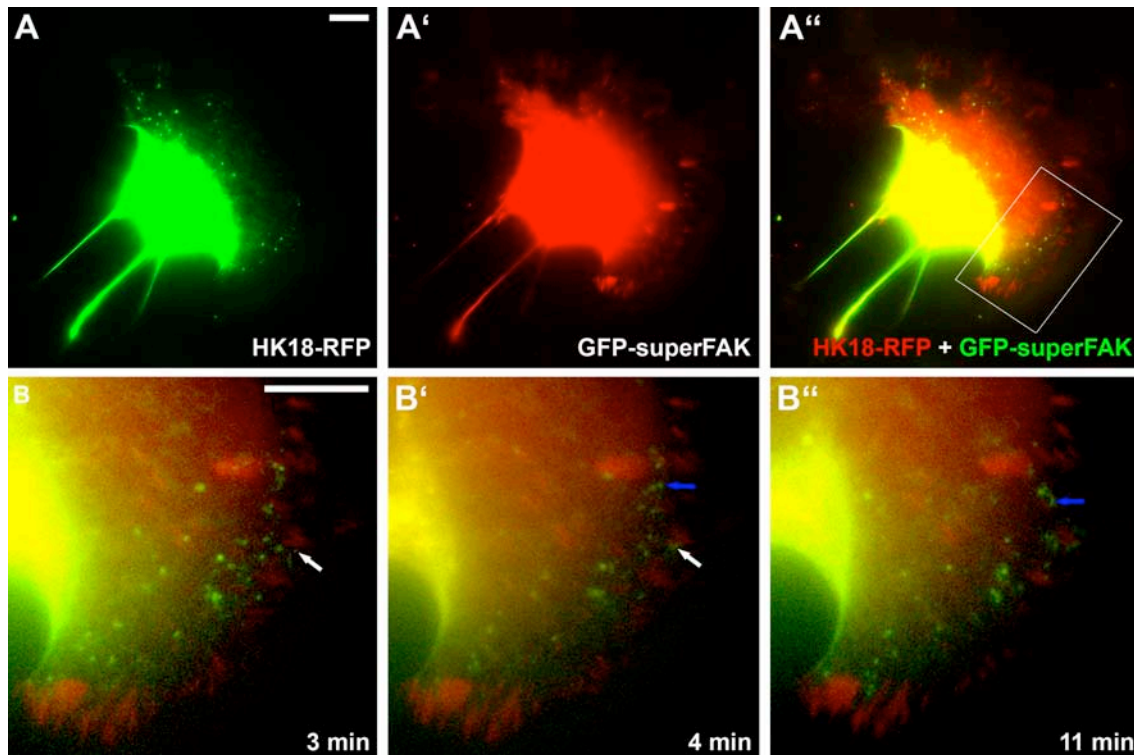


Abb. 48: Einfluss der dominant-aktiven FAK-Mutante superFAK auf die Keratinfilamentbildung. EpH4-Zellen wurden mit HK18-RFP-cDNA (A, Falschfarbendarstellung) und GFP-superFAK-cDNA transfiziert (A', Falschfarbendarstellung). Vergrößerte Ausschnitte der konfokalen Zeitraffer-Lebendzellaufnahme (Film 26) der übereinandergelegten Kanäle A und A' sind in (B) gezeigt. GFP-superFAK lokalisiert an FAs (A'). Im Lamellipodium der transfizierten EpH4-Zellen sind keine Filamente (wie in der restlichen Zelle), sondern Keratinpartikel zu sehen. Diese ko-lokalisieren teilweise mit den FAs (B, Pfeil) und fusionieren miteinander (B') zu KFPs (B''). Größtenteils bewegen sich die Keratinpartikel aber ungerichtet in der Zellperipherie und lösen sich schnell wieder auf (siehe Film 26). Größenbalken: 10 μ m.

Die Inhibierung der FAK beeinflusst die Keratinfilamentorganisation

Die FAK-related-non-kinase (FRNK) ist eine Isoform der FAK und wird durch alternatives Spleißen hergestellt (SCHALLER *et al.*, 1993). Da FRNK zwar identisch zum C-Terminus der FAK ist, aber keine Kinaseaktivität besitzt, eignet sich dieses Konstrukt hervorragend zur dominant-negativen Regulation der FAK.

Konfokale Lebendzellaufnahmen von EpH4-Zelle, welche mit den beiden Konstrukten HK18-RFP und GFP-FRNK transfiziert wurden, zeigen ebenfalls eine veränderte Keratinnetzwerkorganisation (siehe Film 27). Abb. 49 zeigt Aufnahmen verschiedener Zeitabstände des Films 27. Deutlich ist die Ko-Existenz von KFs und Keratingranula in der mit GFP-FRNK-cDNA transfizierten Zelle zu erkennen. In Abb. 49 B ist das linke Lamellipodium der doppeltransfizierten Zelle vergrößert dargestellt. Keratingranula entstehen nur selten an den FRNK-markierten FAs (gelber Pfeil in Abb. 49 B'), ebenso

KFPs (blaue Pfeile). Die Keratingranula verschmelzen z. T. miteinander (weiße Pfeile in Abb. 49 B' und B''); der größte Teil der Granula löst sich allerdings innerhalb weniger Minuten wieder auf. Auch hier ist ebenso wie bei der FAK-Hochregulierung keine Einwärtsbewegung der Keratingranula feststellbar. Zudem bewegen sich die Granula ungerichtet in der gesamten Zelle (siehe Film 27).

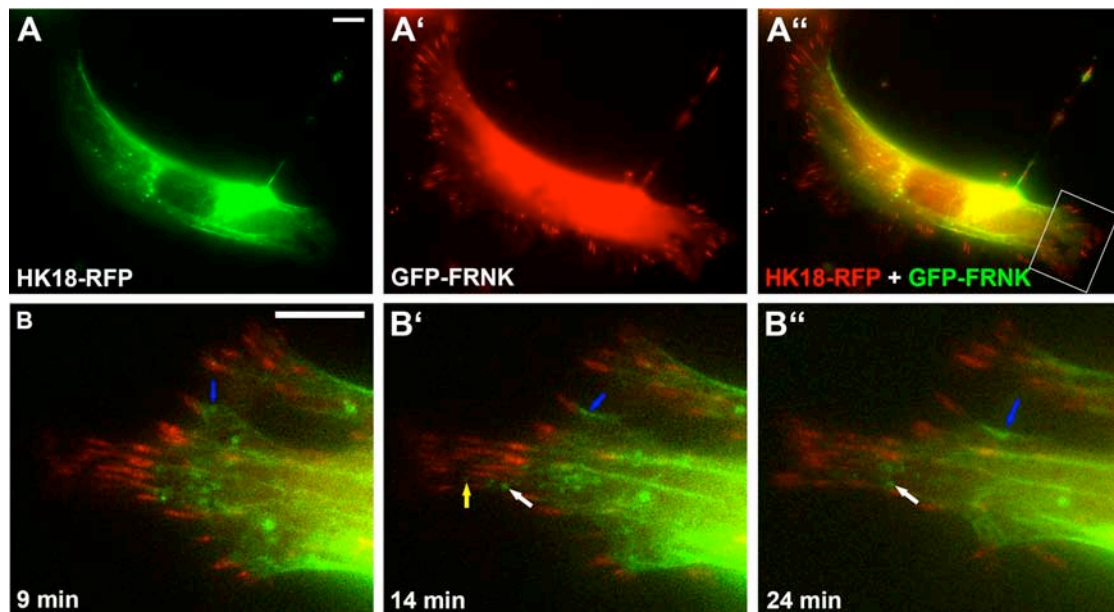


Abb. 49: Einfluss der dominant-negativen FAK-Mutante FRNK auf die Keratinfilamentbildung. EpH4-Zellen wurden mit HK18-RFP-cDNA (A, Falschfarbendarstellung) und GFP-FRNK-cDNA transfiziert. (A', Falschfarbendarstellung). Vergrößerte Ausschnitte der konfokalen Lebendzellaufnahme (Film 27) der übereinandergelegten Kanäle (A und A') sind in (B) gezeigt. FRNK lokalisiert an FAs (A'). Die transfizierte EpH4-Zelle weist KFs und vor allen kleine Keratinpartikel in den Lamellipodien auf. Diese ko-lokalisieren teilweise mit den Adhäsionen (B, B', Pfeile) und fusionieren miteinander (weißer Pfeil). Selten konnte die Bildung von KFPs and FRNK-markierten FAs beobachtet werden (blaue Pfeile). Der größte Teil der Granula bewegt sich ungerichtet in der gesamten Zelle und löst sich schnell wieder auf (siehe Film 27). Größenbalken: 10 μm .

4.2.3 p38-Aktivität und Proteasomen-Aktivität beeinflussen die Neubildung und den Abbau von Keratin-Aggregaten

Die p38-MAPK ist Teil von Signalwegen, die Zelldifferenzierung, Zellwachstum, Embryogenese und Apoptose regulieren (Ku *et al.*, 2002). Da nachgewiesen wurde, dass die Entstehung und die Dynamik von KFs über Phosphorylierungen reguliert werden, sollte zunächst mit Hilfe eines phosphospezifischen p38-MAPK-Antikörpers überprüft werden, ob KFs sowie Keratingranula mit der p38-MAP-Kinase ko-lokalisieren. Weiterhin sollte durch Inhibierung von p38 ihr Einfluss auf die Entstehung und Dynamik der KFPs untersucht werden. Zudem sollte in Zeitrafferaufnahmen nach Inhibierung von p38 überprüft werden, ob die Adhäsionskomplexe hiervon beeinflusst werden.

Es ist bekannt, dass Proteasomen in den Abbau von KFs involviert sind. Durch Verwendung eines Proteasomen-spezifischen Inhibitors in Keratin-exprimierenden Zellen sollte der Einfluss der Proteasomen auf Entstehung und Turnover der KFPs untersucht werden.

Die phosphorylierte p38-MAPK ko-lokalisiert mit Keratingranula

In den verschiedenen K6a-Zelllinien wurden durch die Behandlung mit einem phosph-spezifischen p38-MAPK-Antikörper untersucht, ob auch hier eine Aktivierung von p38 stattfindet.

In PK6a-Zellen, die filamentöses K6a herstellen, kann nur eine schwache diffuse Verteilung von p38-Y im gesamten Zytoplasma nachgewiesen werden (Abb. 50 A); eine Ko-Lokalisierung mit den intakten Keratinnetzwerken ist nicht sichtbar (Abb. 50 A'). Hingegen zeigen die PK6aN171K-1- und PK6aN171del-2-Zellen eine starke Ko-Lokalisierung der Keratingranula mit der aktivierten p38-Kinase vor allem in der Zellperipherie (Abb. 50, B und C; orange Überlagerungen in Abb. 50 B'' und C'').

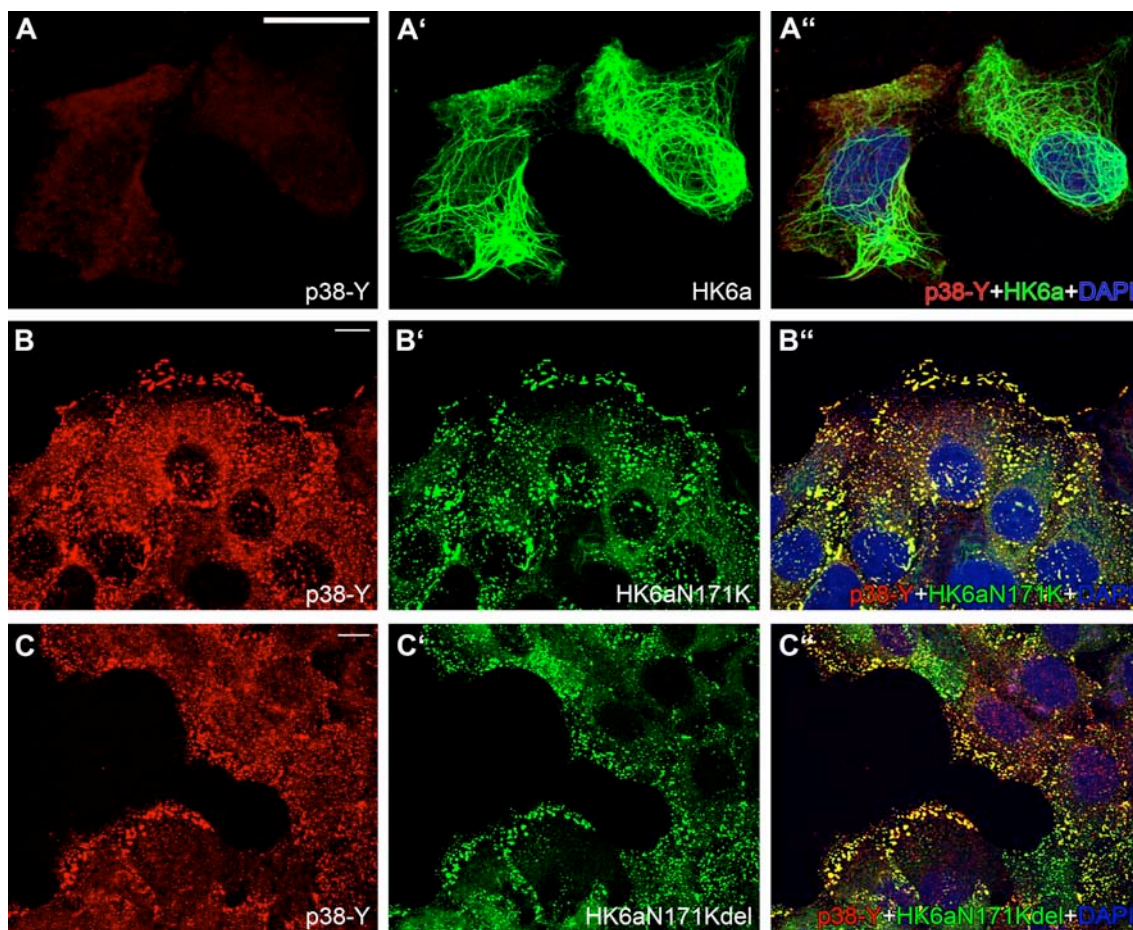


Abb. 50 Die phosphorylierte p38-MAPK ko-lokalisiert mit den mutierten Keratingranula in den PK6aN171K-1- und PK6aN171del-2-Zelllinien. Immunfluoreszenzaufnahmen (LSM) der Methanol und Aceton fixierten PK6a-5 (A), PK6aN171K-1- (B) PK6aN171del-2- (C) Zelllinien, welche mit einem Phosphoepitop-spezifischen p38-AK (p38-Y) und einem Cy3-gekoppelten Sekundär-Antikörper behandelt wurden. Die phosphorylierte p38-MAPK ko-lokalisiert nur mit den mutierten Keratingranula der PK6aN171K-1- und PK6aN171del-2-Zellen (B, C), nicht mit den KFs der PK6a-5-Zellen (A). Größenbalken: 10 μ m.

Die Neubildung von Keratingranula wird durch Hemmung der p38-MAPK gestoppt

Die aktivierte p38-MAPK ko-lokalisiert mit den Keratinaggregaten der PK6aN171K-1- und PK6aN171del-2-Zelllinien (siehe Abb. 50). Durch Hemmung der p38-MAPK sollte ihr Einfluss auf die Bildung und Dynamik der Keratingranula untersucht werden. Der Inhibitor SB 202190 hemmt

spezifisch alle Isoformen von p38 und wurde für die Hemmung von p38 in den PC-Zellklonen verwendet (RAINGAUD *et al.*, 1996).

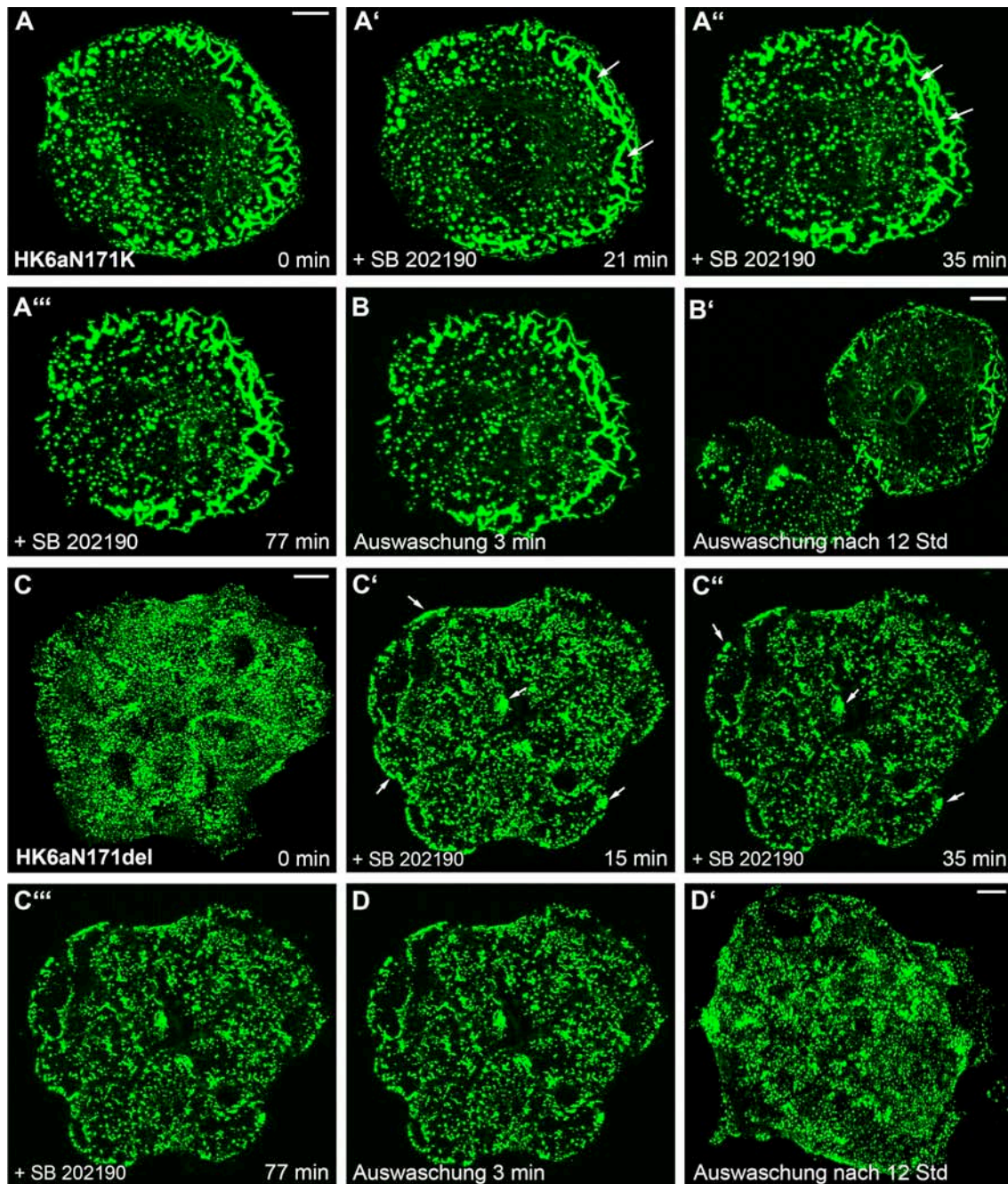


Abb. 51: Die Inhibierung der p38-MAPK beeinflusst die Entstehung und den Transport von PC-mutierten Keratingranula. Konfokale Lebendzellaufnahmen von PK6aN171K-1- (A, B aus Film 28) und PK6aN171del-2-Zellen (C, D aus Film 29), welche mit dem p38-Inhibitor SB 202190 behandelt wurden. Beide Zellklone zeigen einen Bewegungsstopp der Keratingranula sowie eine inhibierte Neubildung (A'', C''). Keratinstücke sowie Keratingranula akkumulieren in der Peripherie (Pfeile in A', A'' und C', C''). Auch nach Auswaschen des Inhibitors wird in beiden Zellklonen keine Neubildung oder Bewegung von Keratingranula beobachtet (B, D). Erst nach 12 Stunden entstehen wieder Keratinvorläufer in der Zellperipherie und bewegten sich zentripetal (B', D'). Größenbalken: 10 μ m.

Konfokale Zeitraffer-Aufnahmen dieser Zelllinien zeigten einem Stopp der Granulabildung in der Peripherie (Film 28 und 29). Zunächst wurden Zeitrafferserien der unbehandelten Zellen erstellt (50 Bilder). Nach Zugabe des Inhibitors (100 μ M SB 202190) wurde ohne Unterbrechung weitergefilmt. Lebendzellaufnahmen der inhibierten Zellen zeigen, dass zum einen keine Bewegung der Aggregate mehr stattfindet, und zum anderen werden keine neuen Keratinaggregate in der Zellperipherie mehr gebildet. Die Zellen „frieren ein“.

Abb. 51 zeigt verschiedene Bilder der Lebendzellaufnahmen zu unterschiedlichen Zeitpunkten: Die Abbildungen, welche die Zellen 35 und 77 min nach der Zugabe des Inhibitors zeigen, stimmen komplett überein; es haben keinerlei Veränderungen in der Keratinorganisation mehr stattgefunden (Abb. 51 A'' und A''' sowie Abb. 51 C'' und C'''). Die Pfeile verdeutlichen die größeren Ansammlungen bestehend aus den akkumulierten Keratinfilamentstücken in der Peripherie. In den PK6aN171K-1-Zellen sind diese Anhäufungen filamentös (Abb. 51 A'''), in dem PK6aN171del-2-Klon bestehen sie nur aus größeren rundlichen Granula (Abb. 51 C''').

Direkt nach dem Auswaschen des Inhibitors durch einen Mediumwechsel konnte in beiden Zelllinien weder eine Neubildung von Keratingranula in der Peripherie noch eine Wiederaufnahme der Bewegung der Aggregate beobachtet werden (Abb. 51 B und C). Die Inhibierung hielt 2-3 Stunden an, jedoch konnte nach 12 Stunden in weiteren Lebendzellaufnahmen eine normale Keratindynamik festgestellt werden (Abb. 51 B' und D'). Manche PK6aN171K-1-Zellen zeigten allerdings zusätzliche perinukleäre Aggregate (Abb. 51 B').

Pharmakologische Hemmung der p38-MAPK beeinflusst die Dynamik der Adhäsionskontakte und der KFs

Der Einfluss der p38-MAPK auf FAs sollte durch die Behandlung von Zyxin- und Keratin- markierten Zellen mit dem spezifischen p38 Inhibitor SB 202190 untersucht werden.

Zunächst wurden EpH4-Zellen, welche das rot-fluoreszierende FA-Protein RFP-Zyxin synthetisieren, mit dem Inhibitor behandelt. Die länglichen, reifen FAs verkleinern sich nach wenigen Minuten zu kleineren FKs (siehe Film 30).

Abb. 52 A zeigt verschiedene Zeitpunkte dieser Lebendzellserie. In den Lamellipodien der Zelle sind ausgereifte, langgezogene FAs zu sehen (Abb. 52 A). Nach Zugabe von 100 μ M des p38-Inhibitors verkleinern sich die Adhäsionen (Abb. 52 A', nach 10 min), bis nur noch rundliche FKs zu detektieren sind (Abb. 52 A'', nach 30 min).

Anschließend wurden PK18-5-Zellen, welche mit RFP-Zyxin cDNA transfiziert wurden, mit dem SB 202190-Inhibitor behandelt. Lebendzellaufnahmen zeigen einen Stopp der KFP-Bildung in der Zellperipherie, auch die Einwärtsbewegung der Filamente setzt aus (siehe Film 31).

Abb. 52 B zeigt Einzelbilder der Zeitrafferserie. Die Behandlung der PK18-5-Zellen führt zu einer Inhibierung der KFP-Bildung (Abb. 52 B' nach 20 min). Die KFs ziehen sich aus der Zellperipherie

komplett zurück (Pfeile in Abb. 52 B'' nach 50 min). Die Zyxin-FAs verkleinern sich (siehe linker Zellrand) oder lösen sich komplett auf (siehe Zellmitte und rechter Zellrand in Abb. 52 B'').

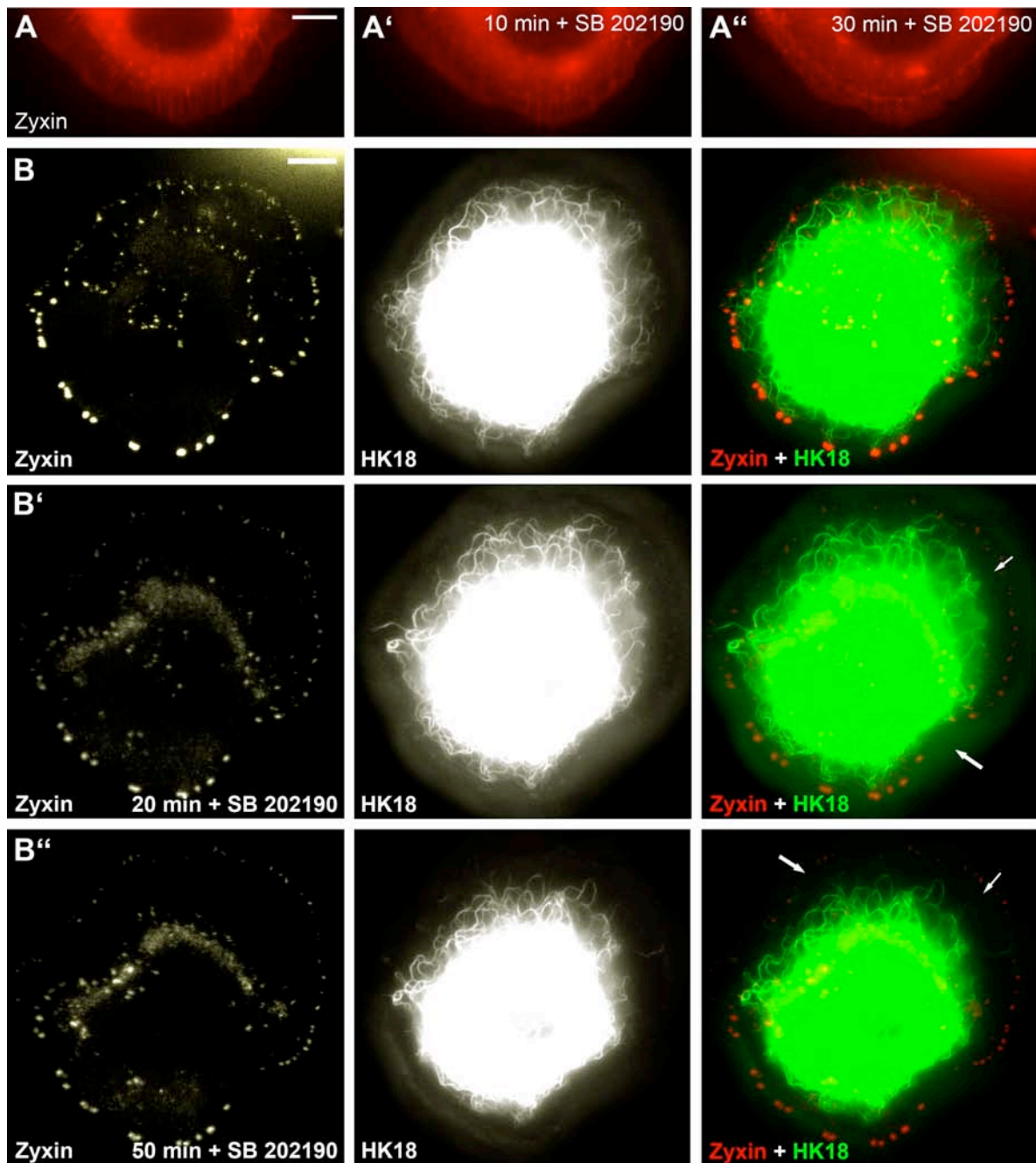


Abb. 52: Pharmakologische Hemmung von p38 durch SB 202190 in EpH4- und PK18-5-Zellen verhindert die Neubildung sowie den Transport von KFPs und löst eine Verkleinerung von FAs aus. (A) Lebendzell-Fluoreszenzaufnahmen (Film 30) von Zyxin-RFP-markierten FAs in EpH4-Zellen zeigen die Verkleinerung der Adhäsionen nach Behandlung mit dem p38-Inhibitor zu FKs (A', A''). (B) Lebendzellaufnahmen (Film 31) von PK18-5-Zellen transfiziert mit Zyxin-RFP-cDNA. Nach der Inhibierung von p38 durch Zugabe von SB 202190 wird die Einwärtsbewegung der KFPs gestoppt. Weiterhin sind die KFs perinukleär zusammengezogen, die Zellperipherie erscheint leer (Pfeile, nach 20 min). An den verkleinerten FKs findet keine Neubildung von KFPs mehr statt (Pfeile, nach 50 min). Größenbalken: 10 μ m.

Die pharmakologische Hemmung von Proteasomen führt zur Anhäufung der Keratingranula

Der spezifisch regulierte Abbau von ubiquitinylierten Proteinen findet intrazellulär in den Proteasomen statt und besitzt eine zentrale Bedeutung für die Degradierung von Keratinfilamenten (KU und O'MARY, 2000). Die Bedeutung des Keratinabbaus in den mutierten PC-Zellklonen sollte durch Inhibierung der Proteasomen durch den spezifischen Inhibitor MG-132 untersucht werden.

In konfokalen Lebendzellserien der behandelten PK6aN171K-1- und PK6aN171del-2-Zellen wird eine Anhäufung der Keratingranula in der Zellperipherie beobachtet (siehe Filme 32 und 33).

Abb. 53 zeigt Bilder dieser Zeitrafferserien zu verschiedenen Zeitpunkten. Die angehäuften Keratingranula in der Peripherie sind durch Pfeile gekennzeichnet (Abb. 53 A', A'' und B', B''). Die Granula akkumulieren in der Zone, in der sie sich in nicht-behandelten Zellen wieder auflösen (siehe Abb. 27 und Filme 15 und 16). In den PK6aN171K-1-Zellen lagern sich die Granula zu größeren Filamentstücken zusammen (Abb. 53 A''). In den PK6aN171del-2-Zellen bilden sich größere kreisförmige Anhäufungen (Abb. 53 B''). Die Neubildung von Keratingranula wird durch die Hemmung der Proteasomen nicht beeinträchtigt, da in der Peripherie beider Zelllinien neue KFPs entstehen.

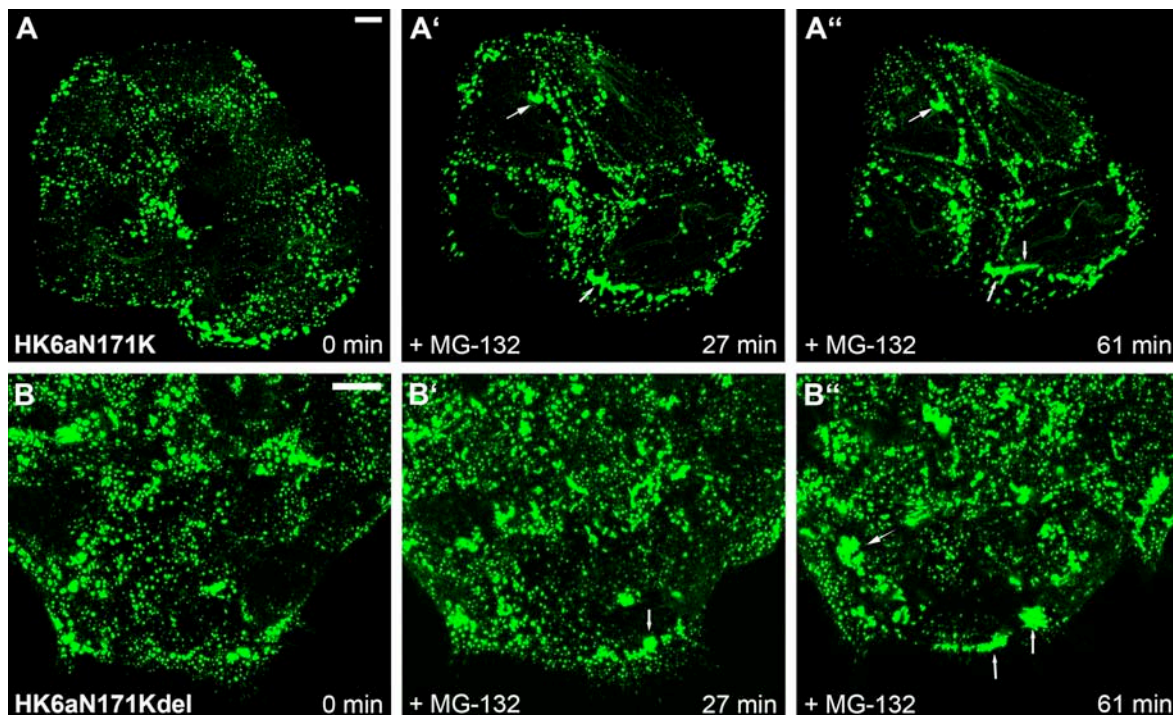


Abb. 53: Die Hemmung von Proteasomen führt zur Anhäufung von Keratingranula. Konfokale Lebendzellaufnahmen von PK6aN171K-1- (A, Film 32) und PK6aN171del-2-Zellen (B, Film 33), welche mit dem Proteasom-Inhibitor MG-132 behandelt wurden. Beide Zellklone zeigen eine Anhäufung der Keratingranula in der Zellperipherie (Pfeile in A', A'' und B', B''), da sich diese nicht mehr auflösen. Die Neubildung von KFPs im Zellkortex findet in beiden Zellklonen weiterhin statt (siehe o. g. Filme). Größenbalken: 10 μ m.

4.3 Typ III Intermediärfilament-Netzwerke werden Ähnlichkeiten und Unterschiede zur Dynamik von Keratinfilament-Netzwerken auf

Mit Hilfe von Fluoreszenzaufnahmen sollte die Entstehung und Dynamik von Typ III IFs untersucht und mit der Entstehung und Dynamik von Typ I/II KFs verglichen werden. Hierzu wurden cDNAs von GFP-Vimentin, Desmin-mCherry und Peripherin-YFP in PLC-, EpH4- und SW-13-Zellen transfiziert, um zu untersuchen, ob auch diese IFs in der Zellperipherie gebildet werden und einem kontinuierlichen Netzwerkzyklus unterliegen.

Fluoreszierendes Vimentin bildet keine Netzwerke in transfizierten Zellen

Abb. 54 zeigt Lebendzellaufnahmen der Transfektion von GFP-Vimentin in EpH4- (A), SW-13- (B) und PLC- Zellen (C). In allen drei Zelllinien konnte keine Bildung von vollständigen Netzwerken beobachtet werden, da nur perinukleäre Filamente und Keratinaggregate detektiert wurden. In EpH4-Zellen (Abb. 54 A) werden kleine rundliche Vimentinaggregate vor allem in der Peripherie und im Lamellipodium gebildet; in der Zellmitte sind auch größere Vimentin-Ansammlungen zu sehen. Sowohl in SW-13- als auch in PLC-Zellen werden um den Zellkern herum Filamente ausgebildet. Des Weiteren konnten verschieden große Vimentinaggregate beobachtet werden (Abb. 54 B und C). Es ist daher davon auszugehen, dass das GFP-Vimentin-Konstrukt die Lokalisierung von Vimentin beeinträchtigt.

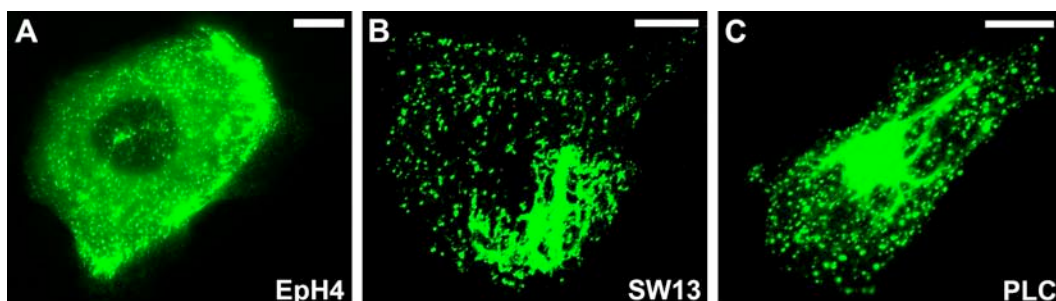


Abb. 54: GFP-Vimentin bildet keine vollständigen Filamente. (A) Konfokale Lebendzellaufnahme einer mit GFP-Vimentin-cDNA transfizierten EpH4-Zelle zeigt die Bildung von Vimentinaggregaten (B und C). Auch die Transfektion in SW-13- und PLC- Zellen ergibt keine vollständigen Netzwerke, es kann allerdings ein geringer filamentöser Anteil zusätzlich zu den Vimentinaggregaten verschiedener Größen beobachtet werden. Größenbalken: 10 μm .

Fluoreszierendes Desmin bildet keine Netzwerke in transfizierten Zelllinien

Die Transfektion von Desmin-mCherry in PLC- und SW-13-Zellen ist in Abb. 55 gezeigt. Da die konfokalen Lebendzellaufnahmen von transient transfizierten PLC-Zellen und SW-13-Zellen (Abb. 55 A bzw. Abb. 55 D) nur perinukleäre Desminfilamente und Desminaggregate in der Zellperipherie (Abb. 55 A) aufweisen, wurde stabile Zellklone hergestellt.

Die Zellklone PD-1 und SD-1 wurden wie in 3.2.3.2.2 beschrieben durch Transfektion mit Lipofectamine des Plasmids pDesmin-mCherry hergestellt.

PD-1-Zellen zeigen ein filamentöses Desmin-Netzwerk (Abb. 55 B und B'). Im Vergleich mit Keratinnetzwerken erscheint das Desmin-Netzwerk jedoch weitmaschiger. In konfokalen Lebendzellaufnahmen von SW-13-Zellen wurden keine vollständigen Filamente beobachtet (Abb. 55 D). Konfokale Lebendzellaufnahmen von SW-13-Zellen, welche mit GFP-Vimentin-cDNA und Desmin-mCherry-cDNA transfiziert wurden, zeigen Vimentin- und Desminaggregate, welche sich größtenteils überlagern (Abb. 55 E'').

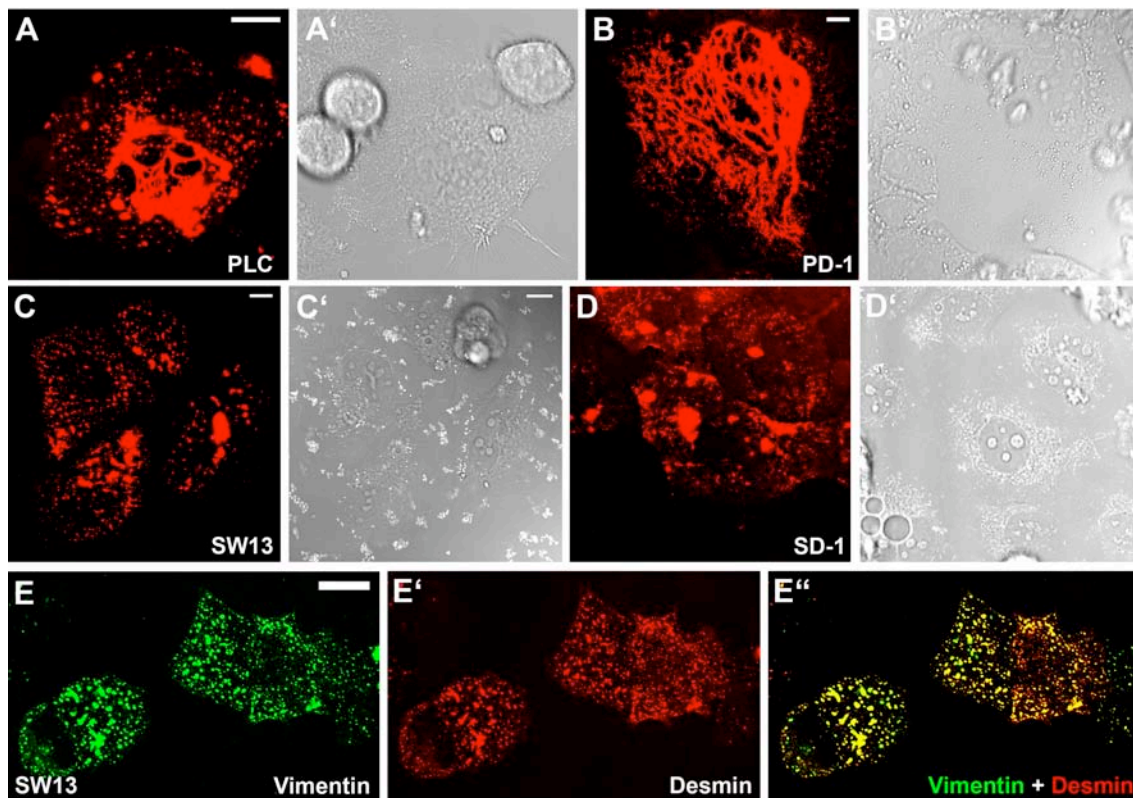


Abb. 55: Verteilung von Desmin-mCherry in PLC- und SW13-Zellen. (A) Konfokale Lebendzellaufnahmen von PLC-Zellen, die mit Desmin-mCherry-cDNA transfiziert wurden, zeigen perinukleäre Desmin-Netze und Desminaggregate in der Zellperipherie. Der stabile Zellklon PD-1 bildet vollständige Netzwerke. In SW-13-Zellen können weder nach transienten Transfektionen von Desmin-mCherry-cDNA noch im Klon SD-1 Desmin-Netzwerke beobachtet werden; es sind nur Aggregate zu sehen (C, D, konfokale Lebendzellaufnahmen). Die Doppeltransfektion der Plasmide pGFP-Vimentin (E) und pDesmin-mCherry (E') in SW-13-Zellen zeigt ebenfalls keine Netzwerke. d.h., Vimentin und Desmin bilden keine Heteropolymere in SW-13-Zellen (E'', konfokale Lebendzellaufnahmen). Größenbalken: 10 μm .

Vimentin und Desmin bewegen sich ungerichtet in Epithelzellen

Die dynamischen Eigenschaften der Typ III IFs Vimentin und Desmin wurden anhand von Lebendzellaufnahmen transfizierter Zellen genauer untersucht. EpH4-Zellen, die mit GFP-Vimentin-cDNA transfiziert wurden, formen keine Netzwerke, jedoch zahlreiche Vimentin granula (Abb. 56 A, Ausschnitt der Zellperipherie).

Verschiedene Zeitabstände (Abb. 56 A, A' und A'') des Films 34 demonstrieren die Bildung von Granula am Rande des Lamellipodiums (Pfeile in Abb. 56 A, A' und A''). Die Vimentin granula bewegen sich schnell und meist ungerichtet; es kann zusätzlich zur Bewegung in Richtung des

Zellzentrums auch eine umgekehrte Bewegung in Richtung der Peripherie beobachtet werden. Sie besitzen nur eine kurze Lebensdauer und lösen sich am Rand der Peripherie wieder auf. Abb. 56 B zeigt die Expression von Desmin-mCherry im unteren Ausschnitt einer PLC-Zelle aus einer Lebendzellserie (Film 35) in verschiedenen Zeitabständen (Abb. 56 B, B', B''). Diffuse Desmin-Fluoreszenz erscheint in der Zellperipherie (Pfeile in Abb. 56 B, B', B''), die sich in Richtung Zellmitte bewegt. Erst am Rand des Zellzentrums sind einzelne Desminvorläufer zu erkennen (Pfeilspitze in Abb. 56 B').

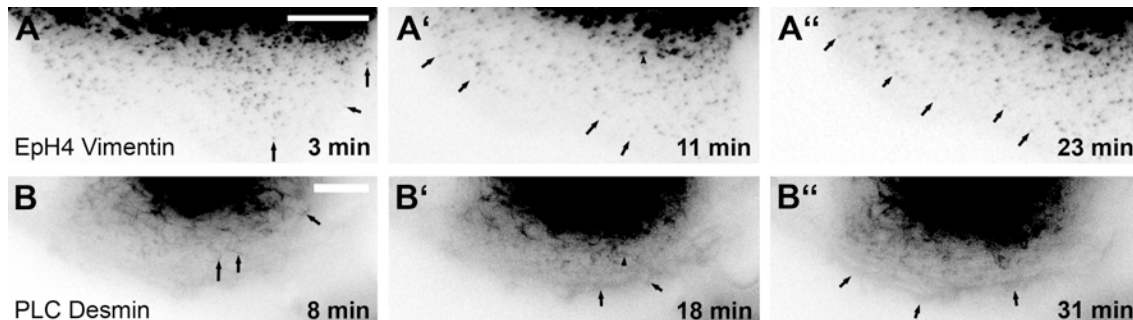


Abb. 56: Dynamik von Vimentin und Desmin in Epithelzellen. (A) Lebendzellaufnahmen von EpH4-Zellen, die mit GFP-Vimentin-cDNA transfiziert wurden (Film 34). Zahlreiche Vimentin granula bilden sich am Rand der Zellperipherie (Pfeile) und bewegen sich ungerichtet. (B) Lebendzellaufnahmen (Film 35) von PLC-Zellen, welche mit Desmin-mCherry-cDNA transfiziert wurden, zeigen die Bildung von kurzen Desminfilamenten in der Zellperipherie (Pfeile). Größenbalken: 10 μm .

4.4 Das dynamische Ko-Translationsmodell kann nicht bestätigt werden

Da für das neuronale Protein Peripherin ein ko-translationeller Mechanismus der IF-Bildung vorgeschlagen wurde (CHANG *et al.*, 2006), sollte untersucht werden, ob Peripherinfilamente in dieser Art- und Weise synthetisiert werden oder ob auch hier ein Turnover-Mechanismus vorliegt. Hierzu sollte exakt das gleiche fluoreszierende Peripherin-Konstrukt hergestellt und in Lebendzellaufnahmen unter gleichen Bedingungen in den gleichen Zelllinien untersucht werden. Zudem sollten Zeitrafferserien in Gegenwart von Translationsinhibitoren in neuronalen Zellen angefertigt werden.

Fluoreszierendes Peripherin bildet keine Netzwerke in den transfizierten Zelllinien

Die cDNA des neuronalen Typ III IF Protein Peripherin aus *Rattus norvegicus* wurde zunächst von der RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung) erworben und an das YFP angehängt. Die Peripherin-cDNA wurde über einen BsrGI-Verdau aus dem Vektor ausgeschnitten und in pEYFP-N1 eingefügt. Anschließend wurde mittels PCR mit den Primern 07-70 und 07-97 die Sequenz amplifiziert (siehe Tabelle 14). Der Primer 07-97 fügte eine zusätzliche BamHI-Schnittstelle ein und entfernte das Stopp-Codon der Peripherin-cDNA. Das Peripherin-PCR-Produkt wurde anschließend mit den Enzymen EcoRI und BamHI geschnitten und in den mit den gleichen Enzymen aufgeschnittenen pEYFP-N1 Vektor eingefügt.

Das resultierende Konstrukt Peripherin-YFP wurde in verschiedene Zelllinien transfiziert, um die intrazelluläre Lokalisierung zu untersuchen (Abb. 57). Alle konfokalen Lebendzellaufnahmen der transfizierten Zellen zeigen die gleiche Verteilung von Peripherin: sowohl in EpH4- (Abb. 57 A) als auch in SW-13- (Abb. 57 B) und PLC-Zellen (Abb. 57 C) können keine vollständigen Netzwerke beobachtet werden: In EpH4-Zellen sind nur kurze Filamentstücke zu sehen und einige wenige, dickere Filamente (Abb. 57 A). In SW-13- und PLC-Zellen werden vermehrt Filamente, und vor allem in der Peripherie kurze Filamentstücke sowie Partikel (Abb. 57 B und C), detektiert.

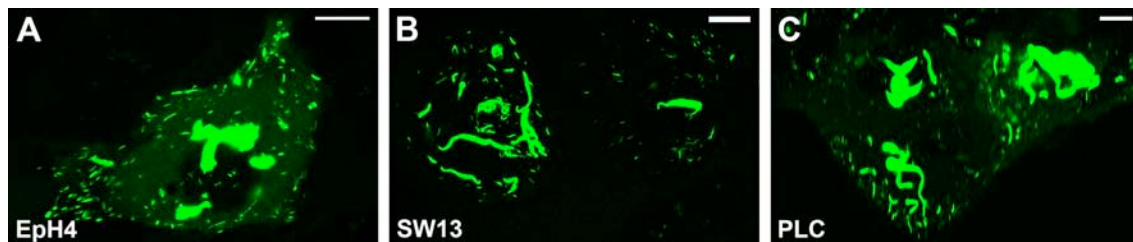


Abb. 57: Verteilung von Peripherin in verschiedenen Zelllinien. (A) Konfokale Lebendzellaufnahmen von EpH4-Zellen, welche mit Peripherin-YFP-cDNA transfiziert wurden, weisen hauptsächlich kurze Filamentstücke auf. (B, C) Konfokale Lebendzellaufnahmen von SW-13- und PLC-Zellen, die mit Peripherin-YFP-cDNA transfiziert wurden, zeigen Filamentbündel, kürzere Stücke sowie Partikel. Größenbalken: 10 μm .

Nach Differenzierung von PC12-Zellen verändert sich die Peripherin-Organisation und Dynamik

PC12-Zellen stammen aus einem Nebennierentumor der Ratte und zeigen nach einer Behandlung mit einem Nervenwachstumsfaktor (NGF) eine Differenzierung ähnlich der von Nervenzellen (TISCHLER und Greene, 1975). Undifferenzierte PC12-Zellen sind relativ klein und rundlich, sie wachsen in dichten Kolonien (Abb. 58 A' und B').

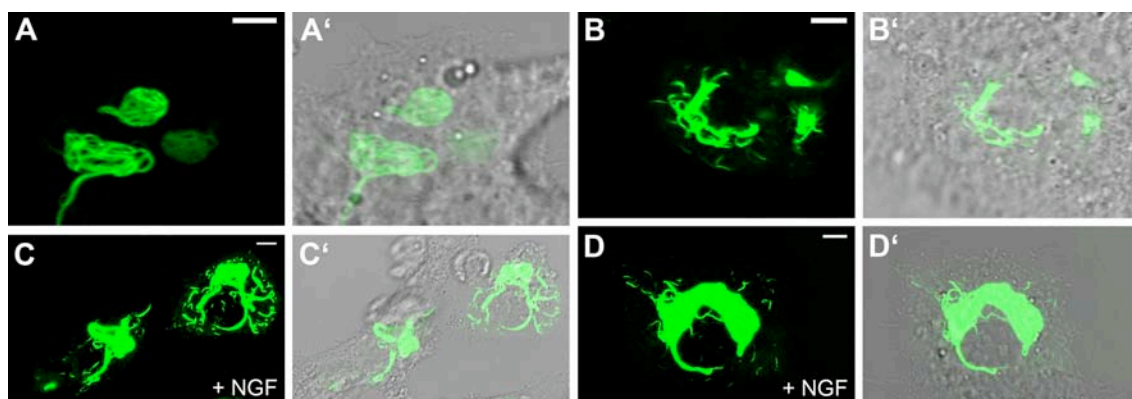


Abb. 58: PC12-Zellen synthetisieren fluoreszierende Peripherin-Netzwerke. (A, B) Konfokale Lebendzellaufnahmen von undifferenzierten und mit Peripherin-YFP-cDNA transfizierten Zellen zeigen kleine und abgerundete Zellen mit engen Netzwerken. (C, D) Mit Hilfe von 30 ng/ml NGF differenzieren sich PC12-Zellen zu deutlich größeren Zellen mit axonartigen Ausläufern. Peripherin-YFP-synthetisierende Zellen weisen hauptsächlich perinukleäre Netzwerke sowie kleinere Filamentstücke auf. Größenbalken: 5 μm .

Da das dynamische Ko-Translationsmodell in PC12-Zellen etabliert wurde, wurden die Versuche ebenfalls in PC12-Zellen wiederholt. Konfokale Lebendzellaufnahmen der transfizierten PC12-Zellen, welche mit Peripherin-YFP-cDNA transfiziert wurden, zeigen engmaschige Peripherin-Netzwerke

(Abb. 58 A) oder dickere Filamentbündel (Abb. 58 B). Nach Behandlung mit 30 ng/ml NGF wachsen PC12-Zellen rapide und bilden axonartige Ausläufer aus (HELFAND *et al.*, 2003a). Abb. 58 C und D zeigen konfokale Lebendzellaufnahmen von NGF-differenzierten PC12-Zellen, die nach der Differenzierung mit Peripherin-YFP-cDNA transfiziert wurden. Die deutlich größeren Zellen besitzen ein um den Zellkern konzentriertes Netzwerk und weisen kurze Filamentbruchstücke sowie Partikel in der Zellperipherie auf (Abb. 58 C, C' und D, D').

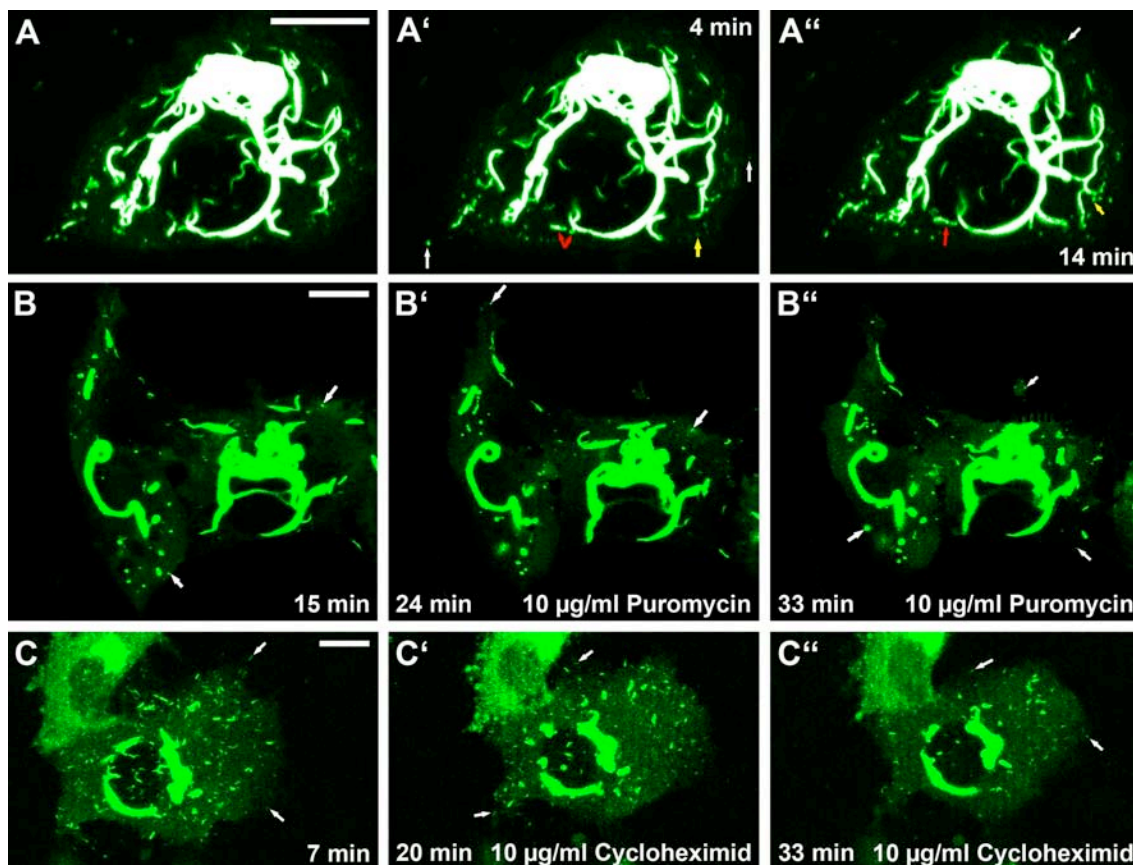


Abb. 59: Dynamik von Peripherin-Netzwerken in Lebendzellaufnahmen von transfizierten PC12-Zellen. (A) Am Rand der Zellperipherie werden rundliche Peripherin-Partikel gebildet (weiße Pfeile), die ungerichtete Bewegungen aufweisen (Film 36). Einige wandern in Richtung Zellzentrum (gelbe Pfeile), wo vor allem dickere Filamentbündel auftreten. Kurze Filamentstücke verschmelzen miteinander zu einem längeren Filamentstück (rote Pfeile in A' und A''). Die Behandlung mit Inhibitoren der Proteinbiosynthese, d.h. mit 10 µg/ml Puromycin (B) oder 10 µg/ml Cycloheximid (C), hat keinen Einfluss auf die Bildung der Peripherin-Partikel in der Zellperipherie (Pfeile in B' und B'' sowie C' und C'' markieren neuentstandene Partikel in verschiedenen Zeitabständen nach Inhibierung der Translation (siehe Film 37 und 38). Größenbalken: 10 µm.

Die Dynamik der Bildung des Peripherin-Netzwerkes in PC12-Zellen wurde mit Hilfe von Zeitrafferaufnahmen untersucht. Abb. 59 A bis A'' zeigt Einzelbilder verschiedener Zeitabstände des Film 36 einer mit Peripherin-YFP-cDNA transfizierten PC12-Zelle. Um den Zellkern herum treten dicht aneinander gelagerte Filamentbündel, in der Zellperipherie Filamentstücke verschiedenster Größen, welche von HELFAND *et al.*, (2003a) als „squiggles“ und im Folgenden als Partikel bezeichnet werden, sowie Granula auf (Abb. 59 A). Die Entstehung weniger rundlichen Peripherin-Partikel konnte am

Rand der Zellperipherie beobachtet werden (weiße Pfeile in Abb. 59 A' und A''). Die Granula bewegen sich meist ungerichtet in der Peripherie, einige wenige wandern zentripetal (gelbe Pfeile in Abb. 59 A' und A''). Des Weiteren konnte die Verschmelzung von kurzen Partikeln (rote Pfeile in Abb. 59 A') zu längeren Filamentstücken (roter Pfeil in Abb. 59 A'') beobachtet werden (Film 36).

Peripherinfilamente bilden sich auch in Gegenwart von Translationsinhibitoren

Mit Hilfe von Translations-hemmenden Substanzen sollte nun untersucht werden, ob die beobachtete Bildung und Dynamik der Peripherinfilamente abhängig von der Proteinbiosynthese ist. Peripherin-YFP synthetisierende Zellen wurden mit 10 µg/ml Puromycin bzw. 10 µg/ml Cycloheximid behandelt, um die Proteinbiosynthese zu stoppen (CHANG *et al.*, 2006). Es wurden jeweils 15 Minuten vor Drogenzugabe gefilmt, anschließend das Medium gegen das mit den jeweiligen Inhibitoren versetzte Medium ausgetauscht und ohne Unterbrechung weitergefilmt.

Abb. 59 B zeigt konfokale Zeitrafferaufnahmen von pPeripherin-YFP transfizierten Zellen, welche mit Puromycin behandelt wurden (Film 37). Vor und nach Behandlung mit Puromycin (Abb. 59 B vor Drogenzugabe, B' nach 24 min und B'' nach 33 min) kann weiterhin die Bildung der rundlichen Peripherinpartikel in der Zellperipherie beobachtet werden (weiße Pfeile).

Auch die Behandlung mit Cycloheximid verhindert nicht die Bildung der Peripherinpartikel in der Zellperipherie von Peripherin-YFP-cDNA transfizierten PC12-Zellen (Film 38 und Abb. 60 C, weiße Pfeile). Somit scheint die Bildung von Peripherinpartikel in der Zellperipherie von neuronalen PC12-Zellen nicht abhängig von der Proteinbiosynthese zu sein.

5. Diskussion

5.1 Fokale Adhäsionen sind die Nukleationsorte der Keratinfilamentvorläufer

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die Entstehung und Dynamik von KFPs in lebenden Zellen untersucht. Hierfür wurde zunächst der epitheliale Zellklon EK18-1 über retroviralen Gentransfer erzeugt. EK18-1-Zellen wiesen eine äußerst homogene Expression des fluoreszenzmarkierten K18 auf (Abb. 12 B). KFs entstanden ebenso wie in anderen Zellen aus KFPs (WINDOFFER und LEUBE, 1999; WINDOFFER und LEUBE, 2001; WÖLL *et al.*, 2005), welche in der Zellperipherie nahe der Plasmamembran generiert wurden (Abb. 13, Film 1). KFPs waren polymerisationskompetent und wiesen longitudinales Wachstum auf. Gleichzeitig bewegten sie sich in Richtung des Zellzentrums. Während dieses Transportvorgangs fusionierten sie außerdem durch End- zu End-Anlagerungen miteinander und integrierten beim Erreichen des peripheren Netzwerkes mit den peripheren Filamenten. Diese Vorgänge sind für die Neubildung und Umstrukturierung des Keratinnetzwerkes verantwortlich (STRNAD *et al.*, 2001; WINDOFFER *et al.*, 2004; WÖLL *et al.*, 2005).

Da Zellen ihre Form ständig an die jeweilige Umgebung anpassen wurde untersucht, wie sich in solchen Situationen das Keratinnetzwerk verändert. Dazu wurden Fluoreszenzaufnahmen von migrierenden EK18-1-Zellen und Wundheilungsversuche von EK18-1-Zellen durchgeführt, welche zeigten, dass in der sich nach vorne schiebenden Zellfront kontinuierlich KFPs gebildet wurden, die das Keratinnetzwerk in diese Richtung ausdehnten (Abb. 14 und 15 sowie Film 2 und 3). Messungen der Geschwindigkeit der KFPs mit Hilfe von Verschiebungsvektoren, die alle fluoreszierenden Partikel erfassen, haben zudem gezeigt, dass sich die KFPs in migrierenden Zellen etwa doppelt so schnell bewegen wie in stationären (R. Windoffer, T. Aach und T. Würfinger; unpubliziert).

Demnach stellt der ständige Umsatz des Netzwerkes die ideale Voraussetzung für Formveränderungen und Bewegungen von Zellen dar und gewährleistet eine schnelle Adaptation an veränderte Umgebungen oder Einflüsse wie z. B. Zellstress. Die Hypothese, welche besagt, dass das Keratinnetzwerk sich hauptsächlich über lateralen Austausch von löslichen Untereinheiten umorganisiert, konnte damit nicht bestätigt werden (MILLER *et al.*, 1991). Beobachtungen lassen allerdings die Möglichkeit offen, dass die stabilen, zentralen KFs durch lateralen Austausch umgesetzt werden.

Ob die KFPs den *in vitro* beobachteten 60 nm-ULF entsprechen, kann mit Hilfe der in dieser Arbeit verwendeten Methodik nicht entschieden werden, da die Auflösung von Lichtmikroskopen nicht ausreicht. D.h., es kann nicht bestimmt werden, wie groß die detektierten fluoreszierenden Partikel tatsächlich sind. In weiteren Versuchen könnte eine *fluorescence correlation spectroscopy* (FCS)-Analyse durchgeführt werden, mit deren Hilfe Diffusionskonstanten der fluoreszierenden Partikel bestimmt werden. Damit könnte wiederum auf die Größe der Partikel und der Vorläufer zurückgeschlossen werden.

Spezifische Nukleationsfaktoren, welche die Entstehung der KFPs beeinflussen, müssen sich demnach in der Zellperipherie bzw. in den Lamellipodien befinden. Dort sind viele Adhäsionskomplexe vorhanden, welche zelltypspezifisch aus variablen Proteinkombinationen aufgebaut sind und in unterschiedliche Signalwege eingreifen. Damit besitzen sie zwei Voraussetzungen, um an der Nukleation und/oder der Polymerisation von KFPs involviert zu sein.

Mit Hilfe von Lebendzellaufnahmen von HK18-YFP-exprimierenden Zellen, welche mit dem fluoreszierenden FK-Konstrukt pPaxillin-DsRed2 sowie dem fluoreszierenden FA-Konstrukt pRFP-Zyxin transfiziert wurden, konnte die Bildung von KFPs in unmittelbarer Nachbarschaft zu FKs und reifen FAs in den epithelialen Zellen beobachtet werden (Abb. 16 und 17, Film 4 und 5). Auch in den nicht-epithelialen SK8/18-2-Zellen entstanden KFPs in der Nähe von FAs (Abb. 19, Film 17). Die Transfektion von HK14-YFP-cDNA in EpH4-Zellen bestätigte ebenfalls die Bildung von KFPs an Paxillin-DsRed2-markierten FAs (Abb. 20, Film 9). Pathologische EBS- sowie PC-Keratinaggregate bildeten sich ebenso an den markierten Adhäsionskomplexen (Abb. 21, 22 und 30 sowie Film 10-12). An den markierten Adhäsionen kann die wiederholte Entstehung von KFPs (Abb. 19) sowie der mutierten Keratingranula (Abb. 21) beobachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich die Hypothese formulieren, dass fokale Adhäsionskomplexe als Plattform oder Gerüst für die wiederholte Nukleation der KFPs dienen. Die Messung des Abstandes des Keratinpartikel-Bildungsorts bis zur nächsten Adhäsion bestätigen diese Annahme, da der größte Anteil der KFPs (über 75%) in einem FA oder innerhalb von 2 Pixel (= 0,2 µm) bis zum nächsten FA gebildet wurde (Abb. 23 und Tabelle 44). Weiterhin kann gefolgert werden, dass die Bildung der KFPs an den FAs einen allgemeingültigen Prozess darstellt, da sie weder von zelltypspezifischen Faktoren noch von der Keratinisoform abhängig ist.

Um den direkten Beitrag der Adhäsionskomplexe für die Nukleation der KFPs zu erfassen, wurde die Expression des FA-Protein Talin durch die Transfektion eines spezifischen shRNA-Vektors herunterreguliert, wodurch die potentiellen Nukleationsorte für die KPF-Bildung wegfallen. In verschiedenen Zellsystemen wurde nach dem Talin-Knock-Down fast keine Bildung von KFPs mehr beobachtet; zudem war das Keratinnetzwerk um den Nukleus zusammengezogen. Die Entstehung von mutierten Keratinpartikeln war ebenfalls inhibiert (Abb. 18, 24, 25 und 31 sowie Film 6 und 13). Hieraus erschließt sich des Weiteren, dass die Adhäsionskomplexe auch einen funktionellen Beitrag zur Nukleation der KFPs leisten.

Die Inhibierung der Aktinfilamente und der Mikrotubuli durch Zugabe spezifische Drogen während Fluoreszenzaufnahmen von EK18-1-Zellen zeigte weiterhin, dass der kontinuierliche zentripetale Transport der KFPs vor allem von Aktinfilamenten abhängt (Abb. 34). Für einen Aktin-abhängigen Transport spricht auch die Entstehung von KFs nach der Etablierung der aktin-reichen Lamellipodien (Abb. 32). WÖLL *et. al.* (2005) beschrieben für die nicht-epithelialen SK8/18-2-Zellen, deren Keratinnetzwerk nur aus fluoreszierenden Polypeptiden besteht, ebenfalls einen Aktin-abhängigen

KFP-Transport. Die Geschwindigkeit, mit der sich die KFPs nach innen bewegen, entspricht zudem der des Aktin-*treadmilling* (POLLARD und BORISY, 2003; WÖLL *et al.*, 2005).

Bei Hemmung der Mikrotubuli-Polymerisation in EK18-1-Zellen konnten keine Veränderungen am Transport der KFPs beobachtet werden. Wöll und Kollegen (2005) beschrieben hingegen zusätzlich zu dem Aktin-abhängigen KFP-Transport in den SK8/18-2-Zellen einen bidirektionalen, Mikrotubuli-abhängigen Transport der KFPs unter anderem in axon-artigen Zellausläufern (WÖLL *et al.*, 2005). EpH4-Zellen bildeten vornehmlich große Lamellipodien und keine axon-artigen Ausläufer, in denen KFPs kontinuierlich transportiert wurden. Dies könnte den fehlenden Effekt der Mikrotubuli-Hemmung auf die KFP-Dynamik erklären, da in EpH4-Zellen nur sehr selten bidirektionale KFP-Bewegungen detektiert wurden und zudem die KFPs entlang von Aktin-Stressfasern zentripetal wandern (WINDOFFER *et al.*, 2006). Der Transport von Peripherin- sowie Vimentin-Partikel scheint im Gegensatz zu dem Transport der KFs hauptsächlich Mikrotubuli-abhängig zu sein (PRAHLAD *et al.*, 1998; HELFAND *et al.*, 2002; HELFAND *et al.*, 2003a,b). Aus diesen Befunden läßt sich schlußfolgern, dass die Typ I und II IFs hauptsächlich durch Aktin-abhängigen Transport bewegt werden, welcher auf dem Aktin-*treadmilling* beruht. Die Typ III IFs werden im Gegensatz dazu hauptsächlich durch einen Mikrotubuli-abhängigen Transport durch das Motorprotein Kinesin bewegt (PRAHLAD *et al.*, 1998).

Die beobachteten Ergebnisse lassen sich in einem Modell zusammenfassen (Abb. 60). Dargestellt ist die Zellperipherie einer imaginären Zelle, die ein Lamellipodium ausbildet.

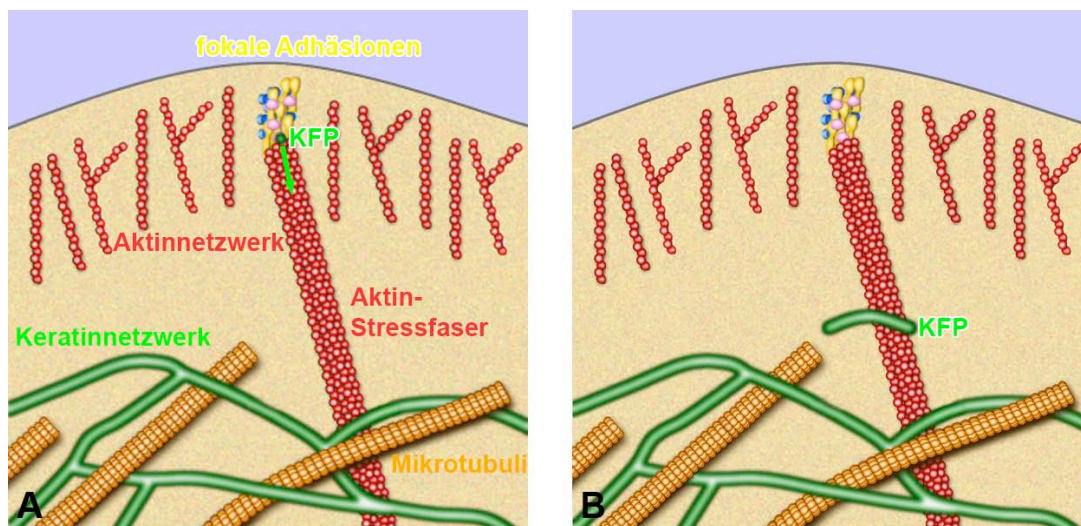


Abb. 60: Schematisches Modell der KFP-Bildung, welches die Entstehung von KFPs an FAs zusammenfaßt. Dargestellt ist eine Zellperipherie mit entstehendem Lamellipodium. Das periphere Keratinnetzwerk ist in grün eingezeichnet, die Mikrotubuli in gelb und das Aktinnetzwerk in rot. (A) KFPs entstehen als punktförmige Partikel an den FAs (gelb), vergrößern sich und wandern an Aktin-Stressfasern, die an den Adhäsionen verankert sind, in Richtung Zellzentrum, wo sie ins periphere Netzwerk integrieren (B). Die Grafik wurde von R. Windoffer zur Verfügung gestellt.

In der Zellmitte befinden sich das periphere Keratinnetzwerk (grün) sowie die Mikrotubuli (gelb). Aktin-Stressfasern (rot) erstrecken sich bis in das Lamellipodium hinein und sind an FAs verankert

(gelb). Das polymerisierende Aktin-Netzwerk (rot) schiebt die Zellfront mit der Bewegungsrichtung nach vorn. An den Adhäsionskomplexen entstehen Keratinfilament-Partikel (A), welche in die Länge wachsen (KFP) und entlang von Aktinfilamenten in Richtung Zellzentrum transportiert werden (Pfeil), wo sie in das periphere Netzwerk integrieren (B).

Ob FAs direkt als Nukleationsfaktoren oder Polymerisationsfaktoren wie z. B. der Arp2/3-Proteinkomplex für die Aktinfilamente dienen, muss noch weiter untersucht werden. Proteininteraktionsstudien wie Co-Immunopräzipitationen, Yeast-to-Hybrid-Versuche, 2D-Gel Elektrophorese mit anschließenden massenspektroskopischen Untersuchungen sowie Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Messungen oder hochauflösende EM-Aufnahmen könnten zusätzliche Hinweise liefern. Auch die gezielte Inhibition weiterer Proteine der Adhäsionskomplexe beispielsweise über einen shRNA-Screen könnte klären, welche der FA-Proteine möglicherweise mit der KFP-Bildung direkt interagieren. Es wäre allerdings auch möglich, dass noch weitere zwischengeschaltete Signal- oder Strukturmoleküle wie z. B. Plectin die Interaktion vermitteln (s. u.). Die Interaktion mit weiteren Proteinen könnte ebenfalls erklären, warum nicht alle gebildeten KFPs zusammen mit FAs detektiert werden konnten (siehe Tabelle 44). Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass mit der zur Verfügung stehenden Auflösung des Mikroskops nicht die ursprünglich polymerisierenden KF-Partikel detektiert wurden und somit wahrscheinlich nicht alle entstehenden KFPs als solche erkannt werden konnten.

Für andere IF-Proteine sind ebenfalls Interaktionen mit FA-Proteinen bekannt. α -Synemin, ein Typ IV IF, bildet mit Vimentin und Desmin (beide Typ III IFs) Heteropolymere und interagiert mit Vinculin und Talin (UYAMA *et al.*, 2006). Es besitzt im Gegensatz zur Isoform β -Synemin eine 312 AS große Insertion (SNTIII) in der Schwanzdomäne, welche direkt mit der Stabdomäne von Talin und der Schwanzdomäne von Vinculin interagiert (SUN *et al.*, 2008a; SUN *et al.*, 2008b). Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen die Ko-Lokalisierung von Talin bzw. Vinculin mit Synemin in den Costameren von Skelettmuskelzellen. Es wird vermutet, dass diese Interaktion zwischen Vinculin bzw. Talin und Synemin die Heteropolymere mit dem Sarkolemma der Muskelzellen verbindet.

Für Vimentin wurde eine Interaktionen mit α V/ β 3-Integrin-positiven FKs, so genannten *vimentin-associated-matrix-adhesions* (VAMs), in kultivierten Endothelzellen nachgewiesen (GONZALES *et al.*, 2001). Vimentin-assoziierte FKs wurden schon in Fibroblasten beschrieben (BERSHADSKY *et al.*, 2003). Durch Doppelmarkierungen wurde gezeigt, dass Vimentinbündel in α V-Integrin sowie β 3-Integrin markierten Adhäsionen enden: über 65% der Adhäsionen zeigten eine Ko-Lokalisierung mit Vimentin. Auch EM-Untersuchungen mit Antikörpern, die mit Goldpartikeln unterschiedlicher Größe visualisiert wurden, zeigten eine Assoziation von VMAs mit Vimentin (GONZALES *et al.*, 2001). Die Autoren vermuten weiterhin, dass diese Interaktionen über Plectin vermittelt werden, da eine Ko-Lokalisierung von Plectin und den Integrinen beobachtet wurde. Tsuruta und Jones (2003) zeigten,

dass 50% der YFP- β 3-Integrin markierten FKs mit CFP-Vimentin in Endothelzellen ko-lokalisieren (TSURUTA und JONES, 2003).

Des Weiteren verändern VMAs ihre Interaktion mit Vimentin: Durch Scherstress reifen und stabilisieren sich die Adhäsionen und assoziieren mit dickeren Vimentinbündeln. Bei Knock-Down von Vimentin durch Vimentin-spezifische siRNA erscheinen Integrin-markierte FKs kleiner (TSURUTA und JONES, 2003). Die Autoren sprechen Vimentin eine Strukturregulation der Kontakte zu, indem es beispielsweise als Gerüst dient, welches die verschiedenen Adhäsionsproteine zusammenhält. Die Regulation könnte allerdings auch über Interaktionen mit Plectin erfolgen (siehe oben, TSURUTA und JONES, 2003).

KFs scheinen hingegen nicht die Struktur oder Funktion der Adhäsionen zu beeinflussen, da in Zellen, die mutiere EBS- oder PC-Keratinaggregate synthetisieren, normale FAs ausgebildet werden. Hingegen wird vermutet, dass anscheinend im Gegensatz zu den VMAs die FAs die Bildung der KFs beeinflusst. Weitere funktionelle Untersuchungen (s. o.) sind notwendig, um diese Differenzen zu klären.

Fasst man diese Ergebnisse zusammen, kann die von Windoffer und Leube (2001, 2004) postulierte Neubildung der KFs in bestimmten submembranösen Bereichen bestätigt und darüber hinaus subzellulär auf fokale Adhäsionskomplexe eingegrenzt werden. FAs sind die optimalen Kandidaten für die Nukleation der KFPs, da sie eine strukturelle Plattform zur Verfügung stellen, welche dynamisch regulierbar ist. Sie sind in der bereits als Bildungsregion der KFPs beschriebenen Zellperipherie reichlich vorhanden und interagieren mit zahlreichen Signalwegen, die zwischen intra- und extrazellulären Bereichen vermitteln. Da auch für andere IF-Proteine ein Zusammenhang zwischen IF-Bildung und Adhäsionskomplexen aufgedeckt wurde, könnten diese als generelle IF-Organisationszentren angesehen werden.

Die Annahmen, dass die Nukleation der KFs am Nukleus, an den Desmosomen oder ohne definierten Ort im Zytoplasma stattfindet (siehe Einleitung), konnten somit nicht bestätigt werden. In Zellen, in denen Desmosomen deletiert wurden (WINDOFFER *et al.*, 2002), werden KFPs unbeeinflusst in der Zellperipherie gebildet und zentripetal transportiert. Da auch in IF-freien, nicht-epithelialen Zellen die Bildung von KFPs an FAs beobachtet werden konnte, kann die vermutete Neubildung der KFs an Desmosomen weitgehend ausgeschlossen werden. Da die Desmosomen die stabilen, wenig dynamischen Keratinfilamentbündel verankern und die Filamentsysteme verschiedener Zellen miteinander verbinden, könnten sie eine Funktion für die Stabilisierung dieser dicken Bündel wahrnehmen.

Die regulierbare Bildung an definierten Orten steht ebenfalls in Kontrast zu der spontanen Bildung von Filamenten *in vitro*. Daraus kann gefolgert werden, dass *in vivo* Faktoren vorhanden sind, welche ein Polymerisieren der Untereinheiten verhindern. An den FAs hingegen könnten Faktoren lokalisiert sein, welche die Polymerisation der Untereinheiten zu Filamenten auslösen bzw. katalysieren. Näheres zu den potentiellen Faktoren und Regulationsmechanismen wird im weiteren Verlauf dieser

Arbeit diskutiert.

Mikrotubuli scheinen ebenfalls wie Aktinfilamente an der Struktur und Entwicklung von Adhäsionskomplexen beteiligt zu sein (KAVERINA *et al.*, 1998; KAVERINA *et al.*, 1999; PETIT und THIERY, 2000; GEIGER *et al.*, 2001). Zusammenfassend bilden die FAs somit eine ideale Struktur für die Interaktion der drei unterschiedlichen Zytoskelett-Komponenten. Verschiedenste Signale könnten integriert und koordiniert werden und ermöglichen eine schnelle Reaktion der Zelle auf veränderte Umgebungsbedingungen wie z. B. in Stresssituationen.

5.2 Keratinfilamente unterliegen einem ständigen Auf- und Abbau: Das Keratin-Tretmühlen-Modell

Nachdem im ersten Teil der Arbeit ein Modell entwickelt wurde, welches den Aufbau des Keratinnetzwerks beschreibt, wurde im folgenden Teil untersucht, inwiefern die KFPs einem kontinuierlichen Turnover unterliegen. Da ständig neue Filamente entstehen, aber keine Anhäufung zu beobachten ist, müssen ebenfalls regulierbare Abbaumechanismen existieren. Mit Hilfe von Photoaktivierungsexperimenten konnten die KFs in spezifischen Zellbereichen verfolgt und analysiert werden. Die Aktivierung einer Zellhälfte von Epithelzellen, welche mit photoaktivierbaren Keratin8-GFP-cDNAs transfiziert wurden, führte zur Detektion von KFPs in der Zellperipherie der Zellhälfte, die nicht aktiviert wurde (Abb. 36-38 und Film 21). Diese KFPs konnten nur durch den Abbau der fluoreszenzaktivierten Filamente in lösliche Untereinheiten wieder entstanden sein, da eine Neusynthese fluoreszierender K8-Moleküle nicht möglich ist.

Die photoaktivierten Filamente bewegten sich in Richtung des Zellzentrums und etablierten ein vollständiges fluoreszierendes Keratinnetzwerk, welches dem endogenen Netzwerk entsprach. Weiterhin fusionierten sie und reiften zu dicken Bündeln, während sie sich in Richtung Zellmitte bewegten. Zudem nahm die Fluoreszenzintensität in der aktivierten Zellhälfte ab.

Daraus kann gefolgert werden, dass KFs kontinuierlich in ihre Untereinheiten abgebaut und in der Peripherie für den Zusammenbau neuer KFPs wiederverwendet werden. Zellfusionsexperimente bestätigten diese Annahme, da fusionierte Zellen, welche rotfluoreszierendes K8 und grünfluoreszierendes K18 synthetisieren, eine Überlagerung des neuentstehenden, gemeinsamen Netzwerkes zuerst in der Zellperipherie des Heterokaryons aufwiesen (Abb. 38).

Aus beiden Versuchen ergibt sich folgendes hypothetisches Bild: KFs unterliegen einem ständigen und kontinuierlichen Auf- und Abbau. Der Aufbau findet in der Zellperipherie, der Abbau in der Zellmitte statt.

Da die Inhibierung der Proteinbiosynthese mit Hilfe von Cytochalasin und Cycloheximid in Zellen, die fluoreszenzmarkierte KFs herstellen, keinen Einfluss auf die Bildung der KFPs hatte, ist davon auszugehen, dass die Entstehung der KFPs unabhängig von Translationsvorgängen verläuft (Abb. 40).

Abb. 61 fasst die bisher gewonnenen Erkenntnisse zu einem neuentwickelten hypothetischen Modell zusammen. Es beschreibt einen kontinuierlichen Zyklus, die sogenannte „Keratin-Tretmühle“, welche den ständigen Auf- und Abbau der Keratinfilamente erklärt.

KFs entstehen in der Zellperipherie als sogenannte KFPs (Nukleation). Während ihres Aktin-abhängigen, zentripetalen Transports wachsen die Vorläufer in die Länge und fusionieren miteinander über ihre Enden zu längeren Filamentstücken (Elongation/Fusion). Ebenso verschmelzen sie über End- zu- End-Anlagerungen mit dem peripheren Netzwerk (Integration). Anschließend erfolgt die Kompaktierung der KFs zu dicken Filamentbündeln (Bündelung). Dieser Zusammenbau („assembly“) erfolgt translationsunabhängig aus löslichen Tetramer-Untereinheiten. Der Abbau der KFs findet wahrscheinlich durch Dissoziation von Untereinheiten, welche anschließend in den löslichen Pool zurückfließen, in der perinukleären Region statt.

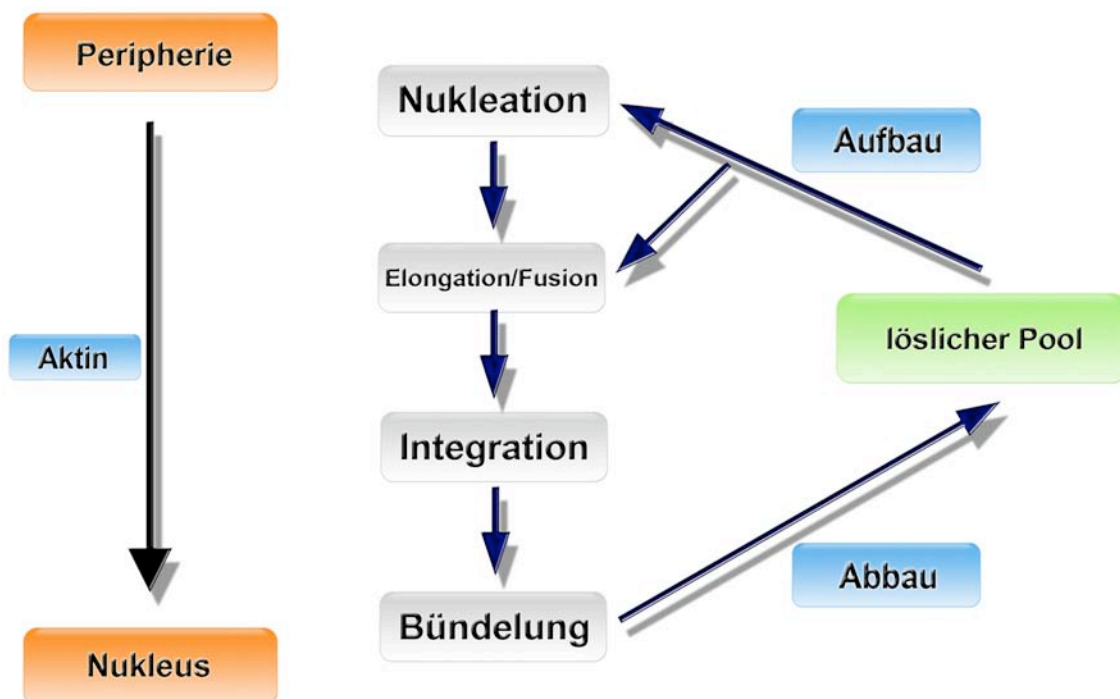


Abb. 61: Keratin-Tretmühlen-Modell. Es beschreibt einen kontinuierlichen Keratinkreislauf, welches den ständigen Auf- und Abbau der KFs realisiert. Die Nukleation der KFPs findet in der Zellperipherie statt. Anschließend werden diese in einem Aktin-abhängigen Transport in Richtung Nukleus transportiert. Währenddessen wachsen sie in die Länge und fusionieren miteinander. Anschließend erfolgt die Integration ins periphere Keratinnetzwerk. Der Abbau der KFs erfolgt in der Zellmitte durch Abdissoziation von Untereinheiten, welche anschließend in den löslichen Pool zurückfließen und für den Aufbau von neuen KFPs wieder verwendet werden könnten.

Nukleation

Die Nukleation definiert die Initiierung der Filamentbildung. Als Nukleationsort wurden FAs in der Zellperipherie vorgeschlagen, welche zudem selbst als Polymerisationsfaktoren dienen könnten (siehe oben). An FAs gebundene Linkermoleküle könnten ebenfalls diese Aufgaben wahrnehmen.

Näheres zu den potentiellen Linkermolekülen und Regulationsmöglichkeiten wird weiter unten in dieser Arbeit diskutiert.

Elongation/Fusion

Die entstehenden Keratinpartikel wachsen zunächst durch Integration von Untereinheiten an ihren Enden in die Länge. Des Weiteren können sie sich über End- zu End-Anlagerungen vergrößern. Elongation und Fusion von KFPs wurden bereits in SK8/18-2-Zellen beobachtet (WÖLL *et al.*, 2005). Auch für Vimentinpartikel wurden End- zu End-Anlagerungen beschrieben (PRAHLAD *et al.*, 1998).

Integration

Die KFPs werden zentripetal in einem Aktin-abhängigen Transport bewegt. Beim Erreichen des peripheren Keratinnetzwerks integrieren sie über ihre Enden mit den peripheren KFs. KFPs in SK8/18-2-Zellen scheinen ebenfalls über ihre Enden in das periphere Netzwerk zu integrieren (WÖLL *et al.*, 2005). Über diese Integration könnten darüber hinaus neue Abzweigstellen im Netzwerk generiert werden.

Bündelung

Die Dicke der Keratinfilamente nimmt von der Peripherie zur Zellmitte hin zu. Laterale Assoziationen von Keratinuntereinheiten könnten für Bündelung der Filamente verantwortlich sein (siehe oben). Quervernetzende Proteine wie Filaggrin und Trychohyalin (siehe Einleitung) könnten bei der Bündelung von Filamenten beteiligt sein.

Löslicher Pool

Der lösliche Pool besteht wahrscheinlich aus Tetrameren (SOELLNER *et al.*, 1985) und wird beständig durch Proteinbiosynthese in der gesamten Zelle aufgefüllt und über Diffusionsvorgänge verteilt. Es ist unklar, ob die Dimerisierung der Monomere und die laterale Aneinanderlagerung zu Tetrameren schon ko-translationell erfolgt, oder ob durch Chaperone die Monomere stabilisiert werden und erst nach der Synthese die Dimerisierung erfolgt (SOELLNER *et al.*, 1985; KREPLAK *et al.*, 2004). Weiterhin kann angenommen werden, dass die Tetramere durch Chaperone oder Phosphorylierung in einem nicht-polymerisierungskompetenten Zustand gehalten werden. Mechanismen, welche beispielsweise den Kopf der Filamente am Aufklappen hindern und damit Interaktionen mit weiteren Molekülen verhindern würden, kämen hierfür in Frage (KREPLAK *et al.*, 2004). Erst ein Nukleations- oder Polymerisationssignal, welches mit den FAs oder anderen Linker-Molekülen interagiert, würde diesen Zustand wieder aufheben.

Abbau

Der Abbau der Keratinfilamente könnte vorzugsweise in der perinukleären Region erfolgen. Es wird postuliert, dass die Filamente durch Dissoziation von Untereinheiten abgebaut werden, welche wiederum direkt in den löslichen Pool zurückfließen und somit für einen weiteren KFP-Aufbau-Zyklus zur Verfügung stehen.

Weitere unveröffentlichte Experimente aus unserem Labor von R. Windoffer geben Hinweise auf diese Hypothese: In FRAP-Experimenten wurde die obere Zellhälfte einer PK18-5-Zelle ausgebleicht. Anschließend erfolgte die Regeneration der Fluoreszenz zuerst in der Zellperipherie. Die Fluoreszenzintensität in der unteren, nicht gebleichten Zellhälfte nahm hingegen ab. Daraus kann abgeleitet werden, dass in der Zellperipherie neuentstehenden KFPs nur durch Abbau der perinukleären Filamente entstehen. Kontrollzellen zeigen eine gleichbleibende Fluoreszenzintensität. Weitere Datenanalysen von Lebendzellaufnahmen fluoreszenzmarkierten Keratine, bei denen einzelne Filamentbündel manuell farblich markiert und dadurch bei ihrer Wanderung verfolgt werden konnten, zeigten die Verschmelzung von Filamenten zu Bündeln (durchgeführt von R. Windoffer). Zudem konnte in hohen Vergrößerungen von Zellteilbereichen beobachtet werden, dass einzelne, markierte Keratinfilamentbündel verschwanden. Da keine Filamentstücke detektiert wurden und die Fluoreszenzintensität abnahm, wurde gefolgert, dass der Abbau nur durch die Dissoziation von löslichen Untereinheiten erfolgt. Es lässt sich ferner schließen, dass dickere Filamentbündel, die über Desmosomen verankert sind, vor diesem Abbau durch spezifische, assoziierte Faktoren geschützt sind.

Eine weitere Möglichkeit des Abbaus von Filamenten ist die lokale Degradierung der Polypeptide z. B. über Ubiquitylierung, die vermutlich bei der Apoptose von Bedeutung ist (KU und O'MARY, 2001).

Zusammenfassend könnte das postulierte Keratin-Tretmühlen-Modell den kontinuierlichen Auf- und Abbau der KFs erklären. Es bietet ideale Voraussetzungen für die Zellen, um z. B. in Stresssituationen schnell und adäquat reagieren zu können. Der Turnover kann bei Bedarf, wie es beispielsweise bei der Zellmigration geschieht, beschleunigt oder verlangsamt werden. Die Regulation könnte über externe Faktoren erfolgen. So wird z. B. durch die Hemmung von p38 die Neubildung der KFPs gestoppt und der Transport verändert. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Phosphorylierungsprozesse entscheidend auf den Auf- und Abbau einwirken (WOLL *et al.*, 2007).

Die Ergebnisse von Lu und Kollegen (2005) unterstützen die Hypothese meiner Arbeit, welche eine post-translationale Bildung von Keratinfilamenten aus einem pre-existierenden Pool von IF-Untereinheiten vorschlägt. Sie beschreiben, dass Typ II Keratine ab dem Zweizellstadium in der Embryonalentwicklung der Maus früher produziert werden als ihre Typ I Keratin Partner. Die Typ II Keratine werden in Form von Aggregaten aufbewahrt, bis die Heterodimerisierung stattfindet (LU *et al.*, 2005). Zunächst können ab Embryonaltag 2,5 Aggregate von K7 und K 8 detektiert werden. Ab Embryonaltag E3.5 werden dann Filamente aus K8- und K18-Dimeren nachgewiesen. Auch dass die KFs während ihres Zusammenbaus erst heteropolymerisieren müssen, spricht für eine post-translationale Bildung der Filamente.

Sicherlich muss berücksichtigt werden, dass die Bezeichnung „Keratin-Tretmühle“ nicht mit dem Aktin-*treadmilling* gleichzusetzen ist. Es existieren im Gegensatz zum Aktin-*treadmilling* keine globulären Untereinheiten und die Filamente besitzen keine Polarität durch definierte Enden, an

denen durch energieabhängige Hydrolyse der Auf- und Abbau stattfindet. Dieses gegenwärtige Bild stellt polymerisierte Untereinheiten wie beispielsweise Tetramere, Oktamere oder die *in vitro* beschriebenen ULFs als Grundeinheiten vor, welche unabhängig einer Hydrolyse gebunden und wieder abgelöst werden.

Das vorgeschlagene Keratin-Tretmühlen-Modell steht in Gegensatz zu dem sogenannten Ko-Translationsmodell, welches den ko-translationellen Zusammenbau von Peripherin-Vorläufern aus Peripherin-Partikeln, die zusammen mit Peripherin-mRNA, sogenannten Ribonuklein-Partikeln detektiert wurden, beschreibt (CHANG *et al.*, 2006). Diese Versuche, die unter gleichen Bedingungen in dieser Arbeit durchgeführt wurden, erzielten nicht dieselben Ergebnisse. In PC12-Zellen, welche mit Peripherin-YFP-cDNA transfiziert und mit NGF differenziert wurden, konnten vollständige IF-Netzwerke nachgewiesen werden (Abb. 58 und 59 sowie Film 36). In der Zellperipherie existieren kurze Peripherinpartikel und -Vorläufer, welche in der Zellperipherie entstehen und sich zumeist ungerichtet in der Peripherie bewegen. Weiterhin persistiert der Peripherin-Turnover nach Inhibierung der Proteinbiosynthese in PC12-Zellen (Abb. 59 sowie Film 37 und 38). Das Ko-Translationsmodell konnte somit nicht bestätigt werden.

Anscheinend existieren jedoch schon IF-Typ-spezifische Unterschiede für die dynamischen Eigenschaften der IFs. Für Vimentin, Desmin und Peripherin scheinen ebenfalls vorläuferartige Strukturen zu existieren, deren Entstehung in der Zellperipherie beobachtet wurde (Abb. 56, 58 und 59 sowie Film 34-36) und bereits von (CHOU *et al.*, 2007) beschrieben worden sind. Allerdings weisen diese Vorläufer andere dynamische Eigenschaften als KFPs auf, da sich diese hauptsächlich ungerichtet in der Zelle bewegen, welches auf einen Mikrotubuli-abhängigen Transport beruht (HELFAND *et al.*, 2002). Diese Unterschiede könnten durch IF-spezifische Faktoren hervorgerufen werden, welche die dynamischen Eigenschaften der verschiedenen IF-Typen verändern. Dies könnte auch die gewebsspezifischen Eigenschaften der verschiedenen IF-Proteine erklären. Weiterhin ist möglich, dass die verschiedenen IF-Proteine aufgrund ihrer funktionellen Spezialisierung Unterschiede in ihrem Turnover aufweisen.

Modulation und Regulation der Keratinfilament-Dynamik

Plectin

Auf der Suche nach Proteinen, welche den Aufbau der KFs beeinflussen könnten, wurde Plectin als möglicher Kandidat untersucht. Plectin besitzt aufgrund seiner ABD und IF-Bindedomäne ideale Voraussetzungen, um die KFPs an das Aktinfilament-System zu koppeln. Die N-terminalen Plectin-Isoformen 1E und 1F lokalisieren im Bereich von FAs (Abb. 44). Die Lokalisation der Isoform 1F an Adhäsionskontakten wurde bereits beschrieben (REZNICZEK *et al.*, 2003; TIAN *et al.*, 2006). In Lebendzellaufnahmen von EpH4-Zellen, welche mit HK18-YFP-cDNA und Plectin1E-mRFP-cDNA bzw. Plectin1F-mRFP-cDNA ko-transfiziert wurden, wurde die Bildung von KFPs an den Plectin-markierten

FAs beobachtet (Abb. 45 und 46 sowie Film 24 und 25) . Ob diese Plectin-Isoformen tatsächlich als Interaktionspartner zwischen Keratinen und den Adhäsionskontakten fungieren und womöglich als Nukleations- oder Polymerisationsfaktoren agieren, muss noch weiter untersucht werden. Beispielsweise könnten durch Knock-Down von Plectin 1 und der N-terminalen Isoformen weitere Kenntnisse über einen funktionellen Beitrag von Plectin zur KFP-Bildung erlangt werden. Der Vergleich der Plectin-Isoformen weist einzigartige kurze Sequenzunterschiede auf (siehe Anhang), welche als Zielsequenzen für einen Isoform-spezifischen shRNA-Knock-Down benutzt werden könnten.

Schon vor einiger Zeit wurde ein Beitrag von Plectin für die Keratinnetzwerk-Bildung postuliert: Keratingranula, welche durch den Abbau von Filamenten während der Mitose oder durch Induktion mit dem Phosphatase-Inhibitor Orthovanadat entstanden sind, ko-lokalisieren mit Plectin (STRNAD *et al.*, 2001; STRNAD *et al.*, 2002). Osmanagic-Meyers und Kollegen (2006) beschreiben, dass Keratinnetzwerke in Plectin-defizienten Zellen empfindlich auf einen osmotischen Schock reagieren, welcher zu einem Rückzug des Netzwerks aus der Peripherie führt. Zudem erfolgt die durch Okadarsäure induzierte Zerstörung des Netzwerkes wesentlich schneller als in Wildtyp-Zellen (OSMANAGIC-MYERS *et al.*, 2006).

Weitere Plakin-Typen scheinen ebenfalls einen Einfluss auf die IF-Bildung und -Organisation zu haben: Epiplakin-defiziente Maus-Keratinocyten zeigen eine veränderte Migration. Der Knock-Down von Periplakin durch siRNA interferiert weiterhin mit der Keratin-Bündelung und verhindert die Wundschließung in Epithelzellen (LONG *et al.*, 2006).

Tsuruta und Jones (2003) vermuteten ebenfalls für die von ihnen beobachtete Ko-Lokalisierung von Vimentin und Integrin eine durch Plectin vermittelte Interaktion (TSURUTA und JONES, 2003).

Weiterhin ist bekannt, dass Plectin an das Typ III IF-Protein Vimentin bindet (REZNICZEK *et al.*, 2004). Neue Untersuchungen zeigen sogar eine Abhängigkeit des Vimentin-Zusammenbaus von der Plectin-Expression. So konnten Spurny und Kollegen (2008) in Plectin *-/-* Fibroblasten keine Vimentin-Granula und *-squiggles* detektieren. Normale Netzwerke und Vimentin-Fragmente sind hingegen vorhanden, welche sich ungerichtet in der Zelle bewegen. Die Autoren schlussfolgern, dass ohne die Quervernetzung durch Plectin Vimentin schneller assembliert ähnlich dem spontanen Zusammenbau *in vitro*. Weiterhin scheint Vimentin ohne Plectin nicht mehr mit den MT zu assoziieren und damit kein gerichteter Vimentin-Transport mehr stattzufinden (SPURNY *et al.*, 2008).

Zusammenfassend liegen Erkenntnisse vor, welche Plectin nicht nur eine strukturelle Funktion als Brücke zwischen FAs und KFs vermuten, sondern auch eine Rolle der Filamentbildung und Netzwerkorganisation nahelegen.

Fokale Adhäsionskinase

Die FAK nimmt eine bedeutende Rolle in der Signalverarbeitung der Adhäsionskomplexe ein. Sie kann über Phosphorylierungen an verschiedensten Stellen aktiviert werden und aktiviert als Serin-

Threonin-Kinase weitere Proteine. In Immunfluoreszenzaufnahmen von Keratin18-YFP-synthetisierenden Zellen, die mit einem FAK-Y-spezifischen AK behandelt wurden, ko-lokalisiert die FAK mit KFPs (Abb. 47). Die Überexpression der FAK (Transfektion von SuperFAK) sowie die Hemmung ihrer Kinase-Aktivität (Transfektion von FRNK) beeinflusst sowohl die Keratin-Netzwerkintegrität als auch die Entstehung und Dynamik der KFPs (Abb. 48 und 49 sowie Film 26 und 27). In den Lamellipodien der transfizierten Zellen werden Keratingranula detektiert, welche nur zu einem geringen Teil mit den FAs ko-lokalisieren und sich zudem ungerichtet in der Zelle bewegen.

Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass die FAK als Nukleations- oder Polymerisationsfaktor für die KFs agiert. Kürzlich wurde gezeigt, dass die FAK die Aktinfilament-Polymerisierung über eine direkte Anbindung der FERM-Domäne mit Arp 2/3 kontrolliert (SERRELS *et al.*, 2007). Ähnliches könnte für die Polymerisierung von KFs angenommen werden. Ein Knock-Down der FAK durch shRNA könnte helfen, diese Fragestellung zu klären. Mit Hilfe von Interaktionsstudien könnte zudem untersucht werden, ob eine direkte Interaktion zwischen der FAK und den KFs besteht, oder ob weitere Proteine wie z. B. Plectin (siehe oben) zwischengeschaltet sind.

p38 Mitogen-aktivierte-Proteinkinase

Es ist bekannt, dass durch Phosphorylierungen eine Modulation und Regulation der Keratinfilamentdynamik erreicht wird (COULOMBE und OMARY, 2002; OMARY *et al.*, 2006). Die MAP-Kinase p38 besitzt Phosphorylierungsstellen in der Kopfdomäne der KFs und ist in den Auf- und Abbau der Filamente involviert (Woll *et al.*, 2007).

Die Hemmung von p38 in Zellen, die mit RFP-Zyxin-cDNA transfiziert wurden, bewirkt eine veränderte Organisation der FAs (Abb. 52 A und Film 30). Es ist bekannt, dass die Reifung von FKs zu FAs über Phosphorylierungsprozesse gesteuert wird (SCHLAEPFER und MITRA, 2004). Eine wichtige Rolle hierbei spielt die MAP-Kinase ERK (*extracellular-signal regulated kinase*). Sie induziert den Abbau der FAs und stimuliert somit die Zellmigration (CARRAGHER und FRAME, 2004). Schlaepfer und Mitra (2004) postulieren, dass die FAK über Src ERK aktiviert. Auch p38 könnte in diesen MAPK/FAK Signalweg involviert sein, da sich FAs nach Inhibierung der p38-MAPK zu FKs verkleinern (Abb. 52 A).

In Zellen, die stabil Keratin 18-YFP synthetisieren und mit RFP-Zyxin-cDNA transfiziert wurden, wurde die Bildung der KFPs nach Hemmung der p38-MAPK gestoppt (Abb. 52 und Film 31). In der Zellperipherie konnten weder KFPs noch Filamente detektiert werden, das Netzwerk hatte sich zudem in Richtung Zellmitte zurückgezogen. Die FAs verkleinern sich hier ebenfalls. Ähnliches wurde schon in AK13-1 und MT5K14-26-Zellen beobachtet (WOLL *et al.*, 2007). Die Zugabe des p38-Inhibitors verhindert weiterhin die Bildung von KFPs in beiden Zelllinien, die Netzwerke sind ebenfalls zusammengezogen.

Zusammenfassend lässt sich folgende Hypothese formulieren: Durch Phosphorylierung der löslichen Untereinheiten (z. B. Tetramere) bilden sich KFPs, welche beispielsweise aus ULFs bestehen könnten. Die Polymerisierung zu KFs könnte durch eine Dephosphorylierung über Phosphatasen ausgelöst

werden (TAO *et al.*, 2006). Die FAK könnte dabei zum einen über eine direkte Phosphorylierung der Keratin-Untereinheiten ihre Polymerisation auslösen und/oder zum anderen die p38-MAPK aktivieren, welche anschließend die Untereinheiten phosphoryliert. Plectin könnte ebenfalls die Interaktion zwischen den KFs und der FAK bzw. den FAs vermitteln.

Um potentielle Interaktionen zwischen FAK und p38 zu überprüfen, könnten folgende Experimente durchgeführt werden: In Zellen, die fluoreszierende Keratine synthetisieren und mit der dominant-aktiven FAK-Mutante SuperFAK bzw. der dominant-negativen FAK-Mutante FRNK transfiziert wurden, sollte die Expression von p38 untersucht werden. Mit phospho-spezifischen Antikörpern könnte überprüft werden, ob die Phosphorylierung der p38-MAPK nach diesen Transfektionen erhöht ist. Die FAK sollte zudem durch die Transfektion von shRNA gegen FAK in Zellen, welche fluoreszierende Keratine synthetisierenden, herunterreguliert werden. Anschließend sollte die Expression von p38 überprüft werden. Weiterhin könnte in Zellen, die fluoreszierende Keratine synthetisierenden, p38 durch die Transfektion von spezifischen shRNA-Konstrukten (WOLL *et al.*, 2007) inhibiert und die Expression der FAK untersucht werden. Mögliche Effekte sollten durch Lebendzellaufnahmen dargestellt werden. Somit könnte auch entschieden werden, ob die FAK p38 beeinflusst, oder ob auch eine umgekehrte Interaktion stattfindet.

5.3 Mutationen im Keratingen K6a verursachen die Bildung von Keratinaggregaten

Erbkrankheiten, bei denen Mutationen von KF-Genen vorliegen, führen zu Störungen der Netzwerkintegrität, deren Ursachen bis heute nicht genau verstanden sind. Untersuchungen sollen daher zu einem besseren Verständnis der Funktion und Dynamik der IFs sowie der Entstehung der Filamente beitragen.

Bei der autosomal-dominant vererbten Hautkrankheit *Pachyonychia congenita* liegen unterschiedliche Mutationen in den Keratinen 6, 16 und 17 vor. Um Veränderungen der Entstehung, Dynamik und Netzwerkorganisation durch Zeitrafferserien herauszuarbeiten, wurden Zelllinien, die unterschiedlichen Mutationen des K6a-Genes fusioniert mit YFP aufweisen mit der Kontroll-Zelllinie, die das unveränderte K6a herstellt, verglichen.

Die über retroviralen Gentransfer hergestellte PLC-Zelllinie PK6aN171K-1 enthält eine Punktmutation an der Aminosäure N171 von Asparagin nach Lysin, die Zelllinie PK6aN171del-2 eine Deletion der drei Basenpaare AAC ebenfalls an der Aminosäure N171 (Abb. 11). Diese Mutationsstelle ist im Coil 1A der Stabdomäne lokalisiert, welche beim Zusammenbau der KFs eine essentielle Rolle spielt. Die Zelllinie PK6a-5 synthetisiert das wildtypische K6a und wurde als Kontrolle benutzt, das sie ein „normales“ filamentöses Keratinnetzwerk herstellt (Abb. 26 A). Alle drei Zelllinien zeigten ebenso wie der aus EpH4-Zellen abgeleitete Klon EK18-1 eine sehr homogene Expression der transfizierten Konstrukte.

Entstehung und Dynamik von KFPs aus mutierten Keratinen

Die beiden Klone PK6aN171K-1 und PK6aN171del-2 besaßen kein filamentöses Keratinnetzwerk mehr, sondern lediglich Keratingranula (Abb. 26 und 27). Es wurden von beiden Konstrukten mehrere Klone hergestellt, welche jeweils die gleichen Eigenschaften aufwiesen. Interessanterweise unterschieden sich die Klone mit unterschiedlichen Mutationen leicht in ihrer Granulamorphologie. Die auf der Punktmutation beruhende Zelllinie PK6aN171K-1 synthetisierte Granula verschiedenster Form, Länge und Größe und besaß außerdem noch ein schwach ausgebildetes perinukleäres Restnetzwerk. Die auf der Deletion beruhende Linie PK6aN171Kdel-2 hingegen bestand aus kleineren Zellen, die nur gleichförmige Granula synthetisierten (Abb. 26). Bei beiden Zelllinien entstanden die Granula homolog zu den wildtypischen KFPs des PK6a-5-Zellklons in der Zellperipherie und wanderten anschließend zentripetal, lösten sich aber nach kurzer Zeit wieder auf (Abb. 27 und Film 14, 15 und 16). In den PK6aN171K-1-Zellen vergrößerten sich die entstehenden KFPs zu länglichen Vorläufern, in den PK6aN171del-2-Zellen wuchsen sie nur zu größeren rundlichen Granula. Somit scheinen die beiden Mutationen im Coil 1A der Stabdomäne die Bildung von vollständigen Keratinnetzwerken zu verhindern, indem die weiterhin entstehenden KFPs sich nicht zu Filamenten zusammenlagern können. Bezugnehmend auf das vorgeschlagene Modell in Abb. 61 findet die Nukleation der KFPs unbehelligt statt. Da die Elongation bei beiden Mutationen gestört ist, kann auch keine anschließende Integration stattfinden. Somit ist der gesamte Aufbau-Prozess gestört, es entstehen keine Filamente.

Die Auflösung der Granula findet in einer distinkten Zone statt, in der normalerweise die KFPs in das bestehende Netzwerk integrieren. Die Zellen der PK6aN171K-1-Zelllinie waren im Gegensatz zur PK6aN171del-2 Zelllinie in der Lage, kurze Filamentstücke auszubilden (Abb. 26). Die in der Zellperipherie entstandenen kleinen, rundlichen KFPs vergrößerten sich zu longitudinalen Vorläufern, welche sich durch End- zu End-Anlagerungen zu kurzen Filamentstückchen aneinander lagerten (Film 15). Die Deletion der drei Basenpaare im Coil 1 der Stabdomäne in der PK6aN171Kdel-2-Zelllinie, in welcher nur Keratingranula detektiert werden konnten (Abb. 26 A'', Abb. 27 C und Film 16), führt zu einer lateralen Verschiebung der Initiationsstelle der 1A-Helix. Somit scheint diese Initiationsstelle für die Ausbildung von longitudinalen Vorläufern und/oder deren End- zu End-Anlagerungen zu kurzen Filamentvorläufern verantwortlich zu sein, da auch Mutationen am Ende der Stabdomäne, wie sie z. B. bei EBS auftreten, ebenfalls mit der End- zu End-Anlagerungen der Keratin-Untereinheiten beim Zusammenbau der Filamente interferieren (LEE *et al.*, 1993). Die mutierte Aminosäure Asparagin ist auch in bei weiteren Erbkrankheiten, in denen andere Keratinisoformen betroffen sind, verändert (K1, K9, K10 und K17). Somit stellt diese Aminosäure ein Hot-Spot für Mutationen in den Keratingenen dar (ROTHNAGEL *et al.*, 1994).

Die Keratingranula in den PC-Mutanten ähnelten den Granula, die in der EBS-Mutante R₁₂₅C gebildet werden (WERNER *et al.*, 2004). Auch diese entstanden in der Zellperipherie, wanderten in Richtung Zellzentrum und lösten sich innerhalb einer distinkten Zone wieder auf (Abb. 21 und Film 10).

Interessanterweise polymerisieren die mutierten Polypeptide *in vitro* zu vollständigen Filamenten (HERRMANN *et al.*, 2002).

Die periphere Granulazone könnte somit eine Region definieren, hinter der in KFPs in existierende Filamente inkooptiert werden. Damit scheint eine Region im Zellkortex zu existieren, welche die Adhäsionskomplexe enthält, die wiederum mit den KFPs ko-lokalisieren. Es lässt sich ferner schließen, dass in dieser Region die Polymerisierung zu KFs erfolgen muss. Kann die Polymerisierung nicht erfolgen, wie es z. B. in den PC- und EBS-Mutanten der Fall ist, lösen sich KFPs bzw. Keratinaggregate wieder auf. oder Zum einen könnten die Granula in einem polymerisations-inkompetenten Zustand gehalten werden oder zu anderem könnten Polymerisationsfaktoren fehlen, so dass keine vollständige Polymerisation zu Filamenten erfolgen kann.

Transfizierte MCF-7-Zellen und HaCaT-Keratinocyten zeigen eine starke Zunahme des mutierten K14R₁₂₅C Proteins in der löslichen zytoskeletalen Fraktion. In Kontrollzellen hingegen ist K14 ausschließlich in der unlöslichen Zytoskelett-Fraktion vorhanden. Darüber hinaus konnten keine Typ II Keratinpartner wie z. B. K8 oder K5 in den löslichen Fraktionen detektiert werden (WERNER *et al.*, 2004). Es ist davon auszugehen, dass auch in den PC-Mutanten ein dynamisches Ungleichgewicht zwischen Keratinaggregaten und löslichen Untereinheiten herrscht. Die Anfertigung von Western-Blots mit K6a und K8/18-spezifischen Antikörpern von löslichen Überständen der Keratinfractionen sowie der Gesamtzellextrakten aller drei Zellklone könnte dies klären.

Einfluss weiterer Zytoskelett-Proteine auf die Keratingranula

Die immunzytologischen Anfärbungen von Desmoglein 2 zeigten keine Beeinträchtigung von Desmosomen in den mutierten Zelllinien (Abb. 28). Auch die FAK wies die gleiche Verteilung wie in den Mutanten wie in den Wildtyp-Zellen auf; die KFPs sowie die Keratingranula ko-lokalisieren mit der aktivierten FAK in der Zellperipherie (Abb. 47). Die Transfektion mit Zyxin-RFP-cDNA offenbarte die Bildung unveränderter Adhäsionskomplexe in beiden mutierten Zellklonen (Abb. 30). Durch Immunoblots wurde die phosphorylierte FAK sowie Paxillin in den PC-mutierten Zelllinien unverändert nachgewiesen (Abb. 29). Diese Daten deuten darauf hin, dass die Mutation im Coil 1A der Stabdome keinen Einfluss auf die Bildung von Desmosomen und von FAs hat. Auch in den EBS-mutierten MT5K14-26-Zellen ist die Bildung von Desmosomen (WERNER *et al.*) und FAs (Abb. 21) nicht beeinträchtigt.

Das Herunterregulieren des FA-Proteins Talin führte in PK6aN171K-1-Zellen zum Verlust der Keratingranula. Es wurden zum einen nur noch kurze Filamentstücke in der Zellmitte (Abb. 31 A) bzw. zum anderen nur noch das perinukleäre Restnetzwerk beobachtet (Abb. 31 B). In PK6aN171del-2-Zellen hingegen wurde nach dem Knock-Down von Talin keine Veränderung bezüglich der Verteilung der Keratingranula beobachtet (Abb. 31 C und D). Es ist möglich, dass kein Effekt beobachtet werden konnte, da diese Granula einen höheren Turnover aufweisen.

In PK6aN171K-1- und PK6a-5-Zellen war die Plectin-Verteilung normal (Abb. 43 A und B), in PK6aN171del-2-Zellen hingegen war das Netzwerk in der Peripherie in einzelnen Bruchstücken zerteilt, die mit den Keratingranula ko-lokalisieren. Auch in den EBS-mutierten MT5K14-26-Zellen ist die Verteilung von Plectin nicht beeinträchtigt, da ein intaktes Plectinnetzwerk ausgebildet wird (WERNER *et al.*, 2004). Die beobachtete Fehlverteilung von Plectin in PK6aN171Kdel-2-Zellen sollte durch Anfärbung mit weiteren Plectin-spezifischen Antikörpern überprüft werden. Des Weiteren könnte proteinbiochemisch mittels Western-Blot-Transfer eine veränderte Verteilung der löslichen und unlöslichen Plectin-Fraktionen nachgewiesen werden. Bestätigen diese Untersuchungen die gefundenen Ergebnisse, kann gefolgert werden, dass die Deletion in der 1A Helix die Interaktion mit der IF-Bindedomäne des Plectins beeinträchtigen könnte.

In PK6aN171del-2-Zellen konnte eine Ko-Lokalisierung mit der aktivierten p38-MAPK nachgewiesen werden. In den nicht-mutierten PK6a-5-Zellen hingegen wurde keine phosphorylierte p38 detektiert (Abb. 50). In Immunoblots wurde die aktivierte p38 ebenfalls in den mutierten Zelllinien nachgewiesen (nicht gezeigt).

Auch in den EBS-Keratingranula der MT5K14-26-Zellen wird die p38-MAPK rekrutiert. Des Weiteren wird K8 am Serin73, einer Bindestelle von p38, phosphoryliert. Eine Hochregulation von p38 in nicht-mutierten Zellen induziert die Granulabildung (WOLL *et al.*, 2007). Somit scheint die Phosphorylierung von Keratinen den Zusammenbau von Vorläufern zu Filamenten zu regulieren und damit die Organisation des Keratinnetzwerkes zu beeinflussen (OMARY *et al.*, 2006). Auch z. B. während der Mitose, bei Zellstress und während der Apoptose werden die KFs hyperphosphoryliert und Keratingranula induziert (RIDGE *et al.*, 2005).

Die Inhibierung der p38-MAPK führte zu einer Hemmung der Neubildung von Keratingranula in der Zellperipherie sowie zu einem Bewegungsstopp aller Keratinaggregate in beiden mutierten PC-Zellklonen (Abb. 51 A und C). Die Keratinfilamentstücke sammelten sich in den PK6aN171K-1-Zellen in einer Zone in der Zellperipherie, in der sie sich normalerweise wieder auflösten (Film 28). In den PK6aN171del-2-Zellen häuften sich die Granula am Rand der Peripherie an (Film 29). Erst nach 12 Stunden wurde eine Wiederaufnahme der Granulabewegung sowie die Entstehung der KFPs in der Zellperipherie beobachtet (Abb. 51 B' und D'). Auch in MT5K14-26-Zellen, die mutierte EBS-Granula synthetisieren, wird ein Stopp der Granulabildung und der Granulabewegung nach Zugabe von SB 202190 beobachtet (WOLL *et al.*, 2007). Somit könnte die Phosphorylierung der Keratine nicht nur eine Bedeutung für den Abbau der Filamente, sondern auch für den Zusammenbau der KFPs zu Filamenten besitzen.

Der Abbau der IFs erfolgt nach Ubiquitylierung im Proteasom (KU und OMARY, 2000). Die Inhibierung der Proteasomen durch den Inhibitor MG-132 führte zu einer Ansammlung der Keratinaggregate in der Zellperipherie der beiden mutierten PC-Zellklone, da sie nicht mehr abgebaut werden konnten (Abb. 53 sowie Film 32 und 33). Die Aggregate akkumulierten in der Zone, in der

sich die Keratingranula normalerweise wieder auflösen. In den PK6aN171K-1-Zellen häuften sich die Keratinaggregate zu größeren Filamentstücken an; in den PK6aN171del-2-Zellen häuften sich die Granula an. Die Bildung der Keratingranula war nicht beeinträchtigt.

Es ist bekannt, dass mechanische Stimuli wie Scherstress die Phosphorylierung (z. B. am Serin73 des K8) und den darauf folgenden Abbau und die Degradierung von KFs induzieren, welche mit Ubiquitin assoziiert sind (COULOMBE und OMARY, 2002). MG-132 inhibiert auch in alveolaren A549-Zellen den Abbau des Keratinnetzwerkes (JAITOVICH *et al.*, 2008). Diese Beobachtungen unterstützen die These, dass auch die mutierten Keratingranula ebenso wie die KFs im Proteasomen abgebaut werden (KU und OMARY, 2000; COULOMBE und OMARY, 2002; JAITOVICH *et al.*, 2008). Die Mutation im Coil 1A hat folglich keinen Effekt auf den proteasomen-abhängigen Abbau der Keratine. Dementsprechend scheint die durch die Mutation verursachte Hyperphosphorylierung durch p38 die Ubiquitylierung und damit den Abbau der Granula im Kortex zu induzieren.

Zusammenfassend haben somit die Punktmutation und die Deletion im Coil 1A der Stabdomäne des K6a einen etwas unterschiedlichen Effekt auf die Bildung und Dynamik der KFs. Die Deletion der Basenpaare AAC am Asparagin N171 scheint schwerwiegendere Konsequenzen zu tragen als die Punktmutation von Asparagin zu Lysin. Die rundlichen Aggregate wachsen nicht zu longitudinalen Vorläufern, so dass die Deletion wohl den Zusammenbau zu den länglichen Filamentstücken beeinflusst. Auch weitere Zytoskelett-Proteine werden unterschiedlich durch die beiden Mutationen beeinflusst. In den PK6aN171K-1-Zellen wart die Verteilung des Plaktin-Proteins Plectin unverändert, in den PK6aN171del-2-Zellen hingegen war das Netzwerk nicht mehr filamentös und in kleine Bruchstücken disintegriert, welche mit den Keratingranula ko-lokalisieren. Weiterhin waren in PK6aN171del-2-Zellen nach dem Knock-Down von Talin kein Keratingranula mehr vorhanden, im Gegensatz dazu verlief die Granula-Bildung in den PK6aN171del-2-Zellen ungestört.

Die Mutation von Asparagin zu Lysin im Coil 1A bedeutet eine Zunahme an positiver Ladung in der negativ geladenen Stabdomäne, da Asparagin neutral und Lysin positiv geladen ist. Diese Ladungsverschiebung könnte zum einen eine Veränderung in der Ausbildung des ersten Coils haben, zum anderen die Interaktion mit der positiv geladenen Kopfdomäne beeinflussen, so dass der Zusammenbau der Filamente gestört wird. Wie essentiell die Interaktionen der Kopf- und Stabdomäne sind wird klar, wenn man bedenkt, dass kopflose Vimentin-Mutanten nur Tetramere und keine Filamente *in vitro* ausbilden (KREPLAK *et al.*, 2004; MUCKE *et al.*, 2004). Beide mutierten Keratine sind wahrscheinlich durch p38 hyperphosphoryliert. Wöll und Kollegen gehen davon aus, dass durch die Phosphorylierung entstehende Zunahme an negativer Ladung die Interaktionen der Kopfdomäne mit der negativ-geladenen Stabdomäne durch Abstoßung verhindert (WOLL *et al.*, 2007). Damit würde die Kopfdomäne in einer offenen Konformation gehalten werden, so dass durch die fehlenden Interaktionsmöglichkeiten kein weiterer Zusammenbau der hyperphosphorylierten Granula zu Filamenten erfolgen kann. Diese Konfiguration könnte ebenfalls Teil des

Öffnungsvorgangs während dem Abbau der Filamente zu Granula sein. Außerdem könnten diese Mutationen durch die veränderten Konformation der Stabdomäne die Interaktionen mit noch unbekanntem Polymerisationsfaktoren inhibieren und somit den vollständigen Zusammenbau der Filamente verhindern.

Zusammenfassend verdeutlichen die gewonnenen Daten die Bedeutung intakter KFs für die Hautintegrität. Schon eine einzige Punktmutation ist in der Lage, den Zusammenbau von IF-Filamenten dahingehend zu verändern, dass kein vollständiges Keratinnetzwerk mehr ausgebildet werden kann. Die Auswirkungen, welche sich in Symptomen wie z. B. Hyperkeratosen, Blasenbildung oder in Hautablösung manifestieren, heben die Funktionalität der IFs hervor.

Die drei hergestellten PK6a-Zellklone könnten als Modellsystem für weitere Fragestellungen herangezogen werden. Beispielsweise könnten EM-Untersuchungen durchgeführt werden, die Ultrastrukturen bzw. die Zusammensetzung der verschiedenartigen Filamentformen (rundliche Aggregate und kurze längliche Filamentstücke) in einem Zellsystem aufklären würden. Darüber hinaus könnte die vorgeschlagene Interaktion zwischen FAK, p38 und KFs untersucht werden (siehe oben): Alle drei PK6a-Zelllinien könnten z. B. einem p38-Knock-Down durch spezifische shRNA-Konstrukte unterzogen und anschließend mittels Lebendzellmikroskopie nach Effekten gesucht werden.

Dieses Modellsystem eignet sich weiterhin hervorragend zur Etablierung gentherapeutischer Ansätze. HICKERSON *et al.* (2006) zeigten bereits, dass mit Hilfe von siRNAs, welche gegen die Mutationsstelle von K6a gerichtet sind, die Expression der mutierten mRNAs inhibiert wird. Auch die Inhibierung von Talin durch shRNA führte zum Verschwinden der Keratingranula in PK6aN171K-1-Zellen. Um wieder intakte Filamente herzustellen, könnte ein die Zytoskelett-Proteine sowie Phosphatasen umfassender siRNA-*screen* durchgeführt werden. Mit einem weiteren *screen* in nicht-mutierten Zellen könnte versucht werden, den mutierten Phänotyp herzustellen. Hier leisten Zellkulturmodelle einen wichtigen Beitrag zur Etablierung von Gentherapien, die zur erfolgreichen Behandlung von Erbkrankheiten führen können.

6. Literaturverzeichnis

- ABERCROMBIE, M., Dunn, G.A., 1975. Adhesions of fibroblasts to substratum during contact inhibition observed by interference reflection microscopy. *Exp Cell Res* 92, 57-62.
- ALBERS, K., Fuchs, E., 1987. The expression of mutant epidermal keratin cDNAs transfected in simple epithelial and squamous cell carcinoma lines. *J Cell Biol* 105, 791-806.
- ALEXANDER, J.J., Bey, E.M., Geddes, E.W., Lecatsas, G., 1976. Establishment of a continuously growing cell line from primary carcinoma of the liver. *South African Medical Journal* 50, 2124-2128.
- ALMEIDA, E.A., Ilic, D., Han, Q., Hauck, C.R., Jin, F., Kawakatsu, H., Schlaepfer, D.D., Damsky, C.H., 2000. Matrix survival signaling: from fibronectin via focal adhesion kinase to c-Jun NH(2)-terminal kinase. *J Cell Biol* 149, 741-754.
- AMANN, K.J., Pollard, T.D., 2001. The Arp2/3 complex nucleates actin filament branches from the sides of pre-existing filaments. *Nat Cell Biol* 3, 306-310.
- AUSMEES, N., Kuhn, J.R., Jacobs-Wagner, C., 2003. The bacterial cytoskeleton: an intermediate filament-like function in cell shape. *Cell* 115, 705-713.
- BAR, H., Strelkov, S.V., Sjoberg, G., Aebi, U., Herrmann, H., 2004. The biology of desmin filaments: how do mutations affect their structure, assembly, and organisation? *J Struct Biol* 148, 137-152.
- BHATT, A., Kaverina, I., Otey, C., Huttenlocher, A., 2002. Regulation of focal complex composition and disassembly by the calcium-dependent protease calpain. *J Cell Sci* 115, 3415-3425.
- BENCE, N.F., Sampat, R.M., Kopito, R.R., 2001. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 292, 1552-1555.
- BERSHADSKY, A.D., Balaban, N.Q., Geiger, B., 2003. Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 677-695.
- BOLOGNA, M., Allen, R., Dulbecco, R., 1986. Organization of cytokeratin bundles by desmosomes in rat mammary cells. *J Cell Biol* 102, 560-567.
- BONNE, G., Di Barletta, M.R., Varnous, S., Becane, H.M., Hammouda, E.H., Merlini, L., Muntoni, F., Greenberg, C.R., Gary, F., Urtizbera, 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.
- BOWDEN, P.E., Haley, J.L., Kansky, A., Rothnagel, J.A., Jones, D.O., Turner, R.J., 1995. Mutation of a type II keratin gene (K6a) in pachyonychia congenita. *Nat Genet* 10, 363-365.
- BURKHARD, P., Stetefeld, J., Strelkov, S.V., 2001. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol* 11, 82-88.
- CAMPBELL, I.D., 2008. Studies of focal adhesion assembly. *Biochem Soc Trans* 36, 263-266.
- CAMPBELL, R.E., Tour, O., Palmer, A.E., Steinbach, P.A., Baird, G.S., Zacharias, D.A., Tsien, R.Y., 2002. A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7877-7882.

- CANDI, E., Tarcsa, E., Digiovanna, J.J., Compton, J.G., Elias, P.M., Marekov, L.N., Steinert, P.M., 1998. A highly conserved lysine residue on the head domain of type II keratins is essential for the attachment of keratin intermediate filaments to the cornified cell envelope through isopeptide crosslinking by transglutaminases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2067-2072.
- CAPETANAKI, Y., Bloch, R.J., Kouloumenta, A., Mavroidis, M., Psarras, S., 2007. Muscle intermediate filaments and their links to membranes and membranous organelles. *Exp Cell Res* 313, 2063-2076.
- CARRAGHER, N.O., Frame, M.C., 2004. Focal adhesion and actin dynamics: a place where kinases and proteases meet to promote invasion. *Trends Cell Biol* 14, 241-249.
- CAULIN, C., Salvesen, G.S., Oshima, R.G., 1997. Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol* 138, 1379-1394.
- CELIS, J.E., Larsen, P.M., Fey, S.J., Celis, A., 1983. Phosphorylation of keratin and vimentin polypeptides in normal and transformed mitotic human epithelial amnion cells: behavior of keratin and vimentin filaments during mitosis. *J Cell Biol* 97, 1429-1434.
- CELIS, J.E., Small, J.V., Larsen, P.M., Fey, S.J., De Mey, J., Celis, A., 1984. Intermediate filaments in monkey kidney TC7 cells: focal centers and interrelationship with other cytoskeletal systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 1117-1121.
- CHANG, L., Shav-Tal, Y., Trcek, T., Singer, R.H., Goldman, R.D., 2006. Assembling an intermediate filament network by dynamic cotranslation. *J Cell Biol* 172, 747-758.
- CHEN, Z.M., Wang, H.L., 2004. Alteration of cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression profile is uniquely associated with tumorigenesis of primary adenocarcinoma of the small intestine. *Am J Surg Pathol* 28, 1352-1359.
- CHOU, C.F., Omary, M.B., 1991. Phorbol acetate enhances the phosphorylation of cytokeratins 8 and 18 in human colonic epithelial cells. *FEBS Lett* 282, 200-204.
- CHOU, C.F., Smith, A.J., Omary, M.B., 1992. Characterization and dynamics of O-linked glycosylation of human cytokeratin 8 and 18. *Journal of Biological Chemistry* 267, 3901-3906.
- CHOU, C.F., Riopel, C.L., Rott, L.S., Omary, M.B., 1993. A significant soluble keratin fraction in 'simple' epithelial cells. Lack of an apparent phosphorylation and glycosylation role in keratin solubility. *J Cell Sci* 105 (Pt 2), 433-444.
- CHOU, Y.H., Flitney, F.W., Chang, L., Mendez, M., Grin, B., Goldman, R.D., 2007. The motility and dynamic properties of intermediate filaments and their constituent proteins. *Exp Cell Res* 313, 2236-2243.
- COULOMBE, P.A., Bousquet, O., Ma, L., Yamada, S., Wirtz, D., 2000. The 'ins' and 'outs' of intermediate filament organization. *Trends Cell Biol* 10, 420-428.
- COULOMBE, P.A., Ma, L., Yamada, S., Wawersik, M., 2001. Intermediate filaments at a glance. *J Cell Sci* 114, 4345-4347.

- COULOMBE, P.A., Omary, M.B., 2002. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol* 14, 110-122.
- COULOMBE, P.A., Wong, P., 2004. Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds. *Nat Cell Biol* 6, 699-706.
- COLLETT, M.S., Purchio, A.F., Erikson, R.L., 1980. Avian sarcoma virus-transforming protein, pp60src shows protein kinase activity specific for tyrosine. *Nature* 285, 167-169.
- CORDEN, L.D., McLean, W.H., 1996. Human keratin diseases: hereditary fragility of specific epithelial tissues. *Exp Dermatol* 5, 297-307.
- COWIN, P., Kapprell, H.P., Franke, W.W., 1985. The complement of desmosomal plaque proteins in different cell types. *J Cell Biol* 101, 1442-1454.
- DALE, B.A., Holbrook, K.A., Steinert, P.M., 1978. Assembly of stratum corneum basic protein and keratin filaments in macrofibrils. *Nature* 276, 729-731.
- DE BERKER, D., Wojnarowska, F., Sviland, L., Westgate, G.E., Dawber, R.P., Leigh, I.M., 2000. Keratin expression in the normal nail unit: markers of regional differentiation. *Br J Dermatol* 142, 89-96.
- DENK, H., Stumtner, C., Zatloukal, K., 2000. Mallory bodies revisited. *J Hepatol* 32, 689-702.
- ECKERT, B.S., Daley, R.A., Parysek, L.M., 1982. Assembly of keratin onto PtK1 cytoskeletons: evidence for an intermediate filament organizing center. *J Cell Biol* 92, 575-578.
- ERBER, A., Riemer, D., Bovenschulte, M., Weber, K., 1998. Molecular phylogeny of metazoan intermediate filament proteins. *J Mol Evol* 47, 751-762.
- ERIKSSON, J.E., He, T., Trejo-Skalli, A.V., Harmala-Brasken, A.S., Hellman, J., Chou, Y.H., Goldman, R.D., 2004. Specific in vivo phosphorylation sites determine the assembly dynamics of vimentin intermediate filaments. *J Cell Sci* 117, 919-932.
- EVANS, L.L., Bridgman, P.C., 1995. Particles move along actin filament bundles in nerve growth cones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10954-10958.
- EZRATTY, E.J., Partridge, M.A., Gundersen, G.G., 2005. Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. *Nat Cell Biol* 7, 581-590.
- FRANKE, W.W., Schmid, E., Grund, C., Geiger, B., 1982. Intermediate filament proteins in nonfilamentous structures: transient disintegration and inclusion of subunit proteins in granular aggregates. *Cell* 30, 103-113.
- FIALKA, I., Schwarz, H., Reichmann, E., Oft, M., Busslinger, M., Beug, H., 1996. The estrogen-dependent c-JunER protein causes a reversible loss of mammary epithelial cell polarity involving a destabilization of adherens junctions. *Journal of Cell Biology* 132, 1115-1132.
- FOISNER, R., Feldman, B., Sander, L., Seifert, G., Artlieb, U., Wiche, G., 1994. A panel of monoclonal antibodies to rat plectin: distinction by epitope mapping and immunoreactivity with different tissues and cell lines. *Acta Histochem* 96, 421-438.

- FUCHS, E., Weber, K., 1994. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem* 63, 345-382.
- FUCHS, E., 1996. The cytoskeleton and disease: genetic disorders of intermediate filaments. *Annu Rev Genet* 30, 197-231.
- FUCHS, E., Cleveland, D.W., 1998. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* 279, 514-519.
- FUCHS, P., Zorer, M., Rezniczek, G.A., Spazierer, D., Oehler, S., Castanon, M.J., Hauptmann, R., Wiche, G., 1999. Unusual 5' transcript complexity of plectin isoforms: novel tissue-specific exons modulate actin binding activity. *Hum Mol Genet* 8, 2461-2472.
- FURUTA, Y., Ilic, D., Kanazawa, S., Takeda, N., Yamamoto, T., Aizawa, S., 1995. Mesodermal defect in late phase of gastrulation by a targeted mutation of focal adhesion kinase, FAK. *Oncogene* 11, 1989-1995.
- GABARRA-NIECKO, V., Keely, P.J., Schaller, M.D., 2002. Characterization of an activated mutant of focal adhesion kinase: 'SuperFAK'. *Biochem J* 365, 591-603.
- GABARRA-NIECKO, V., Schaller, M.D., Dunty, J.M., 2003. FAK regulates biological processes important for the pathogenesis of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 22, 359-374.
- GARD, D.L., Cha, B.J., King, E., 1997. The organization and animal-vegetal asymmetry of cytokeratin filaments in stage VI *Xenopus* oocytes is dependent upon F-actin and microtubules. *Developmental Biology* 184, 95-114.
- GARD, D.L., Klymkowsky, M.W., 1998. Intermediate filament organization during oogenesis and early development in the clawed frog, *Xenopus laevis*. *Sub-Cellular Biochemistry* 31, 35-70.
- GEIGER, B., Bershadsky, A., Pankov, R., Yamada, K.M., 2001. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 793-805.
- GIBB, B.J., Robertson, J., Miller, C.C., 1996. Assembly properties of neurofilament light chain Ser55 mutants in transfected mammalian cells. *J Neurochem* 66, 1306-1311.
- GILBERT, S., Loranger, A., Daigle, N., Marceau, N., 2001. Simple epithelium keratins 8 and 18 provide resistance to Fas-mediated apoptosis. The protection occurs through a receptor-targeting modulation. *J Cell Biol* 154, 763-773.
- GIRAULT, J.A., Labesse, G., Mornon, J.P., Callebaut, I., 1999. The N-termini of FAK and JAKs contain divergent band 4.1 domains. *Trends Biochem Sci* 24, 54-57.
- GODSEL, L.M., Hsieh, S.N., Amargo, E.V., Bass, A.E., Pascoe-McGillicuddy, L.T., Huen, A.C., Thorne, M.E., Gaudry, C.A., Park, J.K., Myung, K., Goldman, R.D., Chew, T.L., Green, K.J., 2005. Desmoplakin assembly dynamics in four dimensions: multiple phases differentially regulated by intermediate filaments and actin. *J Cell Biol* 171, 1045-1059.
- GODSEL, L.M., Hobbs, R.P., Green, K.J., 2008. Intermediate filament assembly: dynamics to disease. *Trends Cell Biol* 18, 28-37.

- GOHARA, R., Tang, D., Inada, H., Inagaki, M., Takasaki, Y., Ando, S., 2001. Phosphorylation of vimentin head domain inhibits interaction with the carboxyl-terminal end of alpha-helical rod domain studied by surface plasmon resonance measurements. *FEBS Letters* 489, 182-186.
- GOLDFARB, L.G., Vicart, P., Goebel, H.H., Dalakas, M.C., 2004. Desmin myopathy. *Brain* 127, 723-734.
- GOLDMAN, R.D., Khuon, S., Chou, Y.H., Opal, P., Steinert, P.M., 1996. The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *J Cell Biol* 134, 971-983.
- GONZALES, M., Weksler, B., Tsuruta, D., Goldman, R.D., Yoon, K.J., Hopkinson, S.B., Flitney, F.W., Jones, J.C., 2001. Structure and function of a vimentin-associated matrix adhesion in endothelial cells. *Mol Biol Cell* 12, 85-100.
- GREEN, K.J., Gaudry, C.A., 2000. Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 208-216.
- GREEN, K.J., Simpson, C.L., 2007. Desmosomes: new perspectives on a classic. *J Invest Dermatol* 127, 2499-2515.
- GRIFFITH, L.S., Schmitz, B., 1999. O-linked N-acetylglucosamine levels in cerebellar neurons respond reciprocally to perturbations of phosphorylation. *Eur J Biochem* 262, 824-831.
- HAIDLE, A.M., Myers, A.G., 2004. An enantioselective, modular, and general route to the cytochalasins: synthesis of L-696,474 and cytochalasin B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12048-12053.
- HANAHAH, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- HATZFELD, M., Burba, M., 1994. Function of type I and type II keratin head domains: their role in dimer, tetramer and filament formation. *J Cell Sci* 107 (Pt 7), 1959-1972.
- HEID, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M., 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6, 986-994.
- HELFAND, B.T., Mikami, A., Vallee, R.B., Goldman, R.D., 2002. A requirement for cytoplasmic dynein and dynactin in intermediate filament network assembly and organization. *J Cell Biol* 157, 795-806.
- HELFAND, B.T., Loomis, P., Yoon, M., Goldman, R.D., 2003a. Rapid transport of neural intermediate filament protein. *J Cell Sci* 116, 2345-2359.
- HELFAND, B.T., Mendez, M.G., Pugh, J., Delsert, C., Goldman, R.D., 2003b. A role for intermediate filaments in determining and maintaining the shape of nerve cells. *Mol Biol Cell* 14, 5069-5081.
- HELFAND, B.T., Chang, L., Goldman, R.D., 2004. Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture. *J Cell Sci* 117, 133-141.
- HERRMANN, H., Haner, M., Brettel, M., Muller, S.A., Goldie, K.N., Fedtke, B., Lustig, A., Franke, W.W., Aebi, U., 1996. Structure and assembly properties of the intermediate filament protein vimentin: the role of its head, rod and tail domains. *J Mol Biol* 264, 933-953.

- HERRMANN, H., Aebi, U., 1998. Intermediate filament assembly: fibrillogenesis is driven by decisive dimer-dimer interactions. *Curr Opin Struct Biol* 8, 177-185.
- HERRMANN, H., Haner, M., Brettel, M., Ku, N.O., Aebi, U., 1999. Characterization of distinct early assembly units of different intermediate filament proteins. *J Mol Biol* 286, 1403-1420.
- HERRMANN, H., Aebi, U., 2000. Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr Opin Cell Biol* 12, 79-90.
- HERRMANN, H., Wedig, T., Porter, R.M., Lane, E.B., Aebi, U., 2002. Characterization of early assembly intermediates of recombinant human keratins. *J Struct Biol* 137, 82-96.
- HERRMANN, H., Hesse, M., Reichenzeller, M., Aebi, U., Magin, T.M., 2003. Functional complexity of intermediate filament cytoskeletons: from structure to assembly to gene ablation. *Int Rev Cytol* 223, 83-175.
- HERRMANN, H., Aebi, U., 2004. Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. *Annu Rev Biochem* 73, 749-789.
- HERRMANN, H., Bar, H., Kreplak, L., Strelkov, S.V., Aebi, U., 2007. Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 562-573.
- HESSE, M., Zimek, A., Weber, K., Magin, T.M., 2004. Comprehensive analysis of keratin gene clusters in humans and rodents. *Eur J Cell Biol* 83, 19-26.
- HICKERSON, R.P., Smith, F.J., McLean, W.H., Landthaler, M., Leube, R.E., Kaspar, R.L., 2006. siRNA-mediated selective inhibition of mutant keratin mRNAs responsible for the skin disorder pachyonychia congenita. *Ann N Y Acad Sci* 1082, 56-61.
- HILDEBRAND, J.D., Schaller, M.D., Parsons, J.T., 1993. Identification of sequences required for the efficient localization of the focal adhesion kinase, pp125FAK, to cellular focal adhesions. *J Cell Biol* 123, 993-1005.
- HUANG, C., Jacobson, K., Schaller, M.D., 2004. MAP kinases and cell migration. *Journal of Cell Science* 117, 4619-4628.
- HUNGER-GLASER, I., Salazar, E.P., Sinnott-Smith, J., Rozengurt, E., 2003. Bombesin, lysophosphatidic acid, and epidermal growth factor rapidly stimulate focal adhesion kinase phosphorylation at Ser-910: requirement for ERK activation. *J Biol Chem* 278, 22631-22643.
- ILIC, D., Furuta, Y., Kanazawa, S., Takeda, N., Sobue, K., Nakatsuji, N., Nomura, S., Fujimoto, J., Okada, M., Yamamoto, T., 1995. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature* 377, 539-544.
- INADA, H., Izawa, I., Nishizawa, M., Fujita, E., Kiyono, T., Takahashi, T., Momoi, T., Inagaki, M., 2001. Keratin attenuates tumor necrosis factor-induced cytotoxicity through association with TRADD. *J Cell Biol* 155, 415-426.
- INAGAKI, M., Gonda, Y., Nishizawa, K., Kitamura, S., Sato, C., Ando, S., Tanabe, K., Kikuchi, K., Tsuiki, S., Nishi, Y., 1990. Phosphorylation sites linked to glial filament disassembly in vitro locate in a non-alpha-helical head domain. *Journal of Biological Chemistry* 265, 4722-4729.

- IRVINE, A.D., McLean, W.H., 1999. Human keratin diseases: the increasing spectrum of disease and subtlety of the phenotype-genotype correlation. *Br J Dermatol* 140, 815-828.
- IZAWA, I., Nishizawa, M., Ohtakara, K., Ohtsuka, K., Inada, H., Inagaki, M., 2000. Identification of Mrj, a DnaJ/Hsp40 family protein, as a keratin 8/18 filament regulatory protein. *Journal of Biological Chemistry* 275, 34521-34527.
- IZAWA, I., Inagaki, M., 2006. Regulatory mechanisms and functions of intermediate filaments: a study using site- and phosphorylation state-specific antibodies. *Cancer Sci* 97, 167-174.
- JAITOVICH, A., Mehta, S., Na, N., Ciechanover, A., Goldman, R.D., Ridge, K.M., 2008. Ubiquitin-proteasome-mediated degradation of keratin intermediate filaments in mechanically stimulated A549 cells. *J Biol Chem* 283, 25348-25355.
- JANMEY, P.A., Shah, J.V., Janssen, K.P., Schliwa, M., 1998. Viscoelasticity of intermediate filament networks. *Subcell Biochem* 31, 381-397.
- KARABINOS, A., Schmidt, H., Harborth, J., Schnabel, R., Weber, K., 2001. Essential roles for four cytoplasmic intermediate filament proteins in *Caenorhabditis elegans* development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7863-7868.
- KARTENBECK, J., Franke, W.W., Moser, J.G., Stoffels, U., 1983. Specific attachment of desmin filaments to desmosomal plaques in cardiac myocytes. *Embo J* 2, 735-742.
- KARTENBECK, J., Schwechheimer, K., Moll, R., Franke, W.W., 1984. Attachment of vimentin filaments to desmosomal plaques in human meningioma cells and arachnoidal tissue. *J Cell Biol* 98, 1072-1081.
- KAVERINA, I., Rottner, K., Small, J.V., 1998. Targeting, capture, and stabilization of microtubules at early focal adhesions. *J Cell Biol* 142, 181-190.
- KAVERINA, I., Krylyshkina, O., Small, J.V., 1999. Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. *J Cell Biol* 146, 1033-1044.
- KAVERINA, I., Krylyshkina, O., Small, J.V., 1999. Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. *J Cell Biol* 146, 1033-1044.
- KEMLER, R., Brulet, P., Schnebelen, M.T., Gaillard, J., Jacob, F., 1981. Reactivity of monoclonal antibodies against intermediate filament proteins during embryonic development. *J Embryol Exp Morphol* 64, 45-60.
- KIM, S., Wong, P., Coulombe, P.A., 2006. A keratin cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial cell growth. *Nature* 441, 362-365.
- KIM, S., Coulombe, P.A., 2007. Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. *Genes Dev* 21, 1581-1597.
- KIRSCHNER, M., Mitchison, T., 1986. Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell* 45, 329-342.
- KITAJIMA, Y., Inoue, S., Yaoita, H., 1989. Abnormal organization of keratin intermediate filaments in cultured keratinocytes of epidermolysis bullosa simplex. *Arch Dermatol Res* 281, 5-10.

- KNAPP, L.W., O'Guin, W.M., Sawyer, R.H., 1983a. Rearrangement of the keratin cytoskeleton after combined treatment with microtubule and microfilament inhibitors. *J Cell Biol* 97, 1788-1794.
- KNAPP, L.W., O'Guin, W.M., Sawyer, R.H., 1983b. Drug-induced alterations of cytokeratin organization in cultured epithelial cells. *Science* 219, 501-503.
- KOTTKE, M.D., Delva, E., Kowalczyk, A.P., 2006. The desmosome: cell science lessons from human diseases. *J Cell Sci* 119, 797-806.
- KREPLAK, L., Aebi, U., Herrmann, H., 2004. Molecular mechanisms underlying the assembly of intermediate filaments. *Experimental Cell Research* 301, 77-83.
- KREPLAK, L., Fudge, D., 2007. Biomechanical properties of intermediate filaments: from tissues to single filaments and back. *Bioessays* 29, 26-35.
- KU, N.O., Omary, M.B., 1995. Identification and mutational analysis of the glycosylation sites of human keratin 18. *J Biol Chem* 270, 11820-11827.
- KU, N.O., Liao, J., Omary, M.B., 1997. Apoptosis generates stable fragments of human type I keratins. *J Biol Chem* 272, 33197-33203.
- KU, N.O., Liao, J., Omary, M.B., 1998a. Phosphorylation of human keratin 18 serine 33 regulates binding to 14-3-3 proteins. *Embo J* 17, 1892-1906.
- KU, N.O., Michie, S.A., Soetikno, R.M., Resurreccion, E.Z., Broome, R.L., Omary, M.B., 1998b. Mutation of a major keratin phosphorylation site predisposes to hepatotoxic injury in transgenic mice. *J Cell Biol* 143, 2023-2032.
- KU, N.O., Omary, M.B., 2000. Keratins turn over by ubiquitination in a phosphorylation-modulated fashion. *J Cell Biol* 149, 547-552.
- KU, N.O., Omary, M.B., 2001. Effect of mutation and phosphorylation of type I keratins on their caspase-mediated degradation. *J Biol Chem* 276, 26792-26798.
- KU, N.O., Omary, M.B., 2006. A disease- and phosphorylation-related nonmechanical function for keratin 8. *J Cell Biol* 174, 115-125.
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- LAI, F.P., Szczodrak, M., Block, J., Faix, J., Breitsprecher, D., Mannherz, H.G., Stradal, T.E., Dunn, G.A., Small, J.V., Rottner, K., 2008. Arp2/3 complex interactions and actin network turnover in lamellipodia. *Embo J* 27, 982-992.
- LANE, E.B., Goodman, S.L., Trejdosiewicz, L.K., 1982. Disruption of the keratin filament network during epithelial cell division. *Embo J* 1, 1365-1372.
- LEACHMAN, S.A., Kaspar, R.L., Fleckman, P., Florell, S.R., Smith, F.J., McLean, W.H., Lunny, D.P., Milstone, L.M., van Steensel, M.A., Munro, C.S., O'Toole, E.A., Celebi, J.T., Kansky, A., Lane, E.B., 2005. Clinical and pathological features of pachyonychia congenita. *J Investig Dermatol Symp Proc* 10, 3-17.

- LEE, S.C., Kim, I.G., Marekov, L.N., O'Keefe, E.J., Parry, D.A., Steinert, P.M., 1993. The structure of human trichohyalin. Potential multiple roles as a functional EF-hand-like calcium-binding protein, a cornified cell envelope precursor, and an intermediate filament-associated (cross-linking) protein. *Journal of Biological Chemistry* 268, 12164-12176.
- LEIBOVITZ, A., McCombs, W.M., 3rd, Johnston, D., McCoy, C.E., Stinson, J.C., 1973. New human cancer cell culture lines. I. SW-13, small-cell carcinoma of the adrenal cortex. *Journal of the National Cancer Institute* 51, 691-697.
- LI, R., Messing, A., Goldman, J.E., Brenner, M., 2002. GFAP mutations in Alexander disease. *Int J Dev Neurosci* 20, 259-268.
- LIN, C.M., Hamel, E., 1981. Effects of inhibitors of tubulin polymerization on GTP hydrolysis. *J Biol Chem* 256, 9242-9245.
- LIAO, J., Lowthert, L.A., Ghorri, N., Omary, M.B., 1995a. The 70-kDa heat shock proteins associate with glandular intermediate filaments in an ATP-dependent manner. *J Biol Chem* 270, 915-922.
- LIAO, J., Lowthert, L.A., Ku, N.O., Fernandez, R., Omary, M.B., 1995b. Dynamics of human keratin 18 phosphorylation: polarized distribution of phosphorylated keratins in simple epithelial tissues. *J Cell Biol* 131, 1291-1301.
- LIAO, J., Omary, M.B., 1996. 14-3-3 proteins associate with phosphorylated simple epithelial keratins during cell cycle progression and act as a solubility cofactor. *J Cell Biol* 133, 345-357.
- LIAO, J., Ku, N.O., Omary, M.B., 1997. Stress, apoptosis, and mitosis induce phosphorylation of human keratin 8 at Ser-73 in tissues and cultured cells. *J Biol Chem* 272, 17565-17573.
- LIU, C.G., Maercker, C., Castanon, M.J., Hauptmann, R., Wiche, G., 1996. Human plectin: organization of the gene, sequence analysis, and chromosome localization (8q24). *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4278-4283.
- LODISH H., Baltimore D., Berk A., Zipursky S., Matsudaira P. und J. Darnell, *Molekulare Zellbiologie*, 2. Auflage (1996).
- LONG, H.A., Boczonadi, V., McInroy, L., Goldberg, M., Maatta, A., 2006. Periplakin-dependent re-organisation of keratin cytoskeleton and loss of collective migration in keratin-8-downregulated epithelial sheets. *J Cell Sci* 119, 5147-5159.
- LOUVARD, D., 1996. [Polarity of epithelial cells. Role of the actin microfilament system]. *Nephrologie* 17, 351-357.
- LU, H., Hesse, M., Peters, B., Magin, T.M., 2005. Type II keratins precede type I keratins during early embryonic development. *Eur J Cell Biol* 84, 709-718.
- LUDUENA, R.F., Roach, M.C., 1991. Tubulin sulfhydryl groups as probes and targets for antimitotic and antimicrotubule agents. *Pharmacol Ther* 49, 133-152.
- MAGIN, T.M., Bader, B.L., Freudenmann, M., Franke, W.W., 1990. De novo formation of cytokeratin filaments in calf lens cells and cytoplasts after transfection with cDNAs or microinjection with mRNAs encoding human cytokeratins. *Eur J Cell Biol* 53, 333-348.

- MCLEAN, W.H., Rugg, E.L., Lunny, D.P., Morley, S.M., Lane, E.B., Swensson, O., Dopping-Hepenstal, P.J., Griffiths, W.A., Eady, R.A., Higgins, C., et al., 1995. Keratin 16 and keratin 17 mutations cause pachyonychia congenita. *Nat Genet* 9, 273-278.
- MCLEAN, W.H., Irvine, A.D., 2007. Disorders of keratinisation: from rare to common genetic diseases of skin and other epithelial tissues. *Ulster Med J* 76, 72-82.
- MILLER, R.K., Vikstrom, K., Goldman, R.D., 1991. Keratin incorporation into intermediate filament networks is a rapid process. *J Cell Biol* 113, 843-855.
- MILLER, R.K., Khuon, S., Goldman, R.D., 1993. Dynamics of keratin assembly: exogenous type I keratin rapidly associates with type II keratin in vivo. *J Cell Biol* 122, 123-135.
- MITRA, S.K., Hanson, D.A., Schlaepfer, D.D., 2005. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 56-68.
- MOLL, R., Franke, W.W., Schiller, D.L., Geiger, B., Krepler, R., 1982. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31, 11-24.
- MOUNKES, L., Kozlov, S., Burke, B., Stewart, C.L., 2003. The laminopathies: nuclear structure meets disease. *Curr Opin Genet Dev* 13, 223-230.
- MOUNKES, L.C., Stewart, C.L., 2004. Aging and nuclear organization: lamins and progeria. *Curr Opin Cell Biol* 16, 322-327.
- MUCKE, N., Wedig, T., Burer, A., Marekov, L.N., Steinert, P.M., Langowski, J., Aebi, U., Herrmann, H., 2004. Molecular and biophysical characterization of assembly-starter units of human vimentin. *J Mol Biol* 340, 97-114.
- OLIFERENKO, S., Kaverina, I., Small, J.V., Huber, L.A., 2000. Hyaluronic acid (HA) binding to CD44 activates Rac1 and induces lamellipodia outgrowth. *J Cell Biol* 148, 1159-1164.
- OMARY, M.B., Ku, N.O., 1997. Intermediate filament proteins of the liver: emerging disease association and functions. *Hepatology* 25, 1043-1048.
- OMARY, M.B., Ku, N.O., Liao, J., Price, D., 1998. Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro. *Subcell Biochem* 31, 105-140.
- OMARY, M.B., Ku, N.O., Toivola, D.M., 2002. Keratins: guardians of the liver. *Hepatology* 35, 251-257.
- OMARY, M.B., Coulombe, P.A., McLean, W.H., 2004. Intermediate filament proteins and their associated diseases. *N Engl J Med* 351, 2087-2100.
- OMARY, M.B., Ku, N.O., Tao, G.Z., Toivola, D.M., Liao, J., 2006. 'Heads and tails' of intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights. *Trends Biochem Sci*.
- ORNELLES, D.A., Fey, E.G., Penman, S., 1986. Cytochalasin releases mRNA from the cytoskeletal framework and inhibits protein synthesis. *Mol Cell Biol* 6, 1650-1662.
- ORIOLO, A.S., Wald, F.A., Ramsauer, V.P., Salas, P.J., 2007. Intermediate filaments: a role in epithelial polarity. *Exp Cell Res* 313, 2255-2264.

- OSMANAGIC-MYERS, S., Gregor, M., Walko, G., Burgstaller, G., Reipert, S., Wiche, G., 2006. Plectin-controlled keratin cytoarchitecture affects MAP kinases involved in cellular stress response and migration. *J Cell Biol* 174, 557-568.
- OWENS, D.W., Lane, E.B., 2003. The quest for the function of simple epithelial keratins. *Bioessays* 25, 748-758.
- 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.
- PALADINI, R.D., Takahashi, K., Bravo, N.S., Coulombe, P.A., 1996. Onset of re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining a potential role for keratin 16. *J Cell Biol* 132, 381-397.
- PALLARI, H.M., Eriksson, J.E., 2006. Intermediate filaments as signaling platforms. *Sci STKE* 2006, pe53.
- PARAMIO, J.M., Casanova, M.L., Segrelles, C., Mitnacht, S., Lane, E.B., Jorcano, J.L., 1999. Modulation of cell proliferation by cytokeratins K10 and K16. *Mol Cell Biol* 19, 3086-3094.
- PARAMIO, J.M., Jorcano, J.L., 2001. Transient transfections and heterokaryons as tools for the analysis of keratin IF dynamics. *Methods Mol Biol* 161, 189-197.
- PARAMIO, J.M., Jorcano, J.L., 2002. Beyond structure: do intermediate filaments modulate cell signalling? *Bioessays* 24, 836-844.
- PARRY, D.A., Steinert, P.M., 1999. Intermediate filaments: molecular architecture, assembly, dynamics and polymorphism. *Q Rev Biophys* 32, 99-187.
- PARSONS, J.T., 2003. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci* 116, 1409-1416.
- PATTERSON, G.H., Lippincott-Schwartz, J., 2002. A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science* 297, 1873-1877.
- PEKNY, M., Lane, E.B., 2007. Intermediate filaments and stress. *Exp Cell Res* 313, 2244-2254.
- PETIT, V., Thiery, J.P., 2000. Focal adhesions: structure and dynamics. *Biol Cell* 92, 477-494.
- POLLARD, T.D., 1986. Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J Cell Biol* 103, 2747-2754.
- POLLARD, T.D., Borisy, G.G., 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-465.
- PORTER, M.E., Bower, R., Knott, J.A., Byrd, P., Dentler, W., 1999. Cytoplasmic dynein heavy chain 1b is required for flagellar assembly in *Chlamydomonas*. *Mol Biol Cell* 10, 693-712.
- PRAHLAD, V., Yoon, M., Moir, R.D., Vale, R.D., Goldman, R.D., 1998. Rapid movements of vimentin on microtubule tracks: kinesin-dependent assembly of intermediate filament networks. *J Cell Biol* 143, 159-170.
- RAINGEAUD, J., Whitmarsh, A.J., Barrett, T., Derijard, B., Davis, R.J., 1996. MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* 16, 1247-1255.

- REZNICZEK, G.A., Abrahamsberg, C., Fuchs, P., Spazierer, D., Wiche, G., 2003. Plectin 5'-transcript diversity: short alternative sequences determine stability of gene products, initiation of translation and subcellular localization of isoforms. *Hum Mol Genet* 12, 3181-3194.
- REZNICZEK, G.A., Janda, L., Wiche, G., 2004. Plectin. *Methods Cell Biol* 78, 721-755.
- RIDGE, K.M., Linz, L., Flitney, F.W., Kuczmarski, E.R., Chou, Y.H., Omary, M.B., Sznajder, J.I., Goldman, R.D., 2005. Keratin 8 phosphorylation by protein kinase C delta regulates shear stress-mediated disassembly of keratin intermediate filaments in alveolar epithelial cells. *J Biol Chem* 280, 30400-30405.
- ROSENBAUM, J., 2000. Cytoskeleton: functions for tubulin modifications at last. *Curr Biol* 10, R801-803.
- ROTHNAGEL, J.A., Longley, M.A., Holder, R.A., Kuster, W., Roop, D.R., 1994. Prenatal diagnosis of epidermolytic hyperkeratosis by direct gene sequencing. *J Invest Dermatol* 102, 13-16.
- ROY, S., Coffee, P., Smith, G., Liem, R.K., Brady, S.T., Black, M.M., 2000. Neurofilaments are transported rapidly but intermittently in axons: implications for slow axonal transport. *J Neurosci* 20, 6849-6861.
- RUSSELL, D., Andrews, P.D., James, J., Lane, E.B., 2004. Mechanical stress induces profound remodelling of keratin filaments and cell junctions in epidermolysis bullosa simplex keratinocytes. *J Cell Sci* 117, 5233-5243.
- SAIKI, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N., 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- SANGER, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- SCHAFFELD, M., Knappe, M., Hunzinger, C., Markl, J., 2003. cDNA sequences of the authentic keratins 8 and 18 in zebrafish. *Differentiation* 71, 73-82.
- SCHALLER, M.D., Borgman, C.A., Parsons, J.T., 1993. Autonomous expression of a noncatalytic domain of the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase pp125FAK. *Mol Cell Biol* 13, 785-791.
- SCHALLER, M.D., 2001. Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta* 1540, 1-21.
- SCHLAEPFER, D.D., Mitra, S.K., Ilic, D., 2004. Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta* 1692, 77-102.
- SCHLAEPFER, D.D., Mitra, S.K., 2004. Multiple connections link FAK to cell motility and invasion. *Curr Opin Genet Dev* 14, 92-101.
- SCHRODER, R., Warlo, I., Herrmann, H., van der Ven, P.F., Klasen, C., Blumcke, I., Mundegar, R.R., Furst, D.O., Goebel, H.H., Magin, T.M., 1999. Immunogold EM reveals a close association of plectin and the desmin cytoskeleton in human skeletal muscle. *Eur J Cell Biol* 78, 288-295.

- SCHWARTZ, D.H., Sharma, U.K., Perlman, E.J., Blakemore, K., 1995. Adherence of human immunodeficiency virus-infected lymphocytes to fetal placental cells: a model of maternal --> fetal transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 978-982.
- SCHWEIZER, J., Bowden, P.E., Coulombe, P.A., Langbein, L., Lane, E.B., Magin, T.M., Maltais, L., Omary, M.B., Parry, D.A., Rogers, M.A., Wright, M.W., 2006. New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol* 174, 169-174.
- SERRELS, B., Serrels, A., Brunton, V.G., Holt, M., McLean, G.W., Gray, C.H., Jones, G.E., Frame, M.C., 2007. Focal adhesion kinase controls actin assembly via a FERM-mediated interaction with the Arp2/3 complex. *Nat Cell Biol* 9, 1046-1056.
- SHANER, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N., Palmer, A.E., Tsien, R.Y., 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 22, 1567-1572.
- SMALL, J.V., Stradal, T., Vignat, E., Rottner, K., 2002. The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol* 12, 112-120.
- SMITH, F.J., Liao, H., Cassidy, A.J., Stewart, A., Hamill, K.J., Wood, P., Joval, I., van Steensel, M.A., Bjorck, E., Callif-Daley, F., Pals, G., Collins, P., Leachman, S.A., Munro, C.S., McLean, W.H., 2005. The genetic basis of pachyonychia congenita. *J Investig Dermatol Symp Proc* 10, 21-30.
- SOELLNER, P., Quinlan, R.A., Franke, W.W., 1985. Identification of a distinct soluble subunit of an intermediate filament protein: tetrameric vimentin from living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 7929-7933.
- SOKOLOVA, A.V., Kreplak, L., Wedig, T., Mucke, N., Svergun, D.I., Herrmann, H., Aebi, U., Strelkov, S.V., 2006. Monitoring intermediate filament assembly by small-angle x-ray scattering reveals the molecular architecture of assembly intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 16206-16211
- SONNENBERG, A., Liem, R.K., 2007. Plakins in development and disease. *Exp Cell Res* 313, 2189-2203.
- SOULE, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., Brennan, M., 1973. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 51, 1409-1416.
- SPECTOR, I., Shochet, N.R., Kashman, Y., Groweiss, A., 1983. Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. *Science* 219, 493-495.
- SPURNY, R., Gregor, M., Castanon, M.J., Wiche, G., 2008. Plectin deficiency affects precursor formation and dynamics of vimentin networks. *Exp Cell Res*.
- STEINERT, P.M., Roop, D.R., 1988. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annu Rev Biochem* 57, 593-625.
- STRAUBE-WEST, K., Loomis, P.A., Opal, P., Goldman, R.D., 1996. Alterations in neural intermediate filament organization: functional implications and the induction of pathological changes related to motor neuron disease. *J Cell Sci* 109 (Pt 9), 2319-2329.

- STRELKOV, S.V., Herrmann, H., Geisler, N., Wedig, T., Zimbelmann, R., Aebi, U., Burkhard, P., 2002. Conserved segments 1A and 2B of the intermediate filament dimer: their atomic structures and role in filament assembly. *Embo J* 21, 1255-1266.
- STRELKOV, S.V., Herrmann, H., Aebi, U., 2003. Molecular architecture of intermediate filaments. *Bioessays* 25, 243-251.
- STRNAD, P., Windoffer, R., Leube, R.E., 2001. In vivo detection of cytokeratin filament network breakdown in cells treated with the phosphatase inhibitor okadaic acid. *Cell Tissue Res* 306, 277-293.
- STRNAD, P., Windoffer, R., Leube, R.E., 2002. Induction of rapid and reversible cytokeratin filament network remodeling by inhibition of tyrosine phosphatases. *J Cell Sci* 115, 4133-4148.
- SUKHAREV, S.I., Klenchin, V.A., Serov, S.M., Chernomordik, L.V., Chizmadzhev Yu, A., 1992. Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells. The effect of DNA interaction with electropores. *Biophys J* 63, 1320-1327.
- SUN, C.X., Robb, V.A., Gutmann, D.H., 2002. Protein 4.1 tumor suppressors: getting a FERM grip on growth regulation. *J Cell Sci* 115, 3991-4000.
- SUN, N., Critchley, D.R., Paulin, D., Li, Z., Robson, R.M., 2008a. Human alpha-synemin interacts directly with vinculin and metavinculin. *Biochem J* 409, 657-667.
- SUN, N., Critchley, D.R., Paulin, D., Li, Z., Robson, R.M., 2008b. Identification of a repeated domain within mammalian alpha-synemin that interacts directly with talin. *Exp Cell Res* 314, 1839-1849.
- 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.
- TAKAHASHI, K., Coulombe, P.A., Miyachi, Y., 1999. Using transgenic models to study the pathogenesis of keratin-based inherited skin diseases. *J Dermatol Sci* 21, 73-95.
- TAO, G.Z., Toivola, D.M., Zhou, Q., Strnad, P., Xu, B., Michie, S.A., Omary, M.B., 2006. Protein phosphatase-2A associates with and dephosphorylates keratin 8 after hyposmotic stress in a site- and cell-specific manner. *J Cell Sci* 119, 1425-1432.
- THERIOT, J.A., Mitchison, T.J., 1992. Comparison of actin and cell surface dynamics in motile fibroblasts. *J Cell Biol* 119, 367-377.
- TIAN, R., Gregor, M., Wiche, G., Goldman, J.E., 2006. Plectin regulates the organization of glial fibrillary acidic protein in Alexander disease. *Am J Pathol* 168, 888-897.
- TISCHLER, A.S., Greene, L.A., 1975. Nerve growth factor-induced process formation by cultured rat pheochromocytoma cells. *Nature* 258, 341-342.
- TOIVOLA, D.M., Nieminen, M.I., Hesse, M., He, T., Baribault, H., Magin, T.M., Omary, M.B., Eriksson, J.E., 2001. Disturbances in hepatic cell-cycle regulation in mice with assembly-deficient keratins 8/18. *Hepatology* 34, 1174-1183.

- TOIVOLA, D.M., Zhou, Q., English, L.S., Omary, M.B., 2002. Type II keratins are phosphorylated on a unique motif during stress and mitosis in tissues and cultured cells. *Mol Biol Cell* 13, 1857-1870.
- TOIVOLA, D.M., Tao, G.Z., Habtezion, A., Liao, J., Omary, M.B., 2005. Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends Cell Biol* 15, 608-617.
- TSURUTA, D., Jones, J.C., 2003. The vimentin cytoskeleton regulates focal contact size and adhesion of endothelial cells subjected to shear stress. *J Cell Sci* 116, 4977-4984.
- TUSCHL, T., 2001. RNA interference and small interfering RNAs. *Chembiochem* 2, 239-245.
- UTTAM, J., Hutton, E., Coulombe, P.A., Anton-Lamprecht, I., Yu, Q.C., Gedde-Dahl, T., Jr., Fine, J.D., Fuchs, E., 1996. The genetic basis of epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 9079-9084.
- UYAMA, N., Zhao, L., Van Rossen, E., Hirako, Y., Reynaert, H., Adams, D.H., Xue, Z., Li, Z., Robson, R., Pekny, M., Geerts, A., 2006. Hepatic stellate cells express synemin, a protein bridging intermediate filaments to focal adhesions. *Gut* 55, 1276-1289.
- VAN DE WETERING, M., Oving, I., Muncan, V., Pon Fong, M.T., Brantjes, H., van Leenen, D., Holstege, F.C., Brummelkamp, T.R., Agami, R., Clevers, H., 2003. Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO Rep* 4, 609-615.
- VASSAR, R., Coulombe, P.A., Degenstein, L., Albers, K., Fuchs, E., 1991. Mutant keratin expression in transgenic mice causes marked abnormalities resembling a human genetic skin disease. *Cell* 64, 365-380.
- VAUGHAN, K.T., 2005. Microtubule plus ends, motors, and traffic of Golgi membranes. *Biochim Biophys Acta* 1744, 316-324.
- VENETIANER, A., Schiller, D.L., Magin, T., Franke, W.W., 1983. Cessation of cytokeratin expression in a rat hepatoma cell line lacking differentiated functions. *Nature* 305, 730-733.
- VIKSTROM, K.L., Borisy, G.G., Goldman, R.D., 1989. Dynamic aspects of intermediate filament networks in BHK-21 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 549-553.
- VIKSTROM, K.L., Lim, S.S., Goldman, R.D., Borisy, G.G., 1992. Steady state dynamics of intermediate filament networks. *J Cell Biol* 118, 121-129.
- WADE, R.H., Hyman, A.A., 1997. Microtubule structure and dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 9, 12-17.
- WALD, F.A., Oriolo, A.S., Casanova, M.L., Salas, P.J., 2005. Intermediate filaments interact with dormant ezrin in intestinal epithelial cells. *Mol Biol Cell* 16, 4096-4107.
- WATANABE, T., Noritake, J., Kaibuchi, K., 2005. Regulation of microtubules in cell migration. *Trends Cell Biol* 15, 76-83.

- WEBB, D.J., Donais, K., Whitmore, L.A., Thomas, S.M., Turner, C.E., Parsons, J.T., Horwitz, A.F., 2004. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol* 6, 154-161.
- WEBER, K.L., Bement, W.M., 2002. F-actin serves as a template for cytokeratin organization in cell free extracts. *J Cell Sci* 115, 1373-1382.
- WELCH, M.D., Mullins, R.D., 2002. Cellular control of actin nucleation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18, 247-288.
- WELLS, L., Vosseller, K., Hart, G.W., 2001. Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc. *Science* 291, 2376-2378.
- WERNER, N.S., Windoffer, R., Strnad, P., Grund, C., Leube, R.E., Magin, T.M., 2004. Epidermolysis bullosa simplex-type mutations alter the dynamics of the keratin cytoskeleton and reveal a contribution of actin to the transport of keratin subunits. *Mol Biol Cell* 15, 990-1002.
- WESTERMANN, S., Weber, K., 2003. Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 938-947.
- WICHE, G., 1998. Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. *J Cell Sci* 111 (Pt 17), 2477-2486.
- WILHELMSSEN, 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.
- WINDOFFER, R., Leube, R.E., 1999. Detection of cytokeratin dynamics by time-lapse fluorescence microscopy in living cells. *J Cell Sci* 112, 4521-4534.
- WINDOFFER, R., Beile, B., Leibold, A., Thomas, S., Wilhelm, U., Leube, R.E., 2000. Visualization of gap junction mobility in living cells. *Cell Tissue Res* 299, 347-362.
- WINDOFFER, R., Leube, R.E., 2001. De novo formation of cytokeratin filament networks originates from the cell cortex in A-431 cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 50, 33-44.
- WINDOFFER, R., Borchert-Stuhltrager, M., Leube, R.E., 2002. Desmosomes: interconnected calcium-dependent structures of remarkable stability with significant integral membrane protein turnover. *J Cell Sci* 115, 1717-1732.
- WINDOFFER, R., Wöll, S., Strnad, P., Leube, R.E., 2004. Identification of novel principles of keratin filament network turnover in living cells. *Mol Biol Cell* 15, 2436-2448.
- WINDOFFER, R., Kolsch, A., Woll, S., Leube, R.E., 2006. Focal adhesions are hotspots for keratin filament precursor formation. *J Cell Biol* 173, 341-348.
- WOLL, S., Windoffer, R., Leube, R.E., 2007. p38 MAPK-dependent shaping of the keratin cytoskeleton in cultured cells. *J Cell Biol* 177, 795-807.
- WÖLL, S., Windoffer, R., Leube, R.E., 2005. Dissection of keratin dynamics: different contributions of the actin and microtubule systems. *Eur J Cell Biol* 84, 311-28.

- WOODS, A., Couchman, J.R., 1994. Syndecan 4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component. *Mol Biol Cell* 5, 183-192.
- YAMADA, S., Wirtz, D., Coulombe, P.A., 2002. Pairwise assembly determines the intrinsic potential for self-organization and mechanical properties of keratin filaments. *Mol Biol Cell* 13, 382-391.
- YARMOLA, E.G., Somasundaram, T., Boring, T.A., Spector, I., Bubb, M.R., 2000. Actin-latrunculin A structure and function. Differential modulation of actin-binding protein function by latrunculin A. *J Biol Chem* 275, 28120-28127.
- YANO, S., Komine, M., Fujimoto, M., Okochi, H., Tamaki, K., 2004. Mechanical stretching in vitro regulates signal transduction pathways and cellular proliferation in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 122, 783-790.
- YOON, K.H., Yoon, M., Moir, R.D., Khuon, S., Flitney, F.W., Goldman, R.D., 2001. Insights into the dynamic properties of keratin intermediate filaments in living epithelial cells. *J Cell Biol* 153, 503-516.
- YOON, M., Moir, R.D., Prahlad, V., Goldman, R.D., 1998. Motile properties of vimentin intermediate filament networks in living cells. *J Cell Biol* 143, 147-157.
- ZAIDEL-BAR, R., Ballestrem, C., Kam, Z., Geiger, B., 2003. Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *J Cell Sci* 116, 4605-4613.
- ZAIDEL-BAR, R., Cohen, M., Addadi, L., Geiger, B., 2004. Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochem Soc Trans* 32, 416-420.
- ZAIDEL-BAR, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R., Geiger, B., 2007. Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat Cell Biol* 9, 858-867.
- ZAMIR, E., Geiger, B., 2001. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* 114, 3583-3590.
- ZASTROW, M.S., Vlcek, S., Wilson, K.L., 2004. Proteins that bind A-type lamins: integrating isolated clues. *J Cell Sci* 117, 979-987.
- ZHANG, T., Haws, P., Wu, Q., 2004. Multiple variable first exons: a mechanism for cell- and tissue-specific gene regulation. *Genome Res* 14, 79-89.
- ZIPPER, H., Brunner, H., Bernhagen, J., Vitzthum, F., 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res* 32, e103.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
Abb. 1	Das Zytoskelett epithelaler Zellen	3
Abb. 2	Schematische Darstellung einer Epithelzelle	4
Abb. 3	Bildung der Mikrotubuli	5
Abb. 4	Aktin- <i>treadmilling</i> -Modell	7
Abb. 5	Fokale Adhäsionen und fokaler Adhäsionskinase	8
Abb. 6	Atom-Modell eines Vimentin-Dimers	14
Abb. 7	Schematisches Modell des IF-Zusammenbaus	15
Abb. 8	Schematisches Modell der verschiedenen <i>IF-assembly groups</i>	16
Abb. 9	Das Zytolinker Protein Plectin	19
Abb. 10	<i>Epidermolysis bullosa</i>	28
Abb. 11	<i>Pachyonychia congenita</i>	429
Abb. 12	Übersicht über den EK18-1-Zellklon	78
Abb. 13	EK18-1-Zellen bilden KFPs in Lamellipodien	79
Abb. 14	Zellverbände reorganisieren ihre Keratinnetze nach Verwundung	79
Abb. 15	KFPs entstehen an der Zellfront von migrierenden Zellen.	80
Abb. 16	KFPs entstehen in der Nähe von Paxillin-markierten FKs	82
Abb. 17	KFPs entstehen in der Nähe von Zyxin-markierten FAs	83
Abb. 18	Knock-Down von Talin in EK18-1-Zellen durch die Expression von Talin-spezifischer shRNA	85
Abb. 19	Bildung von KFPs in unmittelbarer Nähe von FAs in nicht-epithelialen SW-13-Zellen	87
Abb. 20	KFPs entstehen Keratinisiform-unspezifisch an Adhäsionskontakten	88
Abb. 21	EBS-mutierte Keratingranula entstehen in EpH4-Zellen ebenfalls an FAs	89
Abb. 22	Mutierte EBS-Keratine entstehen in EpH4-Zellen ebenfalls an FAs	90
Abb. 23	Prozentuale Auswertung der Initiierung entstehender KFPs an FAs	90
Abb. 24	Knock-Down von Talin in MCF7-Zellen, welche das mutierte K14 _{R125C} herstellen durch die Expression von Talin-spezifischer shRNA	92
Abb. 25	Nachweis von Talin mittels Antikörperfärbung in MT5K14-26-Zellen, welche mit Talin-spezifischer shRNA transfiziert wurden	93
Abb. 26	Übersicht über die PC-Zellklone	95
Abb. 27	Entstehung und Dynamik von KFPs in den verschiedenen PC-Zellklonen	96
Abb. 28	Desmosomen zeigen keine Veränderung durch die Anwesenheit der PC-Aggregate	97
Abb. 29	Proteinbiochemischer Nachweis der FA-Proteine Paxillin und FAK-Y in den verschiedenen PC-mutierten Zelllinien	98
Abb. 30	Kolokalisierung von Keratingranula und FAs in PK6aN171K-1- und PK6aN171del-2-Zellen	99

7.1 Abbildungsverzeichnis (Fortsetzung)

Abbildung	Titel	Seite
Abb. 31	Der Knock-Down von Talin durch die Expression von Talin-spezifischer shRNA führt zum Verlust der Keratingranula und induziert Reorganisation der Keratinproteine	100
Abb. 32	KFPs bilden sich am Rand Aktin-haltiger Lamellipodien	101
Abb. 33	Zerstörung der Mikrofilamenten durch Cytochalasin D und der Mikrotubuli durch Nocodazol in EK18-1-Zellen	102
Abb. 34	KFPs werden hauptsächlich durch Aktin-abhängigen Transport zentripetal bewegt	103
Abb. 35	Photoaktivierung von KFs in distinkten Zellbereichen	105
Abb. 36	Photoaktivierung von KFs in PLC-Zellen	106
Abb. 37	Zeitraffer-Laserscanningaufnahmen von photoaktivierten KFs in der linken Zellhälfte	107
Abb. 38	Ko-Verteilung der endogenen HK18- und photoaktivierten HK8-Netzwerke	108
Abb. 39	Der Aufbau des KF-Netzwerks findet in fusionierten Zellen in der Zellperipherie statt	110
Abb. 40	Die Bildung von KFPs persistiert auch in Gegenwart von Translationsinhibitoren	111
Abb. 41	Nachweis von Plectin-Isoformen durch quantitative Real-Time-PCR in murinen und humanen Epithelzellen mittels Isoform-spezifischer Primer	113
Abb. 42	Immunzytologischer Nachweis der Plectin-Isoformen 1 und 1 F	114
Abb. 43	Nachweis von Plectin1 durch Antikörperfärbung in Zellen, die fluoreszierende Keratine synthetisieren.	115
Abb. 44	Plectin1E-GFP und Plectin1F-GFP lokalisieren an fokale Adhäsionskomplexe und Aktin-Stressfasern	117
Abb. 45	KFPs ko-lokalisieren mit Plectin1E	118
Abb. 46	KFPs ko-lokalisieren mit Plectin1F	119
Abb. 47	Die aktivierte FAK ko-lokalisiert mit KFs und PC-mutierten Keratingranula	121
Abb. 48	Einfluss der dominant-aktiven FAK-Mutante superFAK auf die Keratinfilamentbildung	122
Abb. 49	Einfluss der dominant-negativen FAK-Mutante FRNK auf die Keratinfilamentbildung	123
Abb. 50	Aktiviertes p38 kolokalisiert mit den mutierten Keratinaggregaten in den PK6aN171K-1- und PK6aN171K-2-Zelllinien	124
Abb. 51	Die Inhibierung von p38 beeinflusst die Entstehung und den Transport von PC-mutierten Keratingranula	125
Abb. 52	Pharmakologische Hemmung von p38 verhindert die Neubildung sowie den Transport von KFPs und löst eine Verkleinerung von FAs aus	127
Abb. 53	Die Hemmung von Proteasomen führt zur Anhäufung von Keratingranula	128
Abb. 54	GFP-Vimentin bildet keine vollständige Filamente	129
Abb. 55	Verteilung von Desmin-mCherry in PLC- und SW-13 Zellen	130
Abb. 56	Dynamik von Vimentin und Desmin in Epithelzellen	131
Abb. 57	Verteilung von Peripherin in verschiedenen Zelllinien	132
Abb. 58	PC12-Zellen synthetisieren fluoreszierende Peripherin-Netzwerke	132
Abb. 59	Dynamik von Peripherin-Netzwerken in Lebendzellenaufnahmen von transfizierten PC12- Zellen	133
Abb. 60	Schematisches Modell der KFP-Bildung	137
Abb. 61	Keratin-Tretmühlen-Modell	141

7.2 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
ABP	Aktin-bindende Proteine
ADP	Adenosindiphosphat
ADF	Aktin-Depolymerisierungs-Faktor
AK	Antikörper
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
APS	Ammonium-Persulfat (NH ₄) ₂ O ₈
Arp 2/3	Aktin-related Proteinkomplex
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BES	N, N-bis-[2hydroxyethyl]-2-aminoethansulfonsäure
BPAG1	Bullous Pemphigoid Antigen 1
BSA	Rinderserum- Albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
Ca	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre DNA
<i>cds</i>	Kodierende Sequenz (<i>coding sequence</i>)
DAPI	4, 6-Diamidino-2-Phenylindol
<i>ddH₂O</i>	doppelt-destiliertes Wasser
DEPC	Diethylcarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
DP	Desmoplakin
DTT	Dithiothreit
EBS	<i>Epidermolysis bullosa simplex</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced Chemi-Luminescence</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
eCFP	verstärktes blaufluoreszierendes Protein (<i>enhanced cyan fluorescent protein</i>)
eGFP	verstärktes grünfluoreszierendes Protein (<i>enhanced green fluorescent protein</i>)

7.2 Abkürzungsverzeichnis (Fortsetzung)

Abkürzung	Bedeutung
EM	Elektronen-Mikroskopie
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
eYFP	verstärktes gelbfluoreszierendes Protein (<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>)
Fa.	Firma
FA, Plural. FAs	fokale Adhäsion
F-Aktin	filamentöses Aktin
FAK	fokale Adhensionskinase
FAT	<i>focal adhesion targeting</i>
FCS	fetales Rinderserum (<i>fetal calf serum</i>)
FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
FK, Plural FKs	fokaler Kontakt
FP	fluoreszierendes Protein
FRAP	<i>Fluorescence Recovery after Photobleaching</i>
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FRNK	<i>FAK-related-non-kinase</i>
g	Gramm/Erdbeschleunigung
G-418	Geneticin-Antibiotikum, Neomycin-Analogon
G-Aktin	globuläres Aktin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFAP	<i>glial fibrillar acidic protein</i>
gt	Ziege, <i>engl. goat</i>
h/std	Stunde(n)
HK	humanes Keratin
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>Horseradish-Peroxidase</i>)
IF, Plural: IFs	Intermediärfilament, Immunfluoreszenz
IFAP, Plural IFAPs	Intermediärfilament assoziierte Proteine
INM	innere Kernmembran (<i>inner nuclear membrane</i>)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IZC	Immunzytochemie
JNK	Jun N-terminale Kinase
K	Keratin
KaAc	Kaliumacetat
KaP, Plural KaPs	Keratin assoziierte Proteine
kb	Kilobasen

7.2 Abkürzungsverzeichnis (Fortsetzung)

Abkürzung	Bedeutung
kDa	Kilo Dalton
KF, Plural KFs	Keratinfilament
KFP, Plural: KFPs	Keratinfilamentvorläufer (<i>keratin filament precursor</i>)
LB-Medium	Luria-Berthani-Medium
LSM	Laser-Scanning Mikroskop
M	Molmasse
MAP-Kinase, = MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase, <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MAP	Mikrotubuli assoziierte Proteine
mc	Maus, <i>lat. Mus musculus</i>
MCS	multiple Klonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>)
MF	Mikrofilamente
min	Minuten
mM	Millimol
mRFP	monomeres rotfluoreszierendes Protein (<i>monomer red fluorescent protein</i>)
mRNA	<i>Messenger</i> -Ribonukleinsäure
MT	Mikrotubuli
MTOC	Mikrotubuliorganisationszentrum
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
NaCl	Natriumchlorid
NEB	New England Biolabs
Ng	Nanogramm
NF	Neurofilamente
Nm	Nanometer
Nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
O-GlucNAc	O-verknüpfte Acetyl-Glucosaminierung
ONM	äußere Kernhülle (<i>outer nuclear membrane</i>)
p38	p38 Mitogen aktivierte Proteinkinase (= p38 MAPK)
PA-GFP	photoaktivierbares grün fluoreszierendes Protein (<i>photoactivable green fluorescent protein</i>)
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PC	<i>Pachyonychia congenita</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd

7.2 Abkürzungsverzeichnis (Fortsetzung)

Abkürzung	Bedeutung
PMSF	Phenylmethylsulfanylfluorid
rb	Kaninchen, <i>engl. rabbit</i>
RbCl ₂	Rubidiumchlorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase/Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerase-Ketten- Reaktion
RZPD	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung
s	Sekunden
Src	Rous Sarcoma Oncogen Kinase
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SHC	<i>sequence homology classes</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
Taq-Polymerase	<i>Thermophilus aquaticus</i> -Polymerase
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TE	Tris-EDTA-Puffer
Temp.	Temperatur
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFR1	Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor Typ 1
TRADD	<i>tumor necrosis assoziierted death domain protein</i>
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Einheiten (<i>units</i>)
ULF, Plural: ULFs	<i>unit length filament</i>
U/Min	Umdrehungen pro Minute
VT	Volumenteil
VAMs	<i>vimentin-associated-matrix-adhesions</i>
v/v	Volumen pro Volumen (Volumenprozent)
WB	Western-Blot
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen (Gewichtsprozent)

7.3 Filmverzeichnis und Legenden

Film 1: EK18-1-Zellen bilden KFPS in Lamellipodien

Konfokale Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahme (Aufnahmeabstand 1 min) einer EK18-1-Zelle, die stabil fluoreszierendes K18 exprimiert (HK18-YFP). Die KFPS entstehen in der Nähe der Plasmamembran und wandern kontinuierlich in Richtung Zellzentrum, wo sie ins periphere Netzwerk integrieren. Für Details siehe Abb. 13.

Film 2: Zellverbände reorganisieren ihre Keratinnetze nach Verwundung

Konfokale Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahme (Aufnahmeabstand 3 min) eines konfluenten Monolayers von EK18-1-Zellen nach Verwundung. Die Zellen bilden kontinuierlich KFPS und wandern aufeinander zu bis die Wunde wieder geschlossen ist. Für Details siehe Abb. 14.

Film 3: KFPS entstehen an der Zellfront von migrierenden Zellen

Übersicht- (oben) und Detail- (unten) Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen (invertierte Darstellung) sowie Phasenkontrast-aufnahmen (Aufnahmeabstand 30 s) einer wandernden EK18-1-Zelle zeigen die schnelle Bildung vieler KFPS in der sich nach vorn ausbreiteten Zellfront. Für Details siehe Abb. 15.

Film 4: KFPS entstehen in der Nähe von Paxillin-markierten FAs

Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahme und Phasenkontrastaufnahme (Aufnahmeabstand 15 s) eines Lamellipodiums einer EpH4-Zelle, die HK18-YFP (grün) und Paxillin-DsRed2 (rot) synthetisiert. KFPS entstehen in direkter Nachbarschaft zu den FAs. Für Details siehe Abb. 16.

Film 5: KFPS entstehen in der Nähe von Zyxin-markierten FAs

Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahme und Phasenkontrastaufnahme (Aufnahmeabstand 15 s) eines Lamellipodiums einer EpH4-Zelle, die HK18-YFP (grün) und RFP-Zyxin (rot) synthetisiert. KFPS entstehen in direkter Nachbarschaft zu den FAs. Für Details siehe Abb. 17.

Film 6: Knock-Down von Talin in EK18-1-Zellen

Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahme (Aufnahmeabstand 15 s) einer EK18-1-Zelle, die mit Talin-shRNA-cDNA transfiziert wurde. In der Zellperipherie können kaum neuentstehende KFPS beobachtet werden. Für Details siehe Abb. 18.

Film 7: Bildung von KFPS in unmittelbarer Nähe von FAs in nicht-epithelialen SW-13-Zellen (Übersicht)

Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahme und Phasenkontrastaufnahme (Aufnahmeabstand 15 s) der Peripherie einer SK8/18-2-Zelle, die mit RFP-Zyxin-cDNA transfiziert wurde. Auch hier entstehen die KFPS in der Nähe der FAs. Für Details siehe Abb. 19.

Film 8: Bildung von KFPS in unmittelbarer Nähe von FAs in nicht-epithelialen SW-13-Zellen (Detail)

Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahme (Aufnahmeabstand 15 s) eines Ausschnittes der Peripherie einer SK8/18-2-Zelle, die mit RFP-Zyxin-cDNA transfiziert wurde. KFPS entstehen in unmittelbarer Nähe zu den FAs. Für Details siehe Abb. 19.

Film 9: KFPS entstehen isoform-unspezifisch an FAs

Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahme (Aufnahmeabstand 15 s) einer EpH4-Zelle, die mit den Plasmiden pHK14-YFP (grün) und pPaxillin-DsRed2 (rot) transfiziert wurde. KFPS entstehen in direkter Nachbarschaft zu den FAs. Für Details siehe Abb. 20.

Film 10: EBS-mutierte Keratingranula entstehen ebenfalls an FKs (Übersicht)

Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahme (Aufnahmeabstand 15 s) einer MCF7-Zelle, die stabil das mutierte Keratinkonstrukt HK14₁₂₅C-YFP (grün) und Paxillin-DsRed2 (rot) synthetisiert. Für Details siehe Abb. 21.

Film 11: EBS-mutierte Keratingranula entstehen ebenfalls an FKs (Detail)

Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahme (Aufnahmeabstand 15 s) eines Ausschnittes der Peripherie einer MT5K14-26-Zelle (grün), die mit Paxillin-DsRed2-cDNA (rot) transfiziert wurde. KFPs entstehen in direkter Nachbarschaft zu den FKs. Für Details siehe Abb. 21.

Film 12: Mutierte EBS-Keratingranula entstehen in EpH4-Zellen ebenfalls an FAs

Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahme (Aufnahmeabstand 15 s) eines Ausschnittes der Peripherie einer EpH4-Zelle die mit den Plasmiden pHK14₁₂₅C-YFP (grün) und pRFP-Zyxin (rot) transfiziert wurde. KFPs entstehen in direkter Nachbarschaft zu den FAs. Für Details siehe Abb. 22.

Film 13: Knock-Down von Talin in MT5K14-26-Zellen

Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahme (Aufnahmeabstand 15 s) einer MT5K14-26-Zelle, die mit dem Talin-shRNA-Konstrukt transfiziert wurde. In der Zellperipherie können kaum neuentstehende KFPs beobachtet werden. Für Details siehe Abb. 23.

Film 14: Entstehung und Dynamik von KFPs in der PK6a-5-Zelle

Laser-Scanning-Zeitrafferaufnahme (Aufnahmeabstand 1 min) einer PK6a-5-Zelle. KFPs entstehen in der Zellperipherie und bewegen sich in Richtung Zellzentrum. Für Details siehe Abb. 27.

Film 15: Entstehung und Dynamik von KFPs in der PK6aN171K-1-Zelle

Laser-Scanning-Zeitrafferaufnahme (Aufnahmeabstand 1 min) einer PK6aN171K-1-Zelle. KFPs entstehen in der Zellperipherie und bewegen sich der Peripherie in Richtung Zellzentrum. Am Rande der Peripherie lösen sich die meisten wieder auf. Für Details siehe Abb. 27.

Film 16: Entstehung und Dynamik von KFPs in der PK6aN171del-2-Zelle

Laser-Scanning-Zeitrafferaufnahme (Aufnahmeabstand 1 min) einer PK6aN1717del-2-Zelle. KFPs entstehen in der Zellperipherie und bewegen sich innerhalb der Peripherie in Richtung Zellzentrum. Am Rande der Peripherie lösen sich die meisten wieder auf. Für Details siehe Abb. 27

Film 17: KFPs bilden sich am Rand Aktin-haltiger Lamellipodien

Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahme (Aufnahmeabstand 15 s) einer EpH4-Zelle, die mit Aktin-mRFP-cDNA (rot) und HK18-YFP (grün) transfiziert wurde. In sich ausbreitenden Lamellipodien kann zuerst Aktin, gefolgt von neu entstehenden Keratinnetzwerken, beobachtet werden. Für Details siehe Abb. 32.

Film 18: KFPs werden in einem Aktin-abhängigen Transport in Richtung Zellzentrum bewegt

Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahme (Aufnahmeabstand 20 s, invertierte Darstellung) einer EK18-1-Zelle, die mit 1µM Cytochalasin D behandelt wurde. Nach Drogenzugabe stoppt der KFP-Transport, es werden aber noch neue Vorläufer in der Peripherie gebildet. Für Details siehe Abb. 34.

Film 19: Nocozale hat keinen Einfluß auf den Transport der KFPs

Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahme (Aufnahmeabstand 20 s, invertierte Darstellung) einer EK18-1-Zelle, die mit 100µM Nocodazol behandelt wurde. KFPs werden unbeeinträchtigt von der Drogenzugabe weiterhin in der Peripherie gebildet und in Richtung Zellzentrum transportiert. Für Details siehe Abb. 34.

Film 20: Photoaktivierung von Keratinfilamenten in distinkten Zellbereichen

Laser-Scanning-Zeitrafferaufnahme (Aufnahmeabstand 5 min) einer PLC-Zelle, die mit HK8-paGFP-cDNA tranfiziert wurde. Photoaktivierte KFs fusionieren zu dickeren Filamentbündeln während sie sich in Richtung Zellzentrum bewegen. Für Details siehe Abb. 35.

Film 21: Photoaktivierung von Keratinfilamenten in PLC-Zellen

Laser-Scanning-Zeitrafferaufnahme (Aufnahmeabstand 10 min) einer PLC-Zelle, die mit HK8-paGFP-cDNA transfiziert wurde. Nach Photoaktivierung einer Zellhälfte tauchen die fluoreszierenden KFs zuerst in der Zellperipherie der nicht-aktivierten Zellhälfte auf. Für Details siehe Abb. 37.

Film 22: KFPs werden in Gegenwart des Translationsinhibitors Cycloheximid gebildet

Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahme (Aufnahmeabstand 20 s, invertierte Darstellung) einer PK18-5-Zelle, die mit 17 μ M Cycloheximid behandelt wurde. In der Zellperipherie kann weiterhin die Bildung von KFPs beobachtet werden. Für Details siehe Abb. 40.

Film 23: KFPs werden in Gegenwart des Translationsinhibitors Puromycin gebildet

Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahme (Aufnahmeabstand 20 s, invertierte Darstellung) einer PK18-5-Zelle, die mit 2 μ g/ml Puromycin behandelt wurde. In der Zellperipherie kann weiterhin die Bildung von KFPs beobachtet werden. Für Details siehe Abb. 40.

Film 24: Keratinfilamentvorläufer kolokalisieren mit Plectin1E

Laser-Scanning-Zeitrafferaufnahme (Aufnahmeabstand 1 min) einer EK18-1-Zelle, die HK18-YFP (grün) synthetisiert und mit Plectin1E-mRFP-cDNA (rot) transfiziert wurde. KFPs entstehen an den Plectin 1E-markierten FAs. Für Details siehe Abb. 45.

Film 25: Keratinfilamentvorläufer kolokalisieren mit Plectin1F

Laser-Scanning-Zeitrafferaufnahme (Aufnahmeabstand 1 min) einer EK18-1-Zelle, die HK18-YFP (grün) synthetisiert und mit Plectin1F-mRFP-cDNA (rot) transfiziert wurde. KFPs entstehen an den Plectin 1F-markierten FAs. Für Details siehe Abb. 46.

Film 26: Die Überexpression der FAK beeinflusst die Keratinfilamentorganisation

Laser-Scanning-Zeitrafferaufnahme (Aufnahmeabstand 1 min) einer EpH4-Zelle, die mit den Plasmiden pHK18-RFP (grün, Falschfarbendarstellung) und mit pGFP-superFAK (rot, Falschfarbendarstellung) transfiziert wurde. In Lamellipodien treten Keratinaggregate anstatt der Keratinfilamente auf, welche mit den markierten FAs ko-lokalisieren. Für Details siehe Abb. 48.

Film 27: Die Inhibierung der FAK beeinflusst die Keratinfilamentorganisation

Laser-Scanning-Zeitrafferaufnahme (Aufnahmeabstand 1 min) einer EpH4-Zelle, die mit den Plasmiden pHK18-RFP (grün, Falschfarbendarstellung) und mit pGFP-FRNK (rot, Falschfarbendarstellung) transfiziert wurde. In Lamellipodien treten Keratinaggregate anstatt der Keratinfilamente auf, welche mit den markierten FAs ko-lokalisieren. Für Details siehe Abb. 49.

Film 28: p38-Inhibierung beeinflusst die Entstehung und den Transport in PK6aN171K-1-Zellen

Laser-Scanning-Zeitrafferaufnahme (Aufnahmeabstand 1 min) einer PK6aN171K-1-Zelle, die mit 100 μ M SB 201290 behandelt wurde. Es werden zum einen keine KFPs mehr gebildet, zum anderen werden die Keratingranula nicht mehr transportiert. Für Details siehe Abb. 51 A und B.

Film 29: p38-Inhibierung beeinflusst die Entstehung und den Transport in PK6aN171del-2-Zellen

Laser-Scanning-Zeitrafferaufnahme (Aufnahmeabstand 1 min) einer PK6aN171del-2-Zelle, die mit 100 μ M SB 201290 behandelt wurde. Es werden zum einen keine KFPs mehr gebildet, zum anderen werden die Keratingranula nicht mehr transportiert. Für Details siehe Abb. 51 C und D.

Film 30: Pharmakologische Hemmung der p38 MAPK beeinflusst die Dynamik der FAs

Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahme (Aufnahmeabstand 20 s) einer Zyxin-RFP transfizierten EpH4-Zelle, die mit dem Inhibitor SB 212090 (100 μ M) behandelt wurde. Die FAs verkleinern sich zu fokalen FKs. Für Details siehe Abb. 52 A.

Film 31: Pharmakologische Hemmung von p38 in EpH4- und PK18-5-Zellen verhindert die Neubildung sowie den Transport von KFPs und löst eine Verkleinerung der FAs aus

Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahme (Aufnahmeabstand 20 s) einer HK18-YFP synthetisierenden (grün) PK18-5-Zelle, die mit Zyxin-RFP-cDNA (rot) transfiziert und mit dem Inhibitor SB 212090 (100 μ M) behandelt wurde. An den verkleinern FKs findet keine Neubildung von KFPs mehr statt; auch die Einwärtsbewegung wird gestoppt. Für Details siehe Abb. 52 B.

Film 32: Die Hemmung von Proteasomen führt zur Anhäufung von Keratingranula in PK6aN171K-1-Zellen

Laser-Scanning-Zeitrafferaufnahme (Aufnahmeabstand 1 min) einer PK6aN171K-1-Zelle, die mit 100 μ M SB 201290 behandelt wurde. Die Keratingranula lösen sich nicht mehr auf und häufen sich am Rand der Peripherie an. Für Details siehe Abb. 53 A.

Film 33: Die Hemmung von Proteasomen führt zur Anhäufung von Keratingranula in PK6aN171del-2-Zellen

Laser-Scanning-Zeitrafferaufnahme (Aufnahmeabstand 1 min) einer PK6aN171del-2-Zelle, die mit 100 μ M SB 201290 behandelt wurde. Die Keratingranula lösen sich nicht mehr auf und häufen sich am Rand der Peripherie an. Für Details siehe Abb. 53 B.

Film 34: Fluoreszierendes Vimentin bewegt sich ungerichtet in Epithelzellen

Laser-Scanning-Zeitrafferaufnahme (Aufnahmeabstand 1 min, invertierte Darstellung) von einer EpH4-Zelle, die mit GFP-Vimentin-cDA transfiziert wurde. Vimentin granula entstehen in der Zellperipherie und bewegen sich bidirektional. Für Details siehe Abb. 56 A.

Film 35: Fluoreszierendes Desmin bewegt sich ungerichtet in Epithelzellen

Laser-Scanning-Zeitrafferaufnahme (Aufnahmeabstand 1 min, invertierte Darstellung) von einer PLC-Zelle, die mit Desmin-mCherry-cDNA transfiziert wurde. Kurze Desminfilamente tauchen in der Zellperipherie auf. Für Details siehe Abb. 56 B.

Film 36 PC12-Zellen synthetisieren fluoreszierende Peripherin-Netzwerke.

Laser-Scanning-Zeitrafferaufnahme (Aufnahmeabstand 1 min) einer PC12-Zelle, die mit Peripherin-YFP-cDNA transfiziert und 30 ng/ml NGF behandelt wurde. In der Zellperipherie entstehen Peripherin-Squiggels. Für Details siehe Abb. 59 A.

Film 37: Peripherinfilamente bilden sich in Gegenwart von Puromycin

Laser-Scanning-Zeitrafferaufnahme (Aufnahmeabstand 1 min) einer PC12-Zelle, die mit Peripherin-YFP-cDNA transfiziert und 30 ng/ml NGF und 10 μ g/ml Puromycin behandelt wurde. In der Zellperipherie entstehen weiterhin Peripherin-Squiggels. Für Details siehe Abb. 59 B.

Film 38: Peripherinfilamente bilden sich in Gegenwart von Cycloheximid

Laser-Scanning-Zeitrafferaufnahme (Aufnahmeabstand 1 min) einer PC12-Zelle, die mit Peripherin-YFP-cDNA transfiziert und 30 ng/ml NGF und 10 μ g/ml Cycloheximid behandelt wurde. In der Zellperipherie entstehen weiterhin Peripherin-Squiggels. Für Details siehe Abb. 59 C.

Die Filme befinden sich online:

<http://www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/Leube/publications.html>

oder

<http://www.moca.rwth-aachen.de/publications.html>

7.4 Firmenverzeichnis

Firmenname	Firmensitz
Adobe	München, D
Air Liquide	Düsseldorf, D
Amersham Biosciences Little	Chalfont, GB
B.Braun Biotech	Melsungen, D
BioRad Laboratories Inc.	Hercules, USA
Carl-Roth GmbH	Karlsruhe, D
Carl-Zeiss Jena GmbH	Jena, D
Clontech	Mountain View, USA
Corel	Unterschleißheim, D
Difco	Kansas City, USA
ELMI laboratory equipment	Riga, L
Eppendorf	Hamburg, D
Fermentas Life Sciences	St.Leon-Rot, D
Fisher Bioblock Scientific	Illirch Cedex, F
Fluka/Riedel-deHaen	Buchs, CH
Gibco	Karlsruhe, D
Gilson	Middleton, USA
H+P Labortechnik	Oberschleißheim, D
Hamamatsu	Herrsching am Ammersee, D
Heidolph	Schwabach, D
Heraeus	Hanau, D
Invitrogen	Karlsruhe, D
Janker & Kunkel	Staufen, D
Kodak	Stuttgart, D
Kontron	Eching, D
Leica Microsystems	Wetzlar, D Leica
MaTek Cultureware	Ashland, USA
Media Cybernetics	Silver Spring, USA
Memmert	Schwabach, D
Merck	Darmstadt, D
Microsoft	Redmond, USA
Millipore	Billerica, USA
Nalgene Cryo	Rochester, USA
New England Biolabs	Ipswich, USA

7.4 Firmenverzeichnis (Fortsetzung)

Firmenname	Firmensitz
Nunc	Rochester, USA
Olympus	Hamburg, D
Pechiney-Plastic	Chicago, USA
peqlab	Erlangen, D
Pharmacia-Biotech	Piscataway, USA
Progen Biotechnik	Heidelberg, D
Qiagen	Hilden, D
Sarstedt	Nümbrecht, D
Sartorius	Göttingen, D
Schleicher und Schuell	Brentford, GB
Schott	Mainz, D
Sci Ed Central	Cary, USA
Scotsman	Gießen, D
Serva	Heidelberg, D
Sigma-Aldrich	München, D
Systat	Erkrath, D
Till Photonics	Gräfeling, D
Vincent Associates	Rochester, USA
WTW	Weilheim, D

7.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle	Titel	Seite
1	IFs sind in fünf verschiedene Typen unterteilt	12
2	Postranslationelle Modifizierung von Keratinfilamenten	25
3	Verwendete Geräte	31
4	Verwendete Chemikalien und Reagenzien	32
5	Verwendete Gebrauchswaren	35
6	Verwendete Software	36
7	Verwendete Kits	36
8	Verwendete Enzyme	36
9	Verwendete Antibiotika	37
10	Verwendete Drogen und andere Reagenzien	37
11	Verwendete Primär-Antikörper	38
12	Verwendete Sekundär-Antikörper	38

7.5 Tabellenverzeichnis (Fortsetzung)

Tabelle	Titel	Seite
13	Verwendete Nukleinsäuren	39
14	Verwendete Klonierungsprimer	39
15	Verwendeter Primer für Reverse-Transkriptase-PCR	40
16	Verwendete Sequenzierungsprimer	40
17	Verwendete Primer für Real-Time-PCR der verschiedenen Plectin-Isoformen	41
18	Verwendete Primer für die Real-Time-PCR (Positiv-Kontrollen)	41
19	Verwendete Bakterienstämme	41
20	Verwendete Zelllinien	42
21	Verwendete Klonierungsvektoren	42
22	Plasmide zur Expression von fluoreszierenden Proteinhybriden	43
23	Allgemeine Puffer	44
24	Allgemeine Lösungen	44
25	DNA-Größenstandards	44
26	PCR-Ansätze mit der Phusion-Taq	48
27	Real-Time-PCR-Ansatz	49
28	Analytische und präparative Restriktion	51
29	Medien für die <i>E. Coli</i> Kulturen	54
30	Synthetisch hergestellte Talin-siRNA-Oligonukleotide	57
31	Hochsalzpuffer für die Keratinisolierung	58
32	PAGE-Puffer	59
33	Western-Blot-Puffer	60
34	Puffer für die Immunodetektion	61
35	Puffer für Coomassie-Blau Färbung	62
36	Puffer für Coomassie-Entfärbung	62
37	Puffer für Ponceau-S Färbung	62
38	Medien für die Kultur von Säugerzelllinien	63
39	Lösungen zur Kultur von Säugerzellen	63
40	BES-Medium für die Calcium-Phosphat-Transfektion	66
41	Extinktion- und Emissionswerte verschiedener Fluorophore	72
42	Hanks-Hepes-Medium für Lebendzellaufnahmen	73
43	Individuelle Einstellung zur Darstellung von Fluorophoren am LSM	74
44	KFP-Initiationsereignisse in Prozent, die innerhalb von 0,2 μm der FA in verschiedenen Zelllinien beobachtet wurden	91
45	Hergestellte PC-Zellklone	94

7.7 Schmelzkurvenanalyse der RT-PCR für SYBR-490

Well	Primer	ID	Schmelztemp.	Temp. Beginn	Temp. Ende
A4	GAP/ms	A4.1	88.0	82.0	91.5
		A4.2	80.0	78.0	81.5
		A4.3	76.0	75.5	77.5
		A4.4	70.0	69.0	74
		A4.5	67.0	60.0	68.5
A5	73/ms	A5.1	91.0	90.0	95.5
		A5.2	79.0	76.0	83.5
		A5.3	72.0	70.5	73
		A5.4	68.0	67.0	70
		A5.5	65.0	60.0	66
A6	74/ms	A6.1	88.5	87.0	90.5
		A6.2	81.0	79.0	86.5
		A6.3	75.0	73.5	78.5
		A6.4	71.0	70.5	73
		A6.5	68.5	67.0	70.5
		A6.6	64.5	62.0	66.5
A7	75/ms	A7.1	95.0	93.5	97
		A7.2	77.5	71.5	82
		A7.3	68.5	66.0	71
		A7.4	63.5	61.5	65.5
A9	gap/hu	A9.1	85.5	82.0	90.5
		A9.2	80.5	76.5	81.5
		A9.3	73.5	73.0	76
		A9.4	68.5	67.5	70
		A9.5	66.5	60.0	67
A10	73/hu	A10.1	84.5	80.0	88
		A10.2	77.0	75.5	78.5
		A10.3	74.0	71.5	75
		A10.4	65.5	60.5	68.5
A11	74/hu	A11.1	88.0	84.5	90.5
		A11.2	82.0	80.5	84
		A11.3	78.0	73.0	80
		A11.4	70.0	69.5	72
		A11.5	67.5	66.5	69
		A11.6	65.0	60.0	66
A12	75/hu	A12.1	97.0	95.5	99
		A12.2	92.5	90.5	95

7.7 Schmelzkurvenanalyse der RT-PCR für SYBR-490 (Fortsetzung)

Well	Primer	ID	Schmelztemp.	Temp. Beginn	Temp. Ende
A12	75/hu	A12.3	84.0	83.0	85.5
		A12.4	78.5	78.0	80.5
		A12.5	76.0	74.5	77
		A12.6	71.0	69.5	72.5
		A12.7	66.5	64.0	67
		A12.8	61.0	60.0	63

7.8 Bezeichnung und Klonierung der hergestellten Plasmide

Laborinterne Bezeichnung	Plasmidname	Klonierung
342	pmRFP-C1	Austausch von GFP-C1 aus 295 durch mRFP aus pAktin-mRFP über eine NheI- und EcoRI- Restriktion
348	pTER-CFP	GFP in pTER-GFP wurde durch CFP aus pCFP-N1 über eine PmeI- und AgeI- Restriktion ersetzt.
350	pmCherry	In pCFP-N1 CFP wurde durch mCherry aus pRSET über eine BamHI- und NotI- Restriktion ausgetauscht.
1075	rLNCX2-HK6a-YFP	HK6a-YFP wurde in pLNCX2 über eine XhoI- und NotI- Restriktion eingesetzt.
1076	rLNCX2-HK6aN171K-YFP	HK6aN171K-YFP wurde in pLNCX2 über eine XhoI- und NotI- Restriktion eingesetzt.
1077	rLNCX2-HK6aN171Kdel-YFP	HK6aN171del-YFP wurde in pLNCX2 über eine XhoI- und NotI- Restriktion eingesetzt.
2006	rLXSN-HK18-YFP	HK18-YFP aus pHK18-YFP wurde über eine EcoRI- und HpaI- Restriktion in pLXSN eingefügt.
2007	rLNCX2HK18-YFP	HK18-YFP aus pHK8-CFP wurde über eine XhoI- und NotI- Restriktion in pLNCX2 eingefügt.
2015	pHK18-mRFP	HK18 aus pHK18-YFP wurde durch eine EcoRI- und SacII- Restriktion in pmRFP-N1 eingefügt.
2023	pshOligo-Talin-RFP	Das annealtes shRNA anti-Talin- Oligo in wurde in pTER-mRFP nach Restriktion mit BglII und HindIII eingefügt.
2025	pshOligo-Talin-CFP	Austausch von mRFP in pShOligo Talin-RFP durch CFP nach Restriktion mit AgeI und PmeI
2026	psH-Kontroll-Oligo-RFP	Ein funktionsloses Kontroll-Oligo wurde in pmRFP-N1 nach Verdau mit BglII und HindIII eingefügt.
2032	pHK8-pa-GFP-N1	HK8 aus pHK8-CFP wurde über eine BamHI- und EcoRI- Restriktion in pPA-GFP-N1 eingefügt.
2034	psH-Kontroll-Oligo-CFP	Austausch von mRFP in pShKontroll-Oligo-RFP durch CFP nach Restriktion mit AgeI und PmeI
2061	pPlectin 1E-mRFP	Das humane Plectin 1E-PCR-Produkt wurde nach Restriktion mit BamHI und HindIII in pmRFP-C1 eingefügt.
2062	pPlectin 1F-mRFP	Das humane Plectin 1F-PCR-Produkt wurde nach Restriktion mit BamHI und HindIII in pmRFP-C1 eingefügt.
2066	pHK8-mCherry	Austausch von CFP in pHK8-CFP durch mCherry aus pmCherry nach Restriktion mit BamHI und BsrGI.
2069	pPeripherin-YFP	Peripherin-PCR Produkt wurde nach Restriktion mit EcoRI und BamHI in pYFP-N1 eingefügt.

Danksagung

Lebenslauf

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich meine Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich habe keinen anderen Promotionsversuch unternommen.

Mainz, 3. November 2008

Anne Christine Kölsch