

# **"Entstehung und Dynamik des Keratinfilament-Netzwerks"**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

"Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität

in Mainz

von

Stefan Wöll

Geboren am 26.06.1977

in Mainz

Mainz, Dezember 2006

---

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Datum der mündlichen Prüfung: 22.12.2006

---

*Meiner Familie und Isa*

---

*Dictum sapienti sat est.*

*Plautus, Persa 729*



---

## Publikationen

Windoffer, R., Wöll, S., Strnad, P. and Leube, R.E. (2004) Identification of novel principles of keratin filament network turnover in living cells. *Mol. Biol. Cell* 15:2436-2448.

Wöll, S., Windoffer, R. and Leube, R.E. (2005) Dissection of keratin dynamics: different contributions of the actin and microtubule systems. *Eur. J. Cell Biol.* 84:311-328.

Annie, M., Bittcher, G., Ramseger, R., Loschinger, J., Wöll, S., Porten, E., Abraham, C., Ruegg, M.A., Kroger, S. (2006) Clustering transmembrane-agrin induces filopodia-like processes on axons and dendrites. *Mol Cell Neurosci.* 2006 Mar;31(3):515-24.

Windoffer, R., Kölsch, A., Wöll, S., Leube, R.E. (2006) Focal adhesions are hotspots for keratin filament precursor formation. *J Cell Biol.* 2006 May 8;173(3):341-8.

Wöll, S., Windoffer, R. and Leube, R.E. p38 MAPK-dependent shaping of the keratincytoskeleton.(in revision, JCB)

## Kongressbeiträge

Wöll, S., Strnad, P., Wilhelm, U., Windoffer, R., and Leube, R.E. Light-induced resistance of the keratin network to the filament-disrupting tyrosine phosphatase inhibitor orthovanadate. 26th Annual Meeting of the German Society for Cell Biology. Bonn. 3/2003.

Windoffer, R., Strnad, P., Wöll, S. und Leube, R.E. Mechanismen der Keratin-Filament-Netzwerk-Dynamik. 99. Versammlung der Anatomischen Gesellschaft. Wien. 4/2004.

Windoffer, R., Wöll, S., P. Strnad, and Leube, R.E. *In vivo* monitoring of *de novo* formation and turnover of keratin filaments. ASCB, 44th Annual Meeting. Washington. 12/2004.

Windoffer, R., Wöll, S., and Leube, R.E. Dynamic linkage of the keratin cytoskeleton to the actin and microtubule systems. ASCB, 44th Annual Meeting. Washington. 12/2004.

Wöll, S., Windoffer, R., and Leube, R.E. Identification of keratin-actin and keratin-microtubule linkages *in vivo* and their importance for dynamic keratin properties. 100. Versammlung der Anatomischen Gesellschaft. Leipzig. 3/2005

Wöll, S., Windoffer, R., and Leube, R.E. Cell- and intermediate filament-type independent contribution of microtubules and actin filaments to intermediate filament motility. 27th Annual Meeting of the German Society for Cell Biology. Heidelberg. 3/2005.

Wöll, S., Windoffer, R., Leube, R.E. Modulation of the keratin cytoskeleton by p38 MAPK. Fourth European Discussion Workshop on Intermediate Filaments. Bonn. 10/2005

Wöll, S., Windoffer, R., Leube, R.E. P38 MAPK-dependent shaping of the keratin cytoskeleton. ASCB, 45th Annual Meeting. San Francisco. 12/2005.

---

## *Danksagung*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das Zytoskelett der eukaryotischen Zellen.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Aktin.....	1
1.1.2 Mikrotubuli.....	3
1.1.3 Intermediärfilamente.....	4
1.1.4 Interaktion und Verknüpfung der drei Zytoskelett - Komponenten.....	6
<b>1.2 Keratin.....</b>	<b>7</b>
1.2.1 Aufbau und Struktur der Keratine.....	7
1.2.2 Funktionen der Keratine.....	10
1.2.3 Phosphorylierung der Keratine.....	11
1.2.4 Glykosylierung, Transglutaminierung und Ubiquitinierung der Keratine.....	13
1.2.5 Keratin-assoziierte Proteine.....	14
1.2.6 Dynamik des Keratinnetzwerks.....	14
<b>1.3 Ziele der Arbeit.....</b>	<b>16</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>18</b>
2.1.1 Chemikalien und Geräte.....	18
2.1.2 Verwendete Kits.....	21
2.1.3 Verbrauchsmaterial.....	22
2.1.4 Enzyme.....	23
2.1.5 Inhibitoren und Drogen.....	23
2.1.6 Antikörper.....	24
2.1.7 Bakterienstämme.....	25
2.1.8 Oligonukleotide.....	26
2.1.9 Verwendete Zelllinien.....	28
2.1.10 Vektoren und Konstrukte.....	29
<b>2.2 Methoden.....</b>	<b>31</b>
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	31
2.2.1.1 Extraktion von DNA aus Zellen.....	31
2.2.1.2 Extraktion von RNA aus Zellen.....	31
2.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	32
2.2.1.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese.....	32
2.2.1.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	34
2.2.1.6 Restriktion von DNA.....	34
2.2.1.7 „Blunten“ von Restriktionsschnittstellen.....	34
2.2.1.8 Dephosphorylierung und Ligation von DNA.....	35
2.2.1.9 Phenol-Chloroform-Extraktion.....	35
2.2.1.10 Nukleinsäurenpräzipitation mit Ethanol.....	36
2.2.1.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	36
2.2.1.12 Reverse Transkription.....	37
2.2.1.13 Design und Annealing der shRNA-Einzelstränge.....	38
2.2.1.14 Kompetente Bakterien.....	39
2.2.1.15 Kultivierung und Transformation von Bakterien.....	40
2.2.1.16 Plasmidisolierung aus Bakterien (Mini- und Maxi-Präparation).....	41

2.2.2 Biochemische Methoden .....	42
2.2.2.1 Herstellung von Zelllysaten für die SDS-PAGE .....	42
2.2.2.2 Co-Immunpräzipitation .....	43
2.2.2.3 Keratinisolierung aus Zellen.....	45
2.2.2.4 Poly-Acrylamid-Gel Elektrophorese (PAGE):.....	46
2.2.2.5 Coomassie-Blau Färbung von Polyacrylamid-Gelen .....	48
2.2.2.6 Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen.....	48
2.2.2.7 Semi-dry Western Blot.....	49
2.2.2.8 Ponceau-S-Färbung von Nitrocellulose Membranen.....	50
2.2.2.9 Immundetektion von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen .....	51
2.2.2.10 Strippen von Blotmembranen.....	52
2.2.3 Methoden der Zellkultur .....	53
2.2.3.1 Kultivierung von Zellen.....	53
2.2.3.2 Vorbereitung von Glasplättchen für die Zellkultur .....	53
2.2.3.3 Einfrieren von Zellen.....	53
2.2.3.4 Auftauen von Zellen.....	54
2.2.3.5 Bestimmung der Zellzahl.....	54
2.2.3.6 Calcium-Phosphat-Transfektion von Zellen.....	55
2.2.3.7 Lipotransfektion von Zellen .....	55
2.2.3.8 Generierung stabiler Zelllinien.....	56
2.2.3.9 Hyperosmotischer Zellstress.....	57
2.2.3.10 Hypoosmotischer Zellstress.....	57
2.2.3.11 Hitzestress.....	57
2.2.4 Mikroskopische Methoden .....	58
2.2.4.1 Fixieren von Zellen.....	58
2.2.4.2 Immuncytochemische Antikörpermarkierung.....	58
2.2.4.3 Einbetten von Zellen und DAPI-Färbung.....	59
2.2.4.4 Fluoreszenzmikroskopie und Lebendzellmikroskopie .....	60
2.2.4.5 Messung Transportgeschwindigkeit von Keratinpartikeln.....	61
2.2.4.6 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....	61
2.2.4.7 Elektronische Datenverarbeitung .....	62
<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>63</b>
<b>3.1 Entstehung und Motilität von Keratinfilamentvorläufern.....</b>	<b>63</b>
3.1.1 Keratinfilamentvorläuferbildung in der Peripherie von A431 Zellen .....	63
3.1.2 Reversible Keratingranulabildung in A431 Zellen während der Mitose und nach Inkubation mit OV.....	64
3.1.3 Erzeugung und Charakterisierung des SK18/8-2 Klon aus SW-13 Zellen .....	66
3.1.4 Entstehung und Entwicklung der KFP in der Zellperipherie von SK8/18-2 Zellen....	68
3.1.5 Flexibilität und Fusionskompetenz der Keratinpartikel .....	70
3.1.6 Unterschiedliche Formen der Keratinbewegung in SW-13 Zellen .....	71
3.1.7 Unvollständige Keratinfilament-Netzwerkbildung in SW13 Zellen, die K5/14 und K6a/16 exprimieren .....	74
<b>3.2 Einfluss der Aktinfilamente und Mikrotubuli auf die Motilität der KFP .....</b>	<b>75</b>
3.2.1 KFP-Bewegung entlang von Aktinfilamenten in Lamellipodien.....	75
3.2.2 Inhibierung der langsamen, kontinuierlichen und einwärts gerichteten Motilität der KFP durch den Abbau der Aktinfilamente.....	77
3.2.3 Inhibierung der schnellen, diskontinuierlichen und bidirektionalen Motilität der KFP durch den Abbau der Mikrotubuli .....	80
3.2.4 Vollständiger Stopp der Keratinpartikelbewegungen nach Abbau von Aktinfilamenten und Mikrotubuli.....	83
3.2.5 Messung der Geschwindigkeit der Keratinpartikel: Zwei Arten des Transports .....	85

<b>3.3 Dynamik des Auf- und Abbaus des Keratinnetzwerks</b> .....	<b>86</b>
3.3.1 Abbau der Keratinfilamente und Bildung von Keratingranula aufgrund erhöhter OV-induzierter Phosphorylierung .....	87
3.3.2 Phosphorylierung von K8-S73 in der Mitose .....	89
3.3.3 Erhöhte Phosphorylierung von K8-S73 in MT5K14-26 Zellen .....	90
3.3.4 OV-induzierte Phosphorylierung von K8-S73 .....	92
3.3.5 Intakte Netzwerkbildung von K8-S73-Mutanten in SW13-Zellen.....	93
3.3.6 Aktivierung von p38 und ERK durch OV-Inkubation .....	94
3.3.7 <i>In Vivo</i> Phosphorylierung von unterschiedlichen MAPK .....	96
3.3.8 p38 <sup>P</sup> Kolokalisierung mit EBS-Keratin-Mutanten .....	98
3.3.9 p38 <sup>P</sup> -Kolokalisierung mit Keratinen in physiologischen Stresssituationen .....	102
3.3.10 Co-Immunpräzipitation von Keratinen mit p38 .....	102
3.3.11 Herstellen von Vektorsystemen für Knock-down Versuche .....	103
3.3.12 p38-shRNA induzierter Kollaps des Keratinnetzwerks.....	104
3.3.13 Inhibierung der OV-induzierten Granulabildung nach p38 Knock-Down.....	105
3.3.14 Verhinderung der OV-induzierten Keratingranulabildung durch pharmakologische p38-Inaktivierung .....	106
3.3.15 Herstellung von fluoreszenzmarkiertem dominant aktivem MKK3 und MKK6 ....	108
3.3.16 Keratinphosphorylierung und Keratingranulabildung durch MKK3- und MKK6-vermittelte p38-Aktivierung .....	108
3.3.17 Anisomycin-induzierte Keratingranulabildung .....	110
3.3.18 p38-Aktivitäts-Abhängigkeit der Keratinbewegung, der Keratinfilamentneubildung und des Keratingranula Abbau .....	110
<b>4. DISKUSSION</b> .....	<b>113</b>
<b>4.1 Entstehung und Motilität der KFP</b> .....	<b>113</b>
<b>4.2 Einfluss von Aktinfilamenten und MT auf die Dynamik des Keratinnetzwerks</b> .....	<b>118</b>
<b>4.3 p38 als Regulator der Keratinnetzwerkorganisation</b> .....	<b>122</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>129</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>130</b>
<b>7. ANHANG</b> .....	<b>147</b>
<b>7.1 Filmlegenden</b> .....	<b>147</b>
<b>7.2 Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>150</b>
<b>7.3 Firmenverzeichnis</b> .....	<b>153</b>

# 1. Einleitung

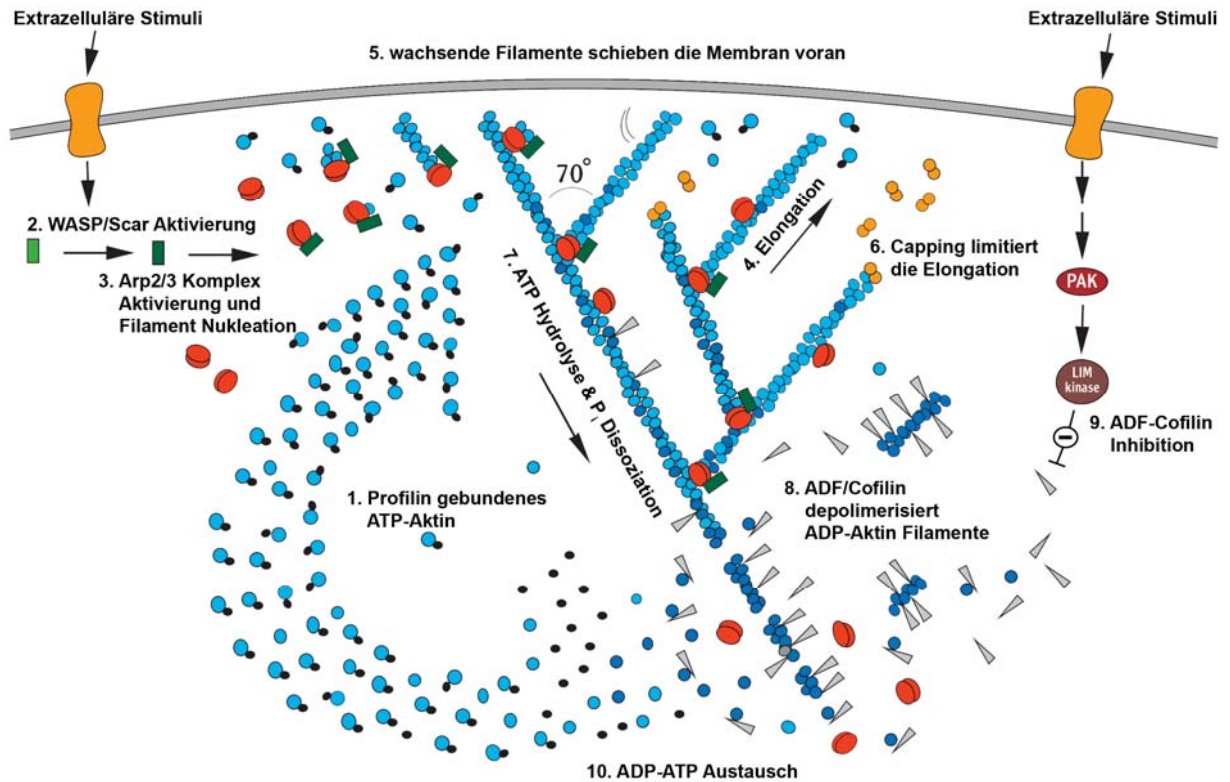
## 1.1 Das Zytoskelett der eukaryotischen Zellen

Das Zytoskelett der eukaryotischen Zelle ist ein fein gegliedertes, filamentöses Netzwerk, das hauptsächlich aus drei Komponenten aufgebaut ist, den Aktinfilamenten (AF), den Mikrotubuli (MT) und den Intermediärfilamenten (IF). Die Aufgaben des Zytoskeletts umfassen nicht nur die mechanische Stabilisierung von Zellen, sondern beinhalten auch Funktionen bei der Zellteilung, der Migration, der Stressantwort und beim Transport von Proteinen, Vesikeln und Organellen innerhalb der Zelle. Die drei unterschiedlich aufgebauten Filamentsysteme übernehmen in spezifischer Art und Weise diese verschiedenen Aufgaben.

### 1.1.1 Aktin

Aktin ist in vielen eukaryotischen Zellen eines der am häufigsten vorkommenden Proteine. Im submembranösen Bereich der Zellen bildet es ein dreidimensionales kortikales Netzwerk aus Aktinfilamenten. Diese auch als Mikrofilamente bekannten Strukturen haben einen Durchmesser von 4–6 nm. Aktinfilamente (F-Aktin) sind polare Polymere, die durch ATP-abhängige Polymerisierung aus globulärem Aktin (G-Aktin) entstehen (dos Remedios *et al.*, 2003). Die Polymerisierung des Aktins kann gleichermaßen an beiden Enden der Filamente stattfinden. Tatsächlich erfolgt sie jedoch überwiegend am so genannten Plus-Ende (+) und wird dort durch das Aktin bindende Protein (ABP) Profilin unterstützt (siehe Abb. 1.1). Sein Antagonist Cofilin, ein weiteres ABP, fördert die Depolymerisierung und somit den Abbau der Aktinfilamente am Minus-Ende (-). Weitere Regulatoren der Polymerisierung und der Verästelung von Aktinfilamenten sind unter anderem Capping Proteine (z.B. CapZ, Tropomodulin) und der Arp 2/3 Komplex (Amann und Pollard, 2001; Small *et al.*, 2002; dos Remedios *et al.*, 2003). Die Vernetzung von Aktinfilamenten zu Bündeln, wie sie unter anderem in Stressfasern vorkommen, erfolgt durch zahlreiche weitere ABP, zu denen  $\alpha$ -Actinin, Fascin, Fimbrin, Spektrin und Filamin gehören (Small *et al.*, 2002).

Die Polymerisierung der Aktinfilamente kann durch verschiedene Inhibitoren verhindert werden. Besonders wirksam und in ihrem Gebrauch stark verbreitet sind hierbei die Inhibitoren Latrunculin B (Spector *et al.*, 1983) und Cytochalasin D (Wodnicka *et al.*, 1992).

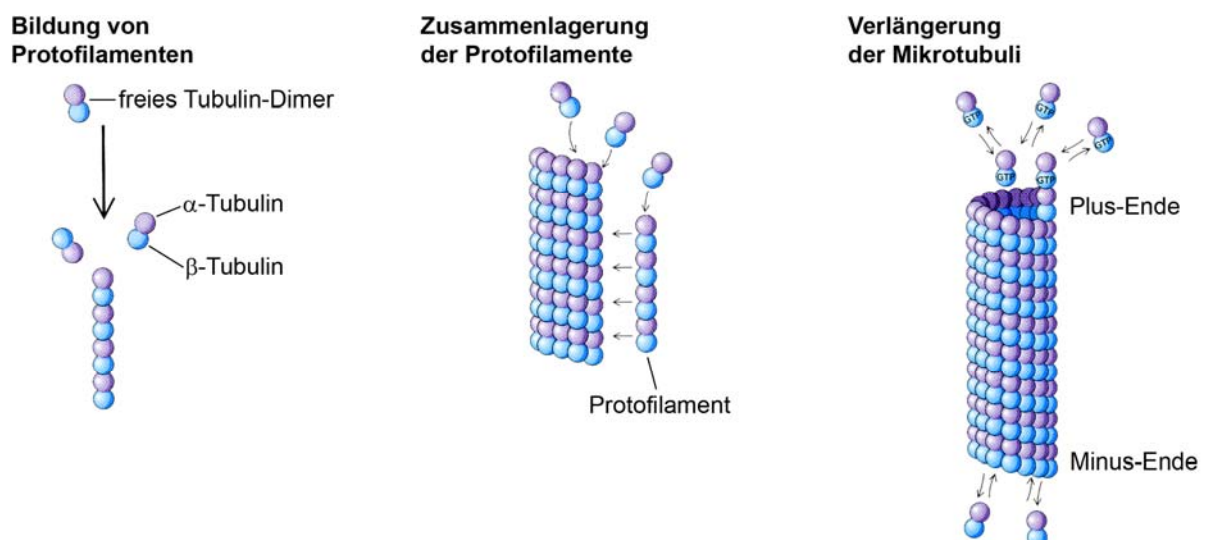


**Abbildung 1.1: Regulation der Aktinfilament-Organisation in der Zellperipherie.** Modell des Aktin-„Treadmilling“ in der Zellperipherie. Durch extrazelluläre Stimuli wird WASP/Scar aktiviert (grün). Dadurch kommt es zur Aktivierung des Arp2/3 Komplexes (rot), der sich an Profilin-gebundenes Aktin anlagert (blau) und als Nukleationszentrum für die Bildung eines neuen Aktinfilamentes dient. Durch Anlagern von weiteren Aktin-Profilin-Komplexen wächst das Aktinfilament. Nach dem Wachstum wird die Spitze des Aktinfilaments von „Capping“-Proteinen (gelb) besetzt, die eine weitere Elongation verhindern. Der Abbau der Aktinfilamente erfolgt dann am entgegengesetzten Minus-Ende und wird durch das Protein Cofilin (grau) beschleunigt. Abbildung modifiziert nach (Pollard *et al.*, 2001).

Zu den Aufgaben der Aktinfilamente zählt der Transport von Proteinen. Dieser Transport erfolgt mit Hilfe von assoziierten Motorproteinen, den Myosinen (Evans und Bridgman, 1995; Goodson *et al.*, 1997; Small *et al.*, 2002). Ein Beispiel für einen solchen Transportvorgang ist der Transport des Sehpigments Rhodopsin durch das assoziierte Motorprotein Myosin VIIa (Liu *et al.*, 1997; Wolfrum und Schmitt, 2000; Schmitt und Wolfrum, 2001). Weitere Aufgaben von Aktin sind die Etablierung der Zellpolarität (Louvard, 1996), die Beteiligung an der Kontraktion und Migration von Zellen (Small *et al.*, 2002) sowie die mechanische Stabilisierung von Zellen. Letztere Funktion erfüllt Aktin durch die Ausbildung des bereits erwähnten kortikalen Netzwerks, welches durch die Verknüpfung der Aktinfilamente mit Adhärens-Kontakten, Verschluss-Kontakten (*engl. tight-junctions*) oder fokalen Kontakten (Petit und Thiery, 2000) zusätzlich stabilisierend auf die Zellen wirkt.

### 1.1.2 Mikrotubuli

Mikrotubuli bestehen aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin Heterodimeren, welche sich unter GTP-Verbrauch zu Protofilamenten zusammenfügen. In der Regel lagern sich 13 Protofilamente zu einem Mikrotubulus mit einem Durchmesser von 20–25 nm zusammen (Wade und Hyman, 1997; Downing und Nogales, 1998). Der Aufbau, die Polarität und die Richtung der Mikrotubuli werden vom Mikrotubulusorganisationszentrum (MTOC) bestimmt. Dabei handelt es sich in tierischen Zellen um das Centrosom, mit dem die Mikrotubuli über ihr Minus-Ende assoziiert sind (Musch, 2004). Der Aufbau der Mikrotubuli wird hauptsächlich über das freie Plus-Ende reguliert. Durch Polymerisation in diesem Bereich können die Mikrotubuli wachsen (Wade und Hyman, 1997) und bei Bedarf durch Depolymerisation verkürzt werden (Abb. 1.2). Die Regulation des Mikrotubuluswachstums wird durch Mikrotubulus-assoziierte Proteine (MAP) gesteuert. Unter anderem spielen hierbei CLIP und EB Proteine eine wichtige Rolle (Komarova *et al.*, 2005; Vaughan, 2005).



**Abbildung 1.2: Bildung von Mikrotubuli.** Anlagern von alpha- und beta-Tubulinuntereinheiten zu Protofilamenten. Diese Protofilamente bilden dann durch laterale Anlagerung von 13 Protofilamenten einen Mikrotubulus. Der Mikrotubulus wächst dann durch das Anlagern von Tubulin-Dimeren. Diese Elongation des Mikrotubulus findet präferentiell am Plus-Ende des Tubulus statt. Abbildung modifiziert nach „Molekulare Zellbiologie“ von H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. Zipursky, P. Matsudaira und J. Darnell (1996).

Mikrotubuli erfüllen ähnlich wie Aktinfilamente unterschiedliche Aufgaben. Sie beeinflussen die Zellpolarität (Musch, 2004), bilden Teilungsspindeln in der Mitose (McIntosh und Hering, 1991), beteiligen sich an der Apoptose (Moss und Lane, 2006) und dienen dem intrazellulären Transport von Proteinen, Vesikeln und ganzen Organellen (Rosenbaum, 2000; Kamal und Goldstein, 2002; Hollenbeck und Saxton, 2005; Vaughan, 2005).

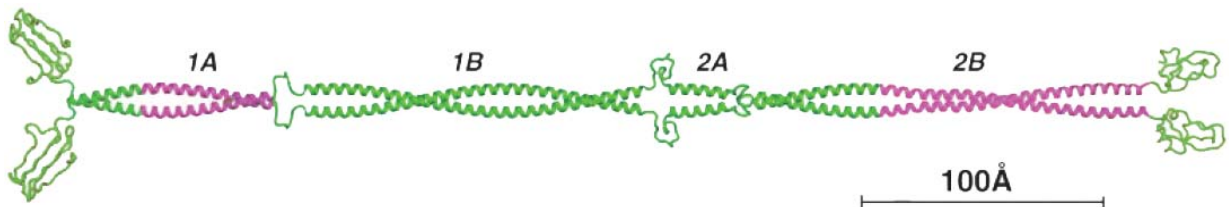
Der Transport entlang von Mikrotubuli wird durch Kinesine und Dyneine vermittelt, die als Motorproteine fungieren. Dyneine sind für den retrograden Transport in Richtung des Minus-



Endes der Mikrotubuli verantwortlich (Schnapp und Reese, 1989), Kinesine im allgemeinen für anterograd gerichtete Transportvorgänge in Richtung des Plus-Endes (Kamal und Goldstein, 2000). Mikrotubuli können in Zellen mit Hilfe von Nocodazol und Colchicin zerstört werden (Luduena und Roach, 1991).

### 1.1.3 Intermediärfilamente

Die Bezeichnung Intermediärfilamente (IF) geht auf ihre Größe zurück. Mit einem Durchmesser von 8-12 nm liegen sie zwischen den kleineren Aktinfilamenten und den größeren Mikrotubuli. Im Gegensatz zu diesen Zytoskelettkomponenten sind die IF evolutionär weniger stark konserviert, besitzen einen unpolaren Aufbau und bilden eine heterogene, aus zahlreichen Proteinen (>70 Intermediärfilament Proteine) bestehende Gruppe. Aufgrund von Sequenzhomologien wurden diese Proteine in 6 Multigenfamilien zusammengefasst. Trotz dieser hohen Diversität besitzen die zytoplasmatischen IF-Polypeptide einen gemeinsamen Grundaufbau. Eine mittelständige, weitgehend konservierte  $\alpha$ -Helix aus ca. 310 Aminosäuren wird von einem variablen Kopf- und Schwanzbereich eingefasst (Abb. 1.3) Unter bestimmten Voraussetzungen (Salzkonzentration, pH-Wert, Temperatur) sind die IF-Polypeptide *in vitro* in der Lage, sich auch in Abwesenheit von ATP oder GTP spontan aus ihren Grundeinheiten zu komplexen, schwer löslichen Filamenten zusammenzusetzen (Zackroff und Goldman, 1979; Strelkov *et al.*, 2003).



**Abbildung 1.3: Aufbau der Intermediärfilamente.** Modell eines IF-Dimers. Kristallographisch bestimmte und modellierte Regionen sind in magenta bzw. grün dargestellt. Die vier alpha-helikalen Domänen 1A, 1B, 2A und 2B werden durch die Linker-Domänen miteinander verbunden. Die Kopf- und Schwanz-Regionen sind in einer geschlossenen Konformation dargestellt. Abbildung modifiziert nach Strelkov *et al.* 2003.

Die Expression der IF erfolgt zelltypspezifisch. Daher eignen sie sich ausgezeichnet als gewebespezifische Marker. Diese Eigenschaft macht man sich in der Tumordiagnostik zu Nutze (Moll, 1998).

Bis vor Kurzem wurden die IF funktionell lediglich als Stützelemente der Zelle angesehen. Aktuelle Untersuchungen lassen jedoch vermuten, dass ihnen weitere Funktionen zukommen. So sind unter anderem Mutationen und Veränderungen in der Expression von IF mit zahlreichen Erkrankungen assoziiert und lassen auf eine zytoprotektive Wirkung intakter IF schließen (Omary *et al.*, 2006).

**Tabelle 1.1:** Die IF-Proteinfamilie (modifiziert nach Omary *et al.*, 2006).

IF Bezeichnung	Typ	Vorkommen	Assoziierte Erkrankungen
<b>Zytoplasmatisch</b>			
„Saure“ Keratine (K9-20)	I	Epithelial (Haar K 31–40)	Blasen-bildende Erkrankungen der Haut; Monilethrix (Spindelhaare),
„Basische“ Keratine (K1-8, K71-80)	II	Epithelial (Haar K 81–86)	erhöhtes Risiko von Lebererkrankungen
Vimentin	III	Mesenchymal	Unbekannt
Desmin		Muskulär	Kardiomyopathie
GFAP		Astrocyten	Alexander Krankheit
Peripherin		Neuronal	Amyotrophe Lateralsklerose
Syncoilin		Muskulär	Unbekannt
Neurofilament – L	IV	Neuronal	Axonale Charcot-Marie-Tooth Krankheit
Neurofilament – M		Neuronal	Unbekannt
Neurofilament – H		Neuronal	Risiko für Amyotrophe Lateralsklerose
$\alpha$ -Internexin		Neuronal	Unbekannt
Nestin		Neuroepithelial	Unbekannt
Synemin ( $\alpha$ , $\beta$ )		Muskulär	Unbekannt
<b>Nukleär</b>			
Lamin A/C	V	Kern-Lamina	Hutchinson-Gilford Progerie, Limb-Girdle Muskeldystrophie u.v.m.
Lamin B1, B2		Kern-Lamina	Unbekannt
<b>Sonstige</b>			
Phakinin (CP49)		Linse	Grauer Star
Filensin (CP115)		Linse	Unbekannt

Eine wichtige Aufgabe der IF ist die Protektion der Zellen gegenüber mechanischem Stress. Diese Funktion erfüllen sie durch ihre hervorragenden viskoelastischen Eigenschaften (Janmey *et al.*, 1998) und durch ihre Verknüpfung mit Desmosomen und Hemidesmosomen (Kartenbeck *et al.*, 1983; Kartenbeck *et al.*, 1984; Green und Gaudry, 2000; Kottke *et al.*, 2006). Die IF haben außerdem Einfluss auf die Steuerung des Zellzyklus (Toivola *et al.*, 2001) und beeinflussen Apoptose und Proliferation der Zellen (Paramio *et al.*, 1999; Gilbert *et al.*, 2001; Inada *et al.*, 2001; Toivola *et al.*, 2001; Ku und Omary, 2006). Sie schützen die Zelle vor zytotoxischen Einflüssen (Inada *et al.*, 2001) und verstärken ihre Resistenz gegen Drogen (Bauman *et al.*, 1994). Zusätzlich spielen IF eine wichtige Rolle bei der Positionierung von Organellen in der Zelle und dem „targeting“ von Proteinen zu subzellulären Kompartimenten (Georgatos und Maison, 1996; Toivola *et al.*, 2005).

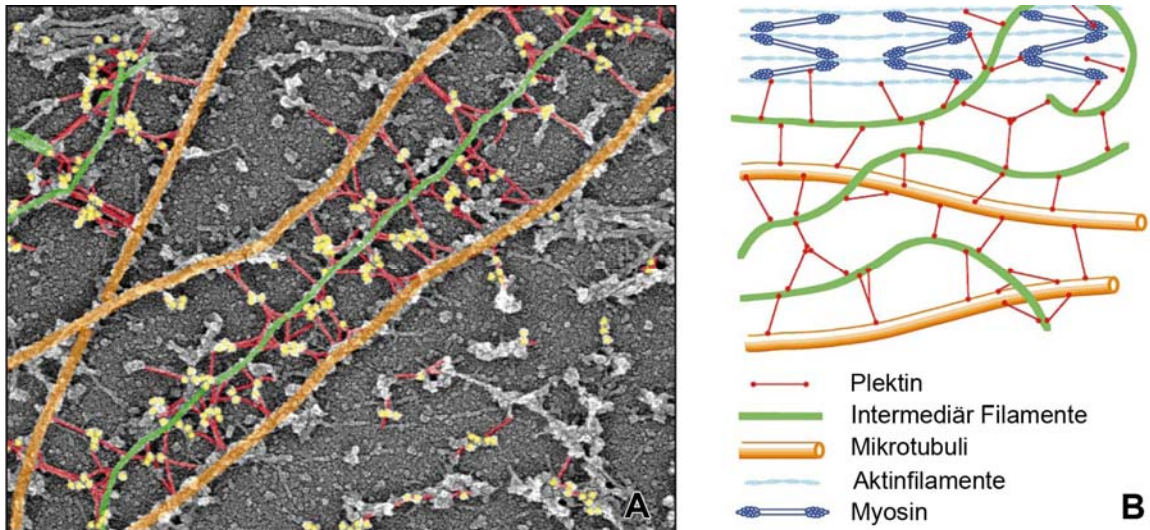
Bei der Erfüllung dieser zahlreichen Funktionen werden die IF von den so genannten Intermediärfilament-assoziierten-Proteinen (IFAP) unterstützt. In Abhängigkeit von der IF-

Klasse und dem untersuchten Zelltyp wurden unterschiedliche IFAP beschrieben (Coulombe *et al.*, 2000; Coulombe und Wong, 2004; Izawa und Inagaki, 2006). Sie unterstützen die IF in ihren Funktionen und spielen wahrscheinlich auch eine wichtige Rolle bei der Regulation des IF-Auf- und -Abbaus. Bisher ist allerdings nicht bekannt, wie diese Regulation der IF-Organisation durch die IFAP erfolgt und welche IFAP daran beteiligt sind.

#### **1.1.4 Interaktion und Verknüpfung der drei Zytoskelett - Komponenten**

Die Erfüllung der zahlreichen Aufgaben des Zytoskeletts erfordert eine schnelle, koordinierte Reaktion. Diese kann nur erbracht werden, wenn die drei Hauptkomponenten des Zytoskeletts, miteinander verknüpft sind. In älteren Studien finden sich hinsichtlich dieser Verknüpfung in Bezug auf die IF widersprüchliche Ergebnisse: So zeigten Versuche, bei denen der Abbau der MT bzw. der Aktinfilamente pharmakologisch induziert wurde, dass eine solche Zerstörung zu einer Reorganisation der IF führt (Goldman, 1971; Hynes und Destree, 1978; Osborn *et al.*, 1980; Celis *et al.*, 1984). Laut anderen Studien erfolgt diese Reorganisation der IF allein durch die Zerstörung der MT und ist unabhängig vom Abbau der Aktinfilamente (Gordon, W. E., 3rd *et al.*, 1978). Wiederum anderen Untersuchungen zufolge führte weder die Behandlung mit Aktinfilament zerstörenden, noch die Behandlung mit Mikrotubuli zerstörenden Substanzen zu einer Veränderung in der Organisation der IF, die kombinierte Applikation der beiden Drogen hingegen schon (Osborn *et al.*, 1977; Knapp *et al.*, 1983).

Aktuelle Erkenntnisse deuten auf eine molekulare Verknüpfung der verschiedenen Zytoskelettkomponenten hin. So genannte „Linker-Proteine“ verknüpfen Aktinfilamente, MT und IF miteinander (Fuchs und Yang, 1999; Karakesisoglou *et al.*, 2000; Fuchs und Karakesisoglou, 2001). Linker-Proteine stammen unter anderem aus der Familie der Plakine. Dabei handelt es sich um sehr große Proteine (200–700 kDa), die in der Lage sind, Zytoskelettnetzwerke miteinander zu verbinden bzw. diese an Organellen und Adhäsionsstrukturen der Zellen zu verankern (Abb. 1.4; Wiche, 1998; Houseweart und Cleveland, 1999; Fuchs und Karakesisoglou, 2001; Leung *et al.*, 2002). Eines der vielseitigsten Plakine ist Plektin. Plektin verknüpft, je nach exprimierter Spleißform, zytoplasmatische IF, Hemidesmosomen,  $\alpha$ -Spectrin, Desmosomen, Mikrotubulus-assoziierte Proteine (MAP), Aktinfilamente und Proteine der Kernhülle miteinander (Wiche *et al.*, 1982; Andra *et al.*, 1997; Rezniczek *et al.*, 1998; Schaapveld *et al.*, 1998; Wiche, 1998; Steinbock und Wiche, 1999; Fuchs und Karakesisoglou, 2001).



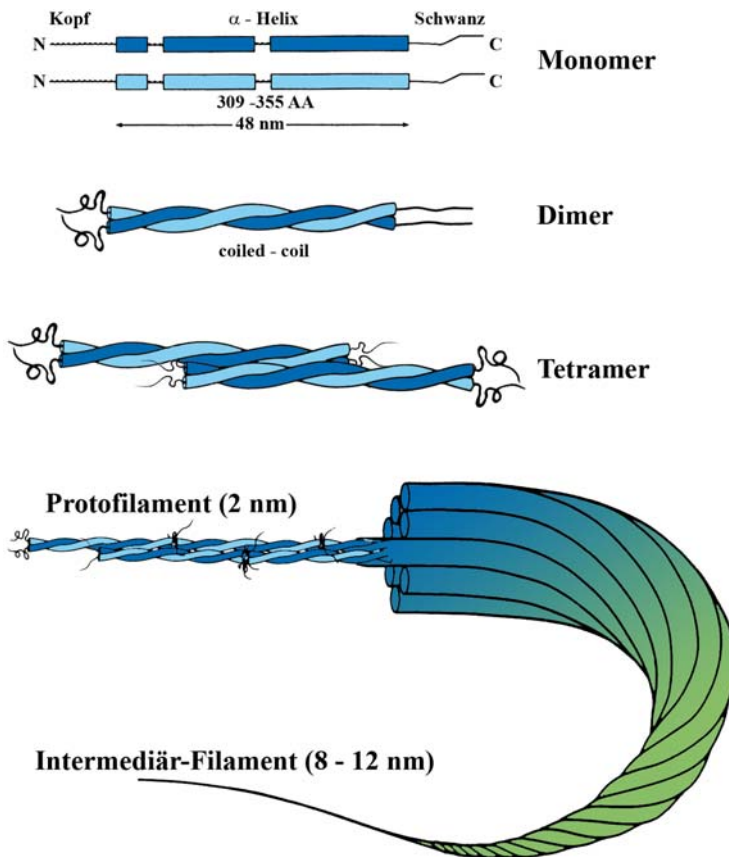
**Abbildung 1.4: Verknüpfung von Zytoskelettkomponenten durch Myosin und Plektin.** (A) Elektronenmikroskop-Aufnahme des Zytoskelett in Ratten-Fibroblasten nach Ablösen der Aktinfilamente mit Gelsolin. Die Gold-Partikelmarkierung (gelb) von Plektin (rot) zeigt, dass Plektin die Mikrotubuli (orange) mit den Vimentin-Filamenten (grün) verbindet. (B) Modellvorschlag der Vernetzung von Aktinfilamenten (hellblau), Intermediärfilamenten (grün), Mikrotubuli (gelb) und Myosin (dunkelblau) durch Plektin-Moleküle (rot). Abbildung modifiziert nach (Fuchs und Cleveland, 1998).

Neben diesen potenten „*cross-linkern*“ spielen außerdem Motorproteine wie Kinesin (Prahla *et al.*, 1998), Dynactin und Dynein eine wichtige Rolle bei der Interaktion der Zytoskelettkomponenten (Helfand *et al.*, 2003a; Helfand *et al.*, 2004). So ist unter anderem bekannt, dass Neurofilamente bidirektional entlang von Mikrotubuli transportiert werden (Shah *et al.*, 2000; Helfand *et al.*, 2003b).

## 1.2 Keratin

### 1.2.1 Aufbau und Struktur der Keratine

In Epithelzellen werden die Intermediärfilamente aus Keratinen aufgebaut. Mit über 54, für unterschiedliche Proteine kodierenden, Genen (Hesse *et al.*, 2001; Hesse *et al.*, 2004; Rogers *et al.*, 2004; Rogers *et al.*, 2005; Schweizer *et al.*, 2006) stellen die Keratine die größte Multigenfamilie der Intermediärfilamentproteine (Typ I und II). Sie bilden obligate Heteromere, wobei jeweils ein Typ I Keratin (Keratin 9–20) mit einem Typ II Keratin (Keratin 1-8, 71-80) dimerisiert (Coulombe und Fuchs, 1990; Hatzfeld und Weber, 1990). Wie alle Intermediärfilamente, bestehen auch die Keratine aus einer stabförmigen, zentralen Domäne (rod). Sie ist aus vier  $\alpha$ -helikalen Subdomänen (1A, 1B, 2A, 2B) zusammengesetzt, welche untereinander durch drei Linker-Regionen verbunden sind (L1, L12, L2). Anfang und Ende dieser zentralen Domäne bilden 15-20 Aminosäuren, die stark konservierte Bereiche der Keratine markieren. N-terminal wird die zentrale Domäne von einer nicht-helikalen Kopf-



**Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des molekularen Bauprinzips der Keratinfilamente.**

Die monomeren Untereinheiten bestehen aus einer Kopf-, Zentral- und Schwanzregion. Die Zentralregion wird aus einer hochkonservierten  $\alpha$ -Helix (48 nm) gebildet, die nur durch kurze nicht-helikale „Spacer“ unterbrochen wird und die zusammen mit der  $\alpha$ -Helix eines weiteren Monomers die coiled-coil Struktur der Dimere bildet. Diese Dimere lagern sich dann, wahrscheinlich in versetzter Anordnung mit einem anderen Dimer zu einem Tetramer zusammen. Die Tetramere assoziieren longitudinal sowie lateral und bilden auf diese Weise die 2 nm dicken Protofilament-Untereinheiten. Mehrere dieser Protofilamente bilden das 8–12 nm dicke Intermediär-Filament. Abbildung modifiziert (Leube und Kartenbeck, 1996).

Domäne (*head*) und C-terminal von einer ebenfalls nicht-helikalen Schwanzdomäne (*tail*) eingefasst (Coulombe und Omary, 2002).

Der Mechanismus der Filamentbildung ist, im Gegensatz zu den Mechanismen, die zur Bildung der Aktinfilamente und Mikrotubuli führen, noch weitestgehend ungeklärt (Steinert, 1991; Herrmann und Aebi, 1998; Herrmann *et al.*, 1999). Allgemein wird jedoch angenommen, dass zunächst lösliche Untereinheiten gebildet werden. Diese bestehen aus zwei Keratinproteinen, welche sich parallel aneinander lagern und mit ihren helikalen Zentraldomänen eine *coiled-coil* Struktur bilden (Hatzfeld und Weber, 1990; Herrmann und Aebi, 1998; Herrmann und Aebi, 1999; Parry und Steinert, 1999; Herrmann und Aebi, 2004). Jeweils zwei dieser Dimere fügen sich dann antiparallel zu Tetrameren zusammen (Quinlan *et al.*, 1985; Coulombe und Fuchs, 1990; Steinert *et al.*, 1994). Es wird allgemein angenommen, dass aus diesen Tetrameren wiederum größere Untereinheiten und schließlich Protofilamente entstehen (Abb. 1.5). Durch die Verwendung entsprechender, trunkierter Keratine konnte gezeigt werden, dass alleine die stabförmige Zentraldomäne ausreichend für die Bildung der Tetramere ist (Hatzfeld und Burba, 1994; Kreplak *et al.*, 2004). Aus diesen Tetrameren können jedoch keine Filamente gebildet werden. Bereits vor einigen Jahren wurde gezeigt, dass für das Entstehen von Keratinfilamenten die Kopfreion der Keratine essentiell ist.

Wurde diese Region deletiert, fand keine Filamentbildung mehr statt, lediglich lösliche Keratinuntereinheiten konnten nachgewiesen werden (Hatzfeld und Burba, 1994).

Eine Besonderheit im Aufbau der Keratinfilamente ist die, verglichen mit Aktinfilamenten und Mikrotubuli, fehlende Polarität, die auf die antiparallele Anordnung der Dimere bei der Entstehung der Tetramere zurückzuführen ist (Parry und Steinert, 1999; Coulombe und Omary, 2002; Strelkov *et al.*, 2003). Das Keratinnetzwerk der Zellen scheint keinen distinkten Anfang und kein lokalisierbares Ende zu besitzen. Anders als Mikrotubuli und Aktinfilamente können Keratinfilamente außerdem *in vitro*, ohne Zufuhr von Energie, spontan polymerisieren und so aus löslichen Untereinheiten Keratinfilamente erzeugen (Steinert *et al.*, 1976; Fuchs und Weber, 1994; Herrmann und Aebi, 2000; Herrmann und Aebi, 2004), die ebenso wie *in vivo* gebildete Keratinfilamente, nur noch sehr schlecht löslich sind (Coulombe und Fuchs, 1990; Helfand *et al.*, 2004).

Als *in vivo* Entstehungsort der Keratinfilamente wurden verschiedenste Nukleationszentren vorgeschlagen. Unter anderem wurde der Nukleus als Ort der Filamentbildung postuliert (Eckert, B. S. *et al.*, 1982; Georgatos und Blobel, 1987; Albers und Fuchs, 1989). Auch Mikrotubuli und Aktinfilamente (Knapp *et al.*, 1983; Celis *et al.*, 1984) sowie Desmosomen und Hemidesmosomen (Knapp *et al.*, 1983; Bologna *et al.*, 1986) wurden als Nukleationszentren der Keratine genannt. Viele Arbeiten beschreiben keinen festen Ort für die Nukleation der Keratine. Sie postulieren vielmehr eine Entstehung der Keratinfilamente im gesamten Zytoplasma (Kreis *et al.*, 1983; Magin *et al.*, 1990). Aktuelle Untersuchungen nennen hingegen den submembranösen Bereich der Zellen (Windoffer und Leube, 1999; Windoffer und Leube, 2001) als Nukleationszentrum der Zytokeratine. In diesem Bereich konnten kurze Keratinfilamentvorläufer (KFP; *engl. Keratin filament precursor*) detektiert werden, die langsam in Richtung des Zellzentrums transportiert wurden (Habilitationsschrift Reinhard Windoffer, Johannes-Gutenberg Universität Mainz, 2002).

Die Expression der verschiedenen Keratine ist abhängig vom untersuchten Gewebe und vom Differenzierungsgrad der Zellen (Quinlan *et al.*, 1985; Fuchs, 1993; Moll, 1993). Es wird angenommen, dass die Expression der verschiedenen Keratine von der Funktion der Gewebe und dem Umgebungsstress abhängig ist. Dementsprechend wurde postuliert, dass die Viskoelastizität des Keratinfilamentnetzwerks durch die Expression unterschiedlicher Keratine an die Bedürfnisse der Zellen angepasst werden kann (Paladini *et al.*, 1996; Coulombe und Wong, 2004; Kim *et al.*, 2006).

### 1.2.2 Funktionen der Keratine

Eine wichtige Funktion der Keratine ist der Schutz der Zellen vor mechanischem Stress. Die Keratinfilamente sind in der Zelle so angeordnet, dass sie ein Filamentgerüst bilden, das maßgeblich zur Zellintegrität beiträgt und die Zellen effektiv gegen mechanische Belastungen schützt. Über Desmosomen sind die Keratinfilamente der Zellen außerdem mit dem Filamentnetzwerk der benachbarten Zellen verbunden (Kelly, 1966; Kouklis *et al.*, 1994). Durch diese transzellulären Verknüpfungen der Keratinfilamente können Kräfte, die auf wenige Zellen einwirken, großflächig auf den gesamten Zellverband verteilt werden. Mechanischer Stress, der auf einzelne Zellen einwirkt, wird dadurch stark reduziert. Mittels Hemidesmosomen sind die Keratinfilamente der Basalzellen mehrschichtiger Epithelien außerdem mit der extrazellulären Matrix verbunden.

Zahlreiche Erkrankungen lassen erkennen, wie wichtig diese Keratin-vermittelte Stabilisierung ist. Ein Beispiel hierfür ist die humane Hauterkrankung *Epidermolysis bullosa simplex* (EBS). Mutationen in den Keratinen 5 und 14 führen zu dieser genetisch bedingten Erkrankung, die sich bereits bei leichten Traumata in der Bildung von Blasen äußert (Irvine und McLean, 1999; Coulombe und Omary, 2002). Untersuchungen der häufigsten Form von EBS, der Dowling Meara Variante, zeigten, dass eine Punktmutation im Bereich der zentralen stabförmigen Domäne von Keratin 14 zu einem Austausch in Codon 125 führt. Diese dominant-negative Mutation hat eine Keratinaggregation in den betroffenen Zellen zur Folge (Anton-Lamprecht, 1994; Premaratne *et al.*, 2002). Aufgrund dieser Aggregation kann kein stützendes Keratinfilamentgerüst gebildet werden, wodurch es zur Störung der Gewebestabilität kommt (Kitajima *et al.*, 1989; Coulombe *et al.*, 1991). Applizierter mechanischer Stress kann somit nicht mehr durch die Keratinfilamente aufgefangen werden (D'Alessandro *et al.*, 2002) und es bilden sich intraepitheliale Blasen in der Haut der Patienten.

Keratine erfüllen zahlreiche weitere Aufgaben. Sie haben Einfluss auf die Zellproliferation, das Zellwachstum und die Expression von Proteinen (Paramio *et al.*, 1999; Paramio *et al.*, 2001). So wurde beispielsweise bei der Wundheilung von Epithelien eine erhöhte Expression von Keratin 17 detektiert (Kim *et al.*, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass diese erhöhte Expression über assoziierte 14-3-3 $\sigma$ -Proteine die Proteinsynthese und das Zellwachstum in betroffenen Geweben reguliert und dadurch eine schnellere Wundheilung ermöglicht (Kim *et al.*, 2006).

Eine weitere Funktion der Keratine ist der Schutz der Zellen vor metabolischem Stress. So konnte nachgewiesen werden, dass die Expression der Keratine in Hepatozyten eine



zytoprotektive Wirkung gegen die zytotoxischen Einflüsse von Alkohol und anderen Drogen hat (Zatloukal *et al.*, 2000). Außerdem konnte in Hepatozyten gezeigt werden, dass Mutationen in der Nukleotidsequenz der Keratine, die zu Konformationsänderungen der Proteine führen, eine erhöhte Prädisposition der Zellen für Apoptoseereignisse und Lebererkrankungen nach sich ziehen (Ku und Omary, 2006).

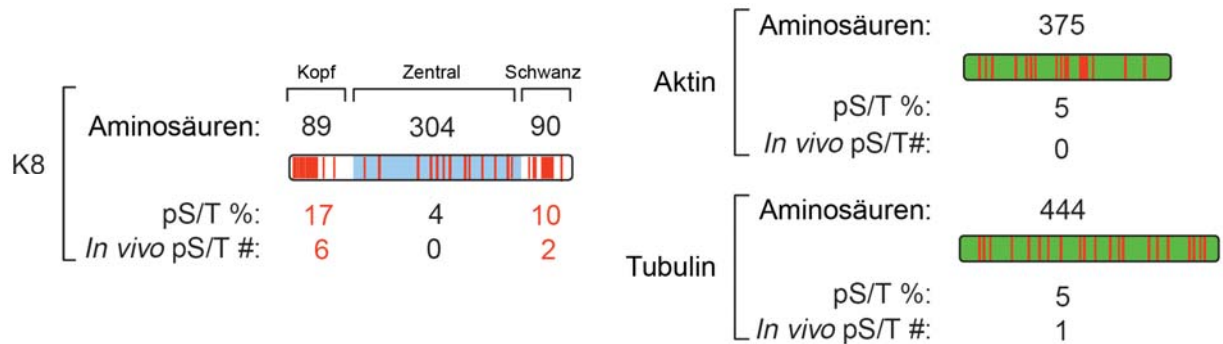
Keratine sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auch an der Lokalisierung von Organellen beteiligt. So konnte bei einigen EBS-Patienten eine abweichende Verteilung von Mitochondrien und Melanosomen beobachtet werden (Uttam *et al.*, 1996; Toivola *et al.*, 2005). Das Fehlen des Keratinnetzwerks führte außerdem in den Huh7 und OUMS29 Leberzelllinien zu einer veränderten Verteilung des Golgi-Apparates (Uttam *et al.*, 1996).

Das Fehlen von Keratinen kann des Weiteren zu einer Störung im *targeting* der Proteine und in der Lokalisierung von Organellen führen (Toivola *et al.*, 2005). So kommt es in K8-null Hepatozyten beispielsweise zu einer Fehllokalisierung der Fas-Rezeptoren (Gilbert *et al.*, 2001). In Zellen, in denen die Keratin 18<sub>R89C</sub>-Mutante exprimiert wurde, konnte ein Abbau des Keratinfilamentnetzwerks und eine Fehlverteilung des Golgi-Apparates beobachtet werden (Kumemura *et al.*, 2004).

### 1.2.3 Phosphorylierung der Keratine

Durch welche Mechanismen die intrazelluläre Organisation der Keratinfilamente *in vivo* reguliert wird, ist bisher nicht geklärt. Ein viel versprechender Ansatz zur Aufklärung dieser Mechanismen befasst sich mit der Phosphorylierung der Keratine. Die Regulation von Proteinaktivität durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung ist ein weit verbreiteter Vorgang in eukaryotischen Zellen. Auch bei den Keratinen scheint diese Form der posttranslationalen Regulation eine wichtige Rolle zu spielen (Omary *et al.*, 2006; Tao *et al.*, 2006). Keratine weisen eine Vielzahl an potentiellen Phosphorylierungsstellen auf. Der Großteil dieser Serin-, Tyrosin- und Threonin-Phosphorylierungsstellen ist im Bereich der Kopf- und Schwanzdomänen lokalisiert. In der zentralen, stabförmigen Domäne hingegen finden sich nur wenige Phosphorylierungsstellen (siehe Abb. 1.6). Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass durch die *coiled-coil* Struktur der Heteromere *in vivo* nur ein limitierter Zugang zu den Phosphorylierungsstellen der zentralen Domäne gegeben ist. Die Kopf- und Schwanzregion hingegen ist für Kinasen und Phosphatasen gut erreichbar. Mit Ausnahme einiger konservierter Phosphorylierungsstellen, ist der Großteil der Phosphorylierungsstellen von Keratin zu Keratin variabel (Omary *et al.*, 2006). Es wurde postuliert, dass diese unterschiedliche Verteilung der Phosphorylierungsstellen die unter-





**Abbildung 1.6: Anzahl und Lokalisierung potentieller Phosphorylierungsstellen von Keratin 8, Aktin und Tubulin.** Schematische Darstellung der Phosphogramme von Keratin 8, Aktin und Tubulin. Vergleich der Anzahl und Lokalisierung von potentiellen Phosphorylierungsstellen (rot) mit Hilfe des NetPhos 2.0 Programms. Die Zentraldomäne (blau) und die Kopf- und Schwanzregion (weiß) von Keratin 8 bzw. die Gesamtsequenz von Aktin und Tubulin (grün) sind farblich markiert. Der Prozentsatz der vorhergesagten, potentiellen Serin bzw. Threonin Phosphorylierungsstellen (pS/T %) wurde berechnet, indem die Menge der vorhergesagten Phosphorylierungsstellen durch die Anzahl der Aminosäuren der verschiedenen Domänen dividiert wurde. Zusätzlich wurde die Anzahl der *in vivo* detektierten Phosphorylierungsstellen (*in vivo* pS/T) angegeben. Abbildung modifiziert nach (Omary *et al.*, 2006).

schiedlichen Regulations- und Funktionseigenschaften der verschiedenen Keratine widerspiegelt (Coulombe und Omary, 2002).

Für eine Regulation der Keratinfilamentorganisation über posttranslationale Phosphorylierungen der Keratine spricht die Tatsache, dass die Inkubation von Zellen mit Drogen, die die Phosphorylierung der Zelle beeinflussen, zu einem Rearrangement der Keratinfilamente führt. So konnte durch Inkubation mit dem Phosphatase-Inhibitor Orthovanadat (OV) die Organisation des Keratinfilamentnetzwerks drastisch verändert werden. Die Keratinfilamente wurden innerhalb von Minuten vollständig abgebaut und es bildeten sich Keratingranula, die den Granula mitotischer Zellen ähnelten (Strnad *et al.*, 2002). Umgekehrt konnte in Situationen, in denen es zu einem Rearrangement der Keratinfilamente kommt, wie beispielsweise in der Mitose, auch eine Erhöhung der Keratinphosphorylierung detektiert werden (Celis *et al.*, 1983; Ku *et al.*, 1998; Omary *et al.*, 1998; Toivola *et al.*, 2002; Omary *et al.*, 2006).

Auch bei Verletzungen und Erkrankungen, die oft mit einer Reorganisation der Keratinfilamente und einem veränderten Expressionsmuster der Keratine einhergehen, kommt es häufig zu einer Hyperphosphorylierung (Liao *et al.*, 1997; Toivola *et al.*, 2002; Ridge *et al.*, 2005). Des Weiteren wurde in verschiedensten Stresssituationen, beispielsweise nach einem Hitzeschock bzw. im Laufe der Apoptose, eine erhöhte Phosphorylierungen der Keratine detektiert (Feng *et al.*, 1999; Ku *et al.*, 2002a). Über welche Signalwege und durch welche Strukturen die Phosphorylierung der Keratine reguliert wird, ist jedoch noch weitestgehend unverstanden. Aus *in vitro* Analysen ist lediglich bekannt, dass p38 MAPK in der Lage sind, Keratin 8-S73 zu phosphorylieren (Ku und Omary, 2006; Omary *et al.*, 2006).

Bisher konnte jedoch noch kein zeitlicher und räumlicher Zusammenhang zwischen spezifischen Enzymaktivitäten, der Phosphorylierung spezifischer Keratinstellen und einer daraus resultierenden Reorganisation der Keratine ermittelt werden.

Vielmehr wurde vor Kurzem ein Modell der Keratinphosphorylierung postuliert, bei dem die Phosphorylierung der Keratinfilamente nicht der Regulation der Filamentorganisation dient. Stattdessen sieht dieses „*sponge model*“ eine wichtige Aufgabe der Keratinfilamente darin, SAPK abzufangen und so zytotoxisch gegen apoptotische Einflüsse zu wirken (Ku und Omary, 2000; Iwaya und Mukai, 2005; Ku und Omary, 2006).

#### **1.2.4 Glykosylierung, Transglutaminierung und Ubiquitinierung der Keratine**

Neben der Phosphorylierung werden Keratine ubiquitiniert, transglutamiert und glykosyliert. Es konnte gezeigt werden, dass die *in vivo* Ubiquitinierung von Keratinen zu einem Abbau am Proteasom beiträgt (Ku und Omary, 2000). Offensichtlich spielt hierbei auch die Stärke der Keratinphosphorylierung eine Rolle. Die genauen Zusammenhänge zwischen Keratinabbau, Phosphorylierung und Ubiquitinierung sind jedoch noch weitestgehend unbekannt (Candi *et al.*, 1998; Omary *et al.*, 1998; Coulombe und Omary, 2002).

Ähnlich wenig ist über die Transglutaminierung der Keratine bekannt. Sie dient der Verknüpfung von Keratinfilamenten mit Proteinen wie Loricrin, Involucrin und Envoplakin. Diese kovalenten Bindungen erfolgen über ein hoch konserviertes Lysin in der Kopfdomäne der Typ II Keratine (Omary *et al.*, 1998; Coulombe und Omary, 2002). Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Bildung und Stabilisierung des so genannten „*cornified envelope*“ im intrazellulären Bereich der Plasmamembran epithelialer Zellen.

Glykosylierungen wurden bisher unter anderem für die Keratine 8, 13 und 18 beschrieben (Chou, C. F. *et al.*, 1992). Im Falle von Keratin 18 konnten drei Glykosylierungsstellen in der Kopffregion detektiert werden (Ku und Omary, 1995). Über die Funktion dieser Glykosylierungen ist bisher nichts bekannt. Es wurde jedoch spekuliert, dass sie möglicherweise einen Einfluss auf die Phosphorylierung der Keratine haben könnten (Coulombe und Omary, 2002).

### 1.2.5 Keratin-assoziierte Proteine

Unter Keratin assoziierten Proteinen (KaP) werden alle Proteine zusammengefasst, die mit Keratinen lokalisieren und diese in ihrer Funktion oder Organisation beeinflussen können. In den letzten Jahren wurden zahlreiche bisher unbekannte Aufgaben der Keratine beschrieben. Mit dieser Zunahme der Keratinfunktionen, stieg auch die Anzahl der detektierten KaP stetig an. Bei einem Großteil der KaP konnte jedoch noch kein funktioneller Zusammenhang mit ihrer Assoziation an Keratinen hergestellt werden. Die Bedeutung anderer KaP ist hingegen bekannt. So konnte gezeigt werden, dass an der Verknüpfung der Keratinfilamente mit Desmosomen die KaP Desmoplakin und Plakophilin beteiligt sind (Kouklis *et al.*, 1994; Kowalczyk *et al.*, 1994; Smith und Fuchs, 1998; Hofmann, I. *et al.*, 2000). An der Assoziation der Keratine mit Hemidesmosomen ist hingegen das KaP „*bullous pemphigoid antigen 1*“ (BPAG1) maßgeblich beteiligt (Fuchs und Yang, 1999; Fuchs und Karakesisoglou, 2001). Auch die Verknüpfung der Keratinfilamente mit Aktinfilamenten und Mikrotubuli wird über KaP vermittelt. Hierbei spielt vor allem das bereits in Kapitel 1.1.4 erwähnte Plektin eine wichtige Rolle (siehe Coulombe *et al.*, 2000; Coulombe und Omary, 2002). An der Bündelung der Keratinfilamente sind zwei weitere KaP, Filaggrin (Dale *et al.*, 1985) und Trichohyalin (Lee, S. C. *et al.*, 1993), beteiligt. Über die Funktion zahlreicher anderer KaP wie 14-3-3, TNF receptor type 2 (TNFR2), PKC-like Kinasen, Hsp70, Hsp27 und Mrj ist bisher nur wenig bzw. nichts bekannt (Caulin *et al.*, 2000; Coulombe *et al.*, 2000; Izawa *et al.*, 2000; Ku *et al.*, 2002b; Coulombe und Wong, 2004; Janig *et al.*, 2005).

Allgemein wird jedoch angenommen, dass die Aufgaben der KaP über die bloße Funktion, Keratine mit anderen Strukturen der Zelle zu verknüpfen, hinausgehen. So wird vermutet, dass die KaP den Auf- und Abbau der Keratinfilamente und die Proliferation bzw. Apoptose von Zellen beeinflussen (Coulombe und Omary, 2002). Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die Regulation der KaP durch ihre Assoziation mit den Keratinen beeinflusst wird. Die Bindung der KaP an die Keratinfilamente könnte so beispielsweise die Menge der verfügbaren KaP und ihre Enzymaktivität beeinflussen (Coulombe und Omary, 2002).

### 1.2.6 Dynamik des Keratinnetzwerks

In den letzten Jahren hat sich die zuvor weit verbreitete Ansicht, dass es sich bei dem Keratinnetzwerk nur um ein statisches Gebilde handelt, als falsch erwiesen. Auch die Annahme, dass aufgrund des unpolaren Aufbaus der Keratinfilamente nur ein lateraler Austausch mit löslichen Untereinheiten möglich ist und dass dieser „dynamische“ Austausch nur dem Erhalt der statischen Keratinfilamente dient (Miller *et al.*, 1991), konnte durch

aktuelle Untersuchungen nicht bestätigt werden. Mit Hilfe moderner Fluoreszenzmikroskopietechniken, durch die es möglich ist, Zeitrafferaufnahmen des Keratinsystems in lebenden Zellen anzufertigen, konnte vielmehr gezeigt werden, dass sich das gesamte Keratinnetzwerk epithelialer Zellen in einer kontinuierlichen, einwärts gerichteten Bewegung befindet (Windoffer und Leube, 1999). Aufgrund dieser Aufnahmen wurde außerdem postuliert, dass in der Zellperipherie kontinuierlich neue Keratinfilamente entstehen, die in Richtung des Zellzentrums transportiert werden (Windoffer und Leube, 1999; Windoffer und Leube, 2001). Diese Neubildung von Filamenten kann nicht mehr mit dem Modell des lateralen Austauschs von löslichen Grundeinheiten erklärt werden. *In vitro* Untersuchungen legen nahe, dass die Filamentbildung mit einer schnellen lateralen Aggregation von Tetrameren zu den so genannten „Unit Length Filaments“ (ULF) beginnt. In einem weiteren Schritt verlängern sich diese ULF durch longitudinales Aneinanderlagern und kompaktieren dann zu „reifen“ Filamenten (Herrmann *et al.*, 2002; Strelkov *et al.*, 2003). *In vivo* konnte dieses Modell jedoch bisher nicht bestätigt werden.

Weitere Beweise für die hohe Dynamik des Keratinnetzwerks lieferten Untersuchungen an mitotischen A431 Zellen (Windoffer und Leube, 2001). Mit Hilfe von Fluoreszenzaufnahmen konnte gezeigt werden, dass zu Beginn der Mitose das Keratinnetzwerk der Zellen vollständig reorganisiert wird. Es bilden sich Keratinaggregate, die so genannten Keratingranula. Im Anschluss an die Mitose wird das Keratinnetzwerk aus diesem akkumulierten Material neu reorganisiert. Aber auch in Interphase-Zellen kann eine schnelle Reorganisation des Keratinnetzwerks beobachtet werden. Die Inkubation der Zellen mit dem Phosphatase-Inhibitor Orthovanadat (OV) führt innerhalb weniger Minuten zu einem vollständigen Abbau der Keratinfilamente. Auch hier bilden sich aus den Keratinen Aggregate. Durch das frühzeitige Auswaschen des Inhibitors kann dieser Prozess umgekehrt werden. Aus den Keratingranula entstehen dann wieder neue Keratinfilamente (Strnad *et al.*, 2002).

### 1.3 Ziele der Arbeit

Wie zahlreiche Erkrankungen zeigen, sind Keratine essentielle Bestandteile des Zytoskeletts epithelialer Zellen. Im Gegensatz zu den beiden anderen Komponenten des Zytoskeletts, den Aktinfilamenten und den Mikrotubuli, ist über die Keratinfilamente noch überraschend wenig bekannt. Bis vor einiger Zeit wurde das Keratinfilamentnetzwerk noch als reine Stützstruktur der Zellen angesehen. Erst in den letzten Jahren änderte sich diese Einschätzung und es konnte durch Verwendung von Zeitrafferaufnahmen gezeigt werden, dass es sich bei dem komplexen Keratinnetzwerk keineswegs um eine statische Struktur handelt. Vielmehr zeigte sich, dass das gesamte Netzwerk äußerst dynamisch und schnell auf veränderte Reize und Stress reagieren kann. Wie bereits in der Einleitung erwähnt sind grundlegende Fragen zur Entstehung und Regulation des Keratinnetzwerks bisher unbeantwortet geblieben. In der vorliegenden Arbeit sollen einige dieser offenen Fragen behandelt werden. Folgende Ziele wurden formuliert:

#### 1. Untersuchung der Entstehung und Motilität von Keratinfilamenten und ihren Vorläufern

Ein geeignetes Zellsystem zur Untersuchung der Intermediate der Keratinfilamentnetzwerkbildung sollte etabliert werden. Da die Analyse mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt werden sollten, war eine möglichst kräftige Fluoreszenzmarkierung des gesamten Keratinfilamentnetzwerks notwendig. Außerdem sollten die Zellen ein weniger feines Keratinnetzwerk aufweisen als dies beispielsweise bei Keratinozyten der Fall ist, um die Entstehung und die Motilität der kleinen Strukturen besser verfolgen zu können. Um die Zeitrafferaufnahmen zu erleichtern, sollten die Zellen außerdem möglichst abgeflacht sein und wenig sensitiv auf Licht reagieren. Aus diesen Gründen sollten SW13 Zellen, die kein endogenes Keratin exprimieren, verwendet werden.

Es sollte geklärt werden, wie und in welchem Bereich der Zellperipherie die Keratinfilamente entstehen und aus welchen Strukturen sie hervorgehen. Des Weiteren sollte untersucht werden, wie sich aus den Vorläufern Keratinfilamente bilden und ob Unterschiede in der Motilität der Vorläufer, der peripheren Keratinfilamente und des zentralen Keratinnetzwerks existieren. Außerdem sollte die Transportgeschwindigkeit und -richtung der Keratinfilamentvorläufer und der Keratinfilamente in verschiedenen Kompartimenten der Zelle ermittelt werden.

2. Einfluss der Aktinfilamente und Mikrotubuli auf die Motilität des Keratin-Systems

Die Beteiligung der MT und Aktinfilamente am Transport der KFP und der Keratinfilamente ist bisher noch weitestgehend ungeklärt. Vorangegangene Untersuchungen lieferten teilweise widersprüchliche Ergebnisse (siehe 1.1.4 ). Daher sollten die Aktinfilamente und Mikrotubuli durch spezifische Inhibitoren gezielt ausgeschaltet werden, um Rückschlüsse auf die Beteiligung der einzelnen Komponenten an der Motilität der KFP und Keratinfilamente ziehen zu können. Des Weiteren sollten Untersuchungen mit Hilfe von Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen durchgeführt werden, um Veränderungen in der Motilität der KFP und Keratinfilamente detektieren zu können.

3. Dynamik und Regulation des Auf- und Abbaus des Keratinnetzwerks

Es sollte untersucht werden wie die Phosphorylierung der Keratine reguliert wird, welche Bereiche der Keratine phosphoryliert werden und wie sich diese Phosphorylierung auf die Organisation und den Auf- und Abbau des Keratinnetzwerks auswirkt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Geräte

**Tabelle 2.1:** Verwendete Geräte

Gerät/Material	Bezugsquelle
1°C Freezing Cryocontainer	Nalgene Cryo
Autoklav-Varioklav Typ 400	H+P Labortechnik
Bakterienschüttler-Certomat R	B. Braun Biotech
Blotkammer - Transblot SD Semi-Dry	BioRad
Destillator - Milli-Q	Millipore
Eismaschine - AF-10	Scotsman
Elektrophoresekammer	Sigma-Aldrich
Fluoreszenzmikroskop - Axiophot I	Karl Zeiss
Fluoreszenzmikroskop - IX-70	Olympus
Geldokumentation - Image Master VDS	Pharmacia-Biotech
Heizblock - Blockthermostat BT100	Kleinfeld Labortechnik
Inkubator Zellkultur	Heraeus
Kamera Axiophot-C4742-95	Hamamatsu
Kamera Olympus IX-70 - IMAGO	Till Photonics
Kühlschrank - Liebherr Premium	Liebherr
Laminarflow Sterilwerkbank - Microflow	Nunc
Magnetheizrührer – IKA-Kombimag-Ret	Janker & Kunkel
2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl Pipetten	Gilson
PCR Cyclyer – Primus 96 advanced	Peqlab
Netzteil - Power Pac 300	BioRad
PAGE System - Mini Protean II	BioRad
Präzisionswaage - LC 2434	Sartorius
Präzisionswaage - LC 4801	Sartorius
Stickstofftank - GT40	Air Liquide
Überkopfschüttler - RL-2M Intelli Mixer	ELMI
Ultrazentrifuge	Kontron
Röntgenkassetten	Angewandte Gentechnologie Systeme

**Tabelle 2.1:** Verwendete Geräte (Fortsetzung)

<b>Gerät/Material</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Rotationsschüttler - RFR-2000	Heidolph
Shutter Mikroskop - Uniblitz VMM-D1	Vincent Associates
Vortexer – Reax 2000	Heidolph
Wasserbad	Bioblock Scientific
Zellkultur-Inkubator	Heraeus Instruments
Laser Punktscanning SP5 System	Leica
DMI 6000 CS Trino Mikroskop	Leica
Zentrifuge – Biofuge Fresco	Heraeus
Zentrifuge - Megafuge 1 OR	Heraeus
pH-Meter - pH530	WTW
Photometer - Ultraspec 2000 UV	Pharmacia-Biotech

**Tabelle 2.2:** Verwendete Antibiotika

<b>Antibiotika</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Stammlösung</b>	<b>Arbeitskonzentration</b> [pro ml Medium]
Ampicillin	Sigma-Aldrich	100 mg/ml	100-150 µg
Kanamycin	Sigma-Aldrich	20 mg/ml	50-60 µg
Geneticin (G-418)	Sigma-Aldrich	100 mg/ml	100–1000 µg
Tetracyclin	Sigma-Aldrich	10 mg/ml	
Penicillin / Streptomycin (100 x)	Gibco	10000 U Penicillin 10 mg/ml Streptomycin	1% (100 U)
Zeocin	Sigma-Aldrich	100 µg/µl	100–1000 µg



Tabelle 2.3: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle	Chemikalie	Bezugsquelle
Aceton	Roth	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Roth
Acrylamid	Roth	Luminol	Fluka
AgNO <sub>3</sub>	Merck	Mercaptoethanol	Roth
APS	Sigma	Methanol	Roth
Bacto-Agar	Difco	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	Merck
Bacto-Trypton	Difco	NaCl	Roth
BES	Sigma	NaOH	Roth
Borsäure	Roth	N-Acetyl-L-Cystein	Sigma
Bromphenolblau	Serva	N-Lauroyl-Sarkosin	Sigma
BSA	Sigma	NP-40 (Nonident p-40)	Fluka
CaCl <sub>2</sub>	Merck	Phenol	Roth
Chloroform	Roth	Phosphorsäure	Merck
Coomassie Blau	Serva	Polyvinylalkohol	Fluka
Cumarsäure	Fluka	(Mowiol 4-88)	
Digitonin	Sigma	Ponceau-S	Roth
DMSO	Merck	Rotiphorese NF-	Roth
DTT (dithiothreitol)	Merck	Acrylamid/Bis-Lösung 30%	
EDTA	Roth	(29:1)	
Empigen BB	Fluka	Salzsäure	Roth
Essigsäure	Roth	SDS	Serva
Ethanol	Roth	Sepharose A	Zymed
Ethidiumbromid	Roth	Sorbitol	Roth
Formaldehyd	Roth	TEMED	Roth
Glycerol	Serva	Tris-Base	Roth
Glycin	Roth	Triton-X 100	Sigma
Hanks-Salzlösung (HBSS)	Invitrogen	Trockenmilchpulver	Töpfer
Harnstoff	Roth	Trypsin	Roth
Hepes	Gibco	Tween-20	Merck
Isopropanol	Roth	Xylencyanol	Merck
KCl	Fluka	Zitronensäure	Roth

**Tabelle 2.4:** Transfektionsreagenzien für die Lipofektion

<b>Transfektionsreagenz</b>	<b>Bezugsquelle</b>
LipofectAMINE 2000	Invitrogen
Gene PORTER 2	Qiagen
Lipofectin	Invitrogen

### 2.1.2 Verwendete Kits

Die verwendeten Kits wurden direkt vom Hersteller bezogen und entsprechend den empfohlenen Protokollen verwendet.

**Tabelle 2.5:** Verwendete Kits

<b>Kit</b>	<b>Bezugsquelle</b>
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
RNeasy-RNA-Extraction Kit	Qiagen
Enhanced Avian HS RT-PCR Kit	Sigma-Aldrich
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen

### 2.1.3 Verbrauchsmaterial

**Tabelle 2.6:** Verwendete Verbrauchsmaterialien

<b>Material</b>	<b>Bezugsquelle</b>
0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
24-Loch; 96-Loch Platten	Nunc
2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml serologische Pipetten - Cellstar	Greiner Bio-one
35 mm, 60 mm, 94 mm, 100 mm Zellkulturschalen mit Nocken - Cellstar	Greiner Bio-one
Bottletopfilter SFCA 0,2µm	Nalgene
Cryoröhrchen	Greiner Bio-one
Entwickler – LX 24	Kodak
Glasbodenschale	MatTek
Hyperfilm	Amersham
Mediumflaschen Zellkultur - Duran	Schott
Nitrocellulose - Optitran BA-S83	Schleicher & Schuell
Parafilm „M“	Pechiney Plastic
Pasteurpipetten	Carl-Roth
PCR Gefäße	Epgene
Plättchenständer	CTI
Sterilfilter für Spritze	Roth
Whatman-Papier - CB002 Gel Blotting Papier	Schleicher & Schuell
Zellkulturflaschen, Filter-top	Greiner Bio-one
Zentrifugenröhrchen	Sarstedt

### 2.1.4 Enzyme

**Tabelle 2.7:** Verwendete Enzyme

<b>Enzym</b>	<b>Hersteller</b>
Pfu-DNA-Polymerase	Fermentas
Benzonase	Merck
DNase	Fermentas
Phusion-DNA-Polymerase	NEB
Proteinase K	Sigma-Aldrich
Restriktionsendonucleasen	Fermentas
T4-DNA-Polymerase	Fermentas
Taq-DNA-Polymerase	Eppendorf

Die verwendeten Restriktionsendonucleasen wurden von der Firma Fermentas bezogen.

### 2.1.5 Inhibitoren und Drogen

**Tabelle 2.8:** Verwendete Inhibitoren und Drogen

<b>Inhibitor</b>	<b>Hersteller</b>
Aprotinin	Sigma-Aldrich
Complete – Protease Inhibitor	Roche
Latrunculin B	Sigma-Aldrich
Leupeptin	Sigma-Aldrich
Nocodazol	Sigma-Aldrich
Orthovanadat	Sigma-Aldrich
Pepstatin	Sigma-Aldrich
PMSF	Merck
SB202190	Sigma-Aldrich
SB203580	Sigma-Aldrich

## 2.1.6 Antikörper

**Tabelle 2.9:** Liste der verwendeten Primär-Antikörper

Primär-Antikörper	Hersteller	Spezies	Antigen	IZC	WB
Phos-p38	NEB	rb	p38 <sup>P</sup> MAPK T180 <sup>P</sup> /Y182 <sup>P</sup>	1:200	1:1000
Phos-SAPK/JNK	NEB	rb	JNK <sup>P</sup> MAPK T183 <sup>P</sup> /Y185 <sup>P</sup>	1:200	1:1000
Phos-p44/42	NEB	rb	p44/42 <sup>P</sup> MAPK T202 <sup>P</sup> /Y204 <sup>P</sup>	1:200	1:1000
LJ4-anti-S73 <sup>P</sup>	-	mc	Keratin 8-S73 <sup>P</sup>	1:100	1:1000 – 1:2000
5B3-anti-S431 <sup>P</sup>	-	mc	Keratin 8-S431 <sup>P</sup>	1:100	1:1000 – 1:2000
IB4-anti-S33 <sup>P</sup>	-	mc	Keratin 18-S33 <sup>P</sup>	1:100	1:1000 – 1:2000
L2A1	-	mc	α – Keratin 8/18	1:100	1:1000 – 1:2000
Keratin-pan	Progen	gp	Zytoskelett-Extrakt aus der Rinderschnauze	1:100	1:2000
α-Flag-Tag	NEB	rb	DYKDDDDK	1:150	-
p38 total	NEB	rb	p38 gesamt	1:200	1:1000
p44/42 total	NEB	rb	p44/42 gesamt	1:200	1:1000
SAPK/JNK total	NEB	rb	SAPK/JNK gesamt	1:200	1:1000
Anti-Tubulin	Amersham	mc	Tubulin	1:200	-
Anti-GFP	MoBiTec	rb	Grün fluoreszierendes Protein (GFP)	-	1:4000
p38 MAPK δ	NEB	rb	p38 MAPK δ - Isoform	1:200	1:1000

**Tabelle 2.10:** Liste der verwendeten Sekundär-Antikörper

Sekundär-Antikörper	Bezugsquelle	Spezies	IZC	WB
Cy3- $\alpha$ -Kaninchen-IgG F(ab') <sub>2</sub>	Jackson / Dianova	dk	1:300 – 1:500	-
Cy3- $\alpha$ -Maus-IgG	Rockland / Biotrend	gt	1:250 – 1:500	-
Cy3- $\alpha$ -Meerschwein-IgG F(ab') <sub>2</sub>	Jackson / Dianova	gt	1: 100 – 1:500	-
Cy2- $\alpha$ -Kaninchen	Jackson / Dianova	gt	1:50	-
Cy2- $\alpha$ -Maus-IgG	Rockland / Biotrend	gt	1:50	-
Cy2- $\alpha$ -Meerschwein -IgG	Jackson / Dianova	gt	1:50	-
TxR- $\alpha$ -Maus-IgG F(ab') <sub>2</sub>	Jackson / Dianova	gt	1:100	-
TxR- $\alpha$ -Kaninchen-IgG	Jackson / Dianova	gt	1:50– 1:200	-
AMCA- $\alpha$ -Maus	Jackson / Dianova	gt	1:30	-
HRP- $\alpha$ -Kaninchen-IgG	New England Biolabs	gt	-	1:2000
HRP- $\alpha$ -Maus-IgG	Jackson / Dianova	gt	-	1:7000

### 2.1.7 Bakterienstämme

#### *Escherichia coli* XL1-Blue

F' *proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10(Tet<sup>r</sup>) recA1 endA1 gyr A96 thi-1 hsdR17 supE44 rel A1lac*

Dieser Bakterienstamm wurde für Transformationen, zum Amplifizieren und Propagieren von Plasmiden verwendet. *E. Coli* XL1-Blue wurde von Stratagene erworben.

#### *Escherichia coli* DH5 $\alpha$

F' *phi80dlacZΔ(lacZYA-arg F) U169 deoR recA1 hsdR17 phoA Sup E44 λ<sup>-</sup>thi-1 gyrA96*

Dieser Bakterienstamm wurde ebenfalls für Transformationen und zum Amplifizieren von Plasmiden verwendet. Der Stamm wurde bei Invitrogen Technologies (Karlsruhe) erworben.

## 2.1.8 Oligonukleotide

### A. Primer zur Herstellung von DNA-Konstrukten und zur Isoformbestimmung

**Tabellen 2.11:** Primer, die für die mRFP-Aktin Klonierung verwendet wurden

Klonierung von pTER-mRFP	
#0388	5'-AGATCCGCTAGCCGATAAGGATCCGATGGCC-3'
#0560	5'-AGCTCGTCTAGATTAGGCGCCGGTGGAGTG-3'

Klonierung von mRFP-Aktin	
#0388	5'-AGATCCGCTAGCCGATAAGGATCCGATGGCC-3'
#0389	5'-AGCTCGAGATCTGGCGCCGGTGGAGTGGC-3'

**Tabelle 2.12:** Primer für die p38-Isoformbestimmung

Bezeichnung	Sequenz
$\alpha$ 1-forward	5'-CCGCTTATCTCATTAACAGG-3'
$\alpha$ 1-reverse	5'-CCGCTGTAATTCTCTTATCTG-3'
$\alpha$ 2-forward	5'-AGAACTGCGGTTACTTAAAC-3'
$\alpha$ 2-reverse	5'-CCAATAAATACATTCGCAAAG-3'
$\beta$ -forward	5'-GAGGAGATGACCGGCTATG-3'
$\beta$ -reverse	5'-TCCTTGGCCTCAACGCTCTCA-3'
$\gamma$ -forward	5'-CTTGAATTGGATGCGCTACAC-3'
$\gamma$ -reverse	5'-TGCGGTCAACGTCGTCAAAG-3'
$\delta$ -forward	5'-GACAAAGCGGCCAAATCCTAC-3'
$\delta$ -reverse	5'-TGAGTCCTTCCGGGCAATG-3'
GAPDH (human) forward	5'-CAATGACCCCTTCATTGACC-3'
GAPDH (human) reverse	5'-CAGTGGACTCCACGACGTAC-3'

**B. Primer für Sequenzierungen**

**Tabelle 2.13:** Primer für die Sequenzierung der shRNA-Konstrukte

Sequenzierung der shRNA Konstrukte	
<i>Forward</i>	5'-GTGTCAGCTAGGCGGGAACAC-3'
<i>Reverse</i>	5'-GGCGGGCCATTTACCGTAAG-3'

**Tabelle 2.14:** Primer für die Sequenzierung des mRFP-Tubulin Konstrukts

Sequenzierung von mRFP-Tubulin	
<i>Forward</i>	5'-GATCCGCTAGCCGATAAGG-3'
<i>Reverse</i>	5'-CGTGTTCAGGCAGTAGAG-3'

**Tabelle 2.15:** Primer für die Sequenzierung der MKK3/6 Konstrukte

Sequenzierung der MKK3/6 Konstrukte	
<i>Forward</i>	5'-GTGTCAGCTAGGCGGGAACAC-3'
<i>Reverse</i>	5'-GGCGGGCCATTTACCGTAAG-3'

**C. Oligonukleotide für die shRNA Versuche**

**Tabelle 2.16:** shRNA-Oligonukleotidsequenzen

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
$\alpha$ 1-sense	GATCCCGCCCTTGCACATGCCTACTTTCAAGAGAAGTAGGCATGTGCAAGGGCTTTTGGAAA
$\alpha$ 1-antisense	AGCTTTTCCAAAAAGCCCTTGCACATGCCTACTTCTCTTGAAAGTAGGCATGTGCAAGGGCGG
$\alpha$ 2-sense	GATCCCGATGAACTTTGCGAATGTATTCAAGAGATACATTGCAAAGTTCATCTTTTGGAAA
$\alpha$ 2-antisense	AGCTTTTCCAAAAAGATGAACTTTGCGAATGTATCTCTTGAATACATTGCAAAGTTCATCGG
$\delta$ 1/ $\gamma$ 1-sense	GATCCCGGTGGCCATCAAGAAGCTGTTCAAGAGACAGCTTCTTGATGGCCACCTTTTGGAAA
$\delta$ 1/ $\gamma$ 1-antisense	AGCTTTTCCAAAAAGGTGGCCATCAAGAAGCTGTCTCTTGAACAGCTTCTTGATGGCCACCGG
$\delta$ 2-sense	GATCCCGCCGTTTGATGATTCCTTATCAAGAGATAAGGAATCATCAAACGGCTTTTGGAAA
$\delta$ 2-antisense	AGCTTTTCCAAAAAGCCGTTTGATGATTCCTTATCTCTTGAATAAGGAATCATCAAACGGCGG
$\delta$ 3-sense	GATCCCTGAGGACTGTGAACTGAAGATTCAAGAGATCTTCAGTTCACAGTCCTCATTTTGGAAA
$\delta$ 3-antisense	AGCTTTTCCAAAAATGAGGACTGTGAACTGAAGATCTCTTGAATCTTCAGTTCACAGTCCTCAGG



### 2.1.9 Verwendete Zelllinien

**Tabelle 2.17:** Verwendete Zelllinien

Bezeichnung	Konstrukte	Herkunft	Referenz
MCF-7	-	Homo sapiens; Brustdrüsen-Adenokarzinom	(Soule <i>et al.</i> , 1973)
A-431	-	Homo sapiens; Vulva-Plattenepithelkarzinom	(Giard <i>et al.</i> , 1973)
Eph4	-	Mus musculus; Brustdrüsen	(Fialka <i>et al.</i> , 1996)
AK13-1	HK13-EGFP	Homo sapiens; Vulva-Plattenepithelkarzinom	(Windoffer und Leube, 1999)
MT5K14-25	HK14-WT	Homo sapiens; Brustdrüsen-Adenokarzinom	(Werner <i>et al.</i> , 2004)
MT5K14-26	HK14R125C	Homo sapiens; Brustdrüsen-Adenokarzinom	(Werner <i>et al.</i> , 2004)
PK18-5	HK8-EGFP	Homo sapiens; Hepatozelluläres Karzinom	(Strnad <i>et al.</i> , 2002)
PK8-1	HK8 $\Delta$ T.ECFP	Homo sapiens; Hepatozelluläres Karzinom	(Strnad <i>et al.</i> , 2002)
PLC	-	Homo sapiens; Hepatozelluläres Karzinom	(Alexander <i>et al.</i> , 1976)
SK8/18-2	HK8-ECFP; HK18-EYFP	Homo sapiens; Nebennierencortex-Karzinom	-
HT-29	-	Homo sapiens; Adenokarzinom des Colon	(Fogh <i>et al.</i> 1964)
SW-13F8tr.14	-	Homo sapiens; Kleinzelliges Karzinom der Nebennierenrinde	(Leibovitz <i>et al.</i> , 1973)

## 2.1.10 Vektoren und Konstrukte

Tabelle 2.18: Verwendete Vektoren

Vektor	Beschreibung	Bezugsquelle	Referenz
Dominant aktives MKK3	Dominant aktives MKK3(Glu) Klonierung über HindIII + SpeI in pRc/RSV (Invitrogen). Flag-Tag.	R. Davies, Worcester, USA	(Raingeaud <i>et al.</i> , 1996)
Dominant aktives MKK3-CFP	Dominant aktives MKK3(Glu) Klonierung über HindIII + SpeI in pTER-ECFP	s. Kapitel 3.3.15	-
Dominant aktives MKK3-RFP	Dominant aktives MKK3(Glu) Klonierung über HindIII + SpeI in pTER-mRFP	s. Kapitel 3.3.15	-
Dominant aktives MKK6	Dominant aktives MKK6(Glu) Klonierung über HindIII + XbaI in pCDNA3 (Invitrogen) Flag-Tag	R. Davies, Worcester, USA	(Raingeaud <i>et al.</i> , 1996)
Dominant aktives MKK6-CFP	Dominant aktives MKK6(Glu) Klonierung über HindIII + XbaI in pTER-ECFP	s. Kapitel 3.3.15	-
Dominant aktives MKK6-RFP	Dominant aktives MKK6(Glu) Klonierung über HindIII + XbaI in pTER-mRFP	s. Kapitel 3.3.15	-
EB3-EGFP	End-Binding Protein 3, GFP markiert (pEGFP-N1)	R. Duden, London, England	(Stepanova <i>et al.</i> , 2003)
EYFP-HK14	HK14 - Klonierung über HindII + BamHI in EYFP-C1 (Clontech)	N. Werner, Bonn	(Werner <i>et al.</i> , 2004)
EYFP-HK14 <sub>R125C</sub>	HK14 <sub>R125C</sub> -Klonierung über EcoRI + BamHI in pEYFP-C1 (Clontech)	N. Werner, Bonn	(Werner <i>et al.</i> , 2004)
HK13ΔT-EGFP	HK13 - Klonierung über HindIII + BamHI in EGFP-N3 (Clontech)	-	(Windoffer und Leube, 1999)

**Tabelle 2.18:** Verwendete Vektoren (Fortsetzung)

Vektor	Beschreibung	Bezugsquelle	Referenz
HK18-EYFP	HK18 - Klonierung über EcoRI + Asp718 EYFP (Clontech)	P. Strnad, Mainz	(Strnad <i>et al.</i> , 2002)
HK5-ECFP	HK5 – Klonierung über HindIII + BamHI in pECFP-N1 (Clontech)	AG Leube; S. Thomas	-
HK8-ECFP	HK8 - Klonierung über EcoRI + BamHI in pECFP-N1 (Clontech)	AG Leube; S. Thomas	(Windoffer und Leube, 2004)
HK8-S73A-ECFP	HindIII HK8-S73A Fragment einkloniert in HK8-ECFP	AG Leube; U. Wilhelm	-
HK8-S73D	-	B. Omary, Palo Alto, USA	(Ku <i>et al.</i> , 2002a)
mRFP-Aktin	EGFP wurde durch mRFP in dem Vektor EGFP-Aktin (Clontech) über NheI + BglII ersetzt	s. Kapitel 3.2.1	-
mRFP-pRSet <sub>B</sub>	mRFP Klonierung über BamHI + EcoRI in pRSET <sub>B</sub>	-	(Campbell <i>et al.</i> , 2002)
pEGFP-Aktin	-	Clontech	-
pTER-EGFP	Integration von shRNA über BglII + HindIII	E. Bockamp, Mainz	(van de Wetering <i>et al.</i> , 2003)
pTER-mRFP	-	s. Kapitel 3.3.11	-

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Extraktion von DNA aus Zellen

Für die Extraktion der DNA wurden die Zellen zunächst auf zwei 100 mm Zellkulturschalen bis zu einer Dichte von 90–100% kultiviert. Anschließend wurden sie vorsichtig zweimal mit 1 x PBS (37°C) gewaschen, mit einem Gummispatel in 600 µl 1 x PBS abgeschabt und sofort in ein Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt. Die geernteten Zellen wurden dann bei Raumtemperatur abzentrifugiert (2000xg, 2 min) und der erhaltene Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 630 µl Lysepuffer und 70 µl Proteinase K (10 mg/ml) resuspendiert und über Nacht bei 55°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die DNA durch Zugabe von 700 µl Isopropanol gefällt (30 min, -20°C) und abzentrifugiert (14000xg, 30 min, 4°C). Der Überstand wurde erneut verworfen und das DNA-Pellet mit 700 µl Ethanol (100%, eiskalt) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (14000xg, 30 min, 4°C) wurde das DNA-Pellet in *dd*H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Lysepuffer	
Tris HCl pH 7,5	10 mM
EDTA pH 8	10 mM
NaCl	10 mM
N-Lauroyl-Sarkosin	0,5 % (v/v)
<i>dd</i> H <sub>2</sub> O	-

PBS	
NaCl	137 mM
KCl	3 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 mM
<i>dd</i> H <sub>2</sub> O; pH 7,4	-

#### 2.2.1.2 Extraktion von RNA aus Zellen

Die Extraktion der RNA aus verschiedenen Zelllinien erfolgte unter Verwendung des „RNeasy“-RNA-Extraction Kit (Qiagen). Die verwendeten Zellen wurden auf 100 mm Zellkulturschalen bis zu einer Dichte von 90% kultiviert. Anschließend wurden sie mit Hilfe einer Trypsinlösung (0,25% (v/v)) von der Zellkulturschalenoberfläche abgelöst und in 1 ml PBS (1 x) aufgenommen. Die auf diese Weise gewonnenen Zellen wurden abzentrifugiert (1000xg, 2-3 min, RT) und der entstandene Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet hingegen wurde in 600 µl RLT-Lysepuffer (RNeasy Kit, Qiagen) aufgenommen und durch leichtes Vortexen resuspendiert. Um das gewonnene Zelllysate weiter zu homogenisieren, wurde es 5 bis 10 mal durch eine sterile, RNase freie Injektionsnadel (20-gauge) aufgezogen und anschließend mit 600 µl Ethanol (70%) vermischt. Das homogenisierte Zelllysate wurde dann vorsichtig auf eine RNeasy-Mini-Säule gegeben. Diese Säule fungiert als

Anionenaustauscher und erlaubt eine selektive Adsorption der negativ geladenen Nucleinsäuren. Die beladenen Säulen wurden dann mit >10000xg (15-60 s) zentrifugiert. Anschließend wurden die an die Säulen gebundenen Nucleinsäuren mit 700 µl des im Kit enthaltenen RW1-Puffer (RNeasy Kit, Qiagen) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Säulen zweimal mit je 500 µl RPE-Puffer (RNeasy Kit, Qiagen) gewaschen und wiederum entsprechend zentrifugiert. Das Eluieren der gebundenen Nucleinsäuren erfolgte dann durch Inkubation der Säulen mit 30–50 µl RNase-freiem Wasser und einer daran anschließenden Zentrifugation (10000xg, 15-60 s).

### 2.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Die Konzentration von DNA- und RNA-Proben wurde mit Hilfe einer spektral-photometrischen Messung bestimmt. Das Absorptionsmaximum von Nucleinsäuren liegt aufgrund der aromatischen Ringstruktur der Basen bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dadurch kann die Konzentration von Nucleinsäuren in Lösungen photometrisch anhand ihrer Extinktion bestimmt werden. Die optische Dichte ( $OD_{260}$ ) mit dem Wert 1 entspricht hierbei 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml RNA. Hieraus kann die Konzentration der Nucleinsäuren berechnet werden. Zur Bestimmung dieser Konzentrationen wurden die DNA bzw. die RNA in TE-Puffer verdünnt. In diesem Puffer wurde auch der Leerwert für die Messung bestimmt. Die Berechnung der Endkonzentration erfolgte nach folgender Formel:

$$OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Umrechnungsfaktor} = \text{Konzentration} [\mu\text{g} / \text{ml}]$$

Da das Absorptionsmaximum für Proteine bei 280 nm liegt, konnte aus dem Quotienten der ermittelten Extinktion bei 260 nm und bei 280 nm der Grad der Verunreinigung der Proben mit Proteinen ermittelt werden ( $A_{260}/A_{280}$ ). Der Quotient sollte dabei im Bereich zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

TE-Puffer (10x)	
Tris-HCl	0,1 M
EDTA	0,01 M

### 2.2.1.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Durch die Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente in Abhängigkeit von ihrer Größe aufgetrennt werden. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass negativ geladene DNA-Fragmente in der Agarose-Gel-Matrix in Richtung der Anode wandern. In Abhängigkeit von der Agarose-Konzentration der Gel-Matrix bewegen sich dabei größere Fragmente langsamer als kleine Fragmente.

Je nach erwarteter Größe der Fragmente wurden Agarosegele unterschiedlicher Konzentration verwendet (0,8–1,4%). Zur Visualisierung der DNA-Fragmente wird das Agarosegel mit Ethidiumbromid versetzt (0,5 µg/ml). Ethidiumbromid ist ein interkalierender, fluoreszierender Farbstoff, der zwischen den Basenpaarstapeln der DNA bindet. Mit Hilfe eines UV-Leuchttisches kann Ethidiumbromid bei einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht werden. Dadurch können die markierten DNA-Fragmente im Gel detektiert werden. Für die Herstellung der Gelmatrix wurde die entsprechende Menge Agarose mit TBE-Puffer vermischt und durch Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst. Nachdem die Agarose auf etwa 60°C abgekühlt war, wurde das Ethidiumbromid hinzugegeben und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Die flüssige Agarose wurde dann in einen Gelschlitten mit eingesetztem Probenkamm gegossen. Nach Abkühlen und Aushärten der Agarose wurde das Gel in die mit TBE-Puffer (1 x) befüllte Laufkammer gegeben und der Probenkamm entfernt.

Die DNA-Proben wurden mit Ladepuffer (6x) versetzt und in die verschiedenen Probenaschen pipettiert. Um die jeweilige Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente abschätzen zu können, wurde in eine zusätzliche Probenasche ein Marker mit DNA-Fragmenten definierter Größe gegeben. In Abhängigkeit von der erwarteten Größe der DNA-Fragmente wurde entsprechend ein 100bp-Marker bzw. ein 1kb-Marker verwendet.

Die eigentliche Auftrennung der Fragmente erfolgte dann durch das Anlegen von 80-120 Volt Spannung für 40 bis 60 min. Nach Beendigung des Gellaufs wurden die DNA-Fragmente mit Hilfe des Geldokumentationssystems (Image Master VDS) detektiert und dokumentiert.

<b>DNA-Ladepuffer (6x)</b>	
Glycerin	30% (v/v)
SDS	1% (w/v)
Bromphenolblau	0,3% (w/v)
Xylencyanol	0,3% (w/v)
EDTA	50 mM
Tris-HCl pH 7,5	10 mM

<b>TBE –Puffer (10x)</b>	
Tris (pH 8,3)	890 mM
Borsäure	890 mM
EDTA	32 mM

### 2.2.1.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden aus der Agarosematrix ausgeschnitten und mit Hilfe des „Gel-Extraction-Kit“ der Firma Qiagen aufgereinigt. Die DNA-Banden wurden zunächst auf einem UV-Tisch mit einem sauberen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und das Gewicht des extrahierten Gelstücks bestimmt. Anschließend wurde das Agarosegelstück mit einer seinem Gewicht entsprechenden Menge an Puffer (QG, Qiagen) überschichtet und durch Erwärmen (10 min, 50°C) verflüssigt. Die verflüssigte Agarose wurde auf Silikagelmembran-Säulen gegeben, die enthaltenen DNA-Fragmente wurden an die Membran gebunden und anschließend in mehreren Schritten mit dem durch das Kit bereitgestellten Puffer PE (Qiagen) gewaschen. Abschließend wurde die DNA in 30–50 µl *dd*H<sub>2</sub>O bzw. TE-Puffer (siehe 2.2.1.3) eluiert und konnte für weitere Experimente verwendet werden.

### 2.2.1.6 Restriktion von DNA

Für die Herstellung von DNA-Konstrukten wurde die DNA mittels Restriktionsendonucleasen geschnitten. Restriktionsendonucleasen sind Enzyme bakterieller Herkunft. Sie erkennen eine spezifische Sequenz der DNA und schneiden die DNA-Doppelstränge entweder gerade (*blunt end*) oder versetzt (*sticky end*). Dabei sind die palindromische Erkennungssequenz und das Schnittmuster des jeweiligen Enzyms immer gleich. Die Erkennungssequenz umfasst meist acht bis zehn Basenpaare. Die Restriktionsenzyme und die dazugehörigen Puffer wurden gemäß den Herstellerangaben (New England Biolabs, Fermentas) eingesetzt. Pro 1 µg Plasmid-DNA wurden 1-3 U Enzym verwendet. Das Volumen der eingesetzten Enzymlösung betrug dabei maximal 1/10 des Gesamtvolumens.

### 2.2.1.7 „Blunten“ von Restriktionsschnittstellen

Sollen zwei inkompatible „*sticky-end*“-Restriktionsschnittstellen zusammengefügt werden, stehen zwei Möglichkeiten zur Auswahl. Zum einen können die überhängenden Basen mit Hilfe eines entsprechenden Enzyms entfernt werden, um ein „stumpfes“ Ende (*blunt end*) zu erzeugen. Zum anderen können die Basen mit Hilfe einer Polymerase aufgefüllt werden. In dieser Arbeit wurde das Auffüllen der Basen bevorzugt. Das Auffüllen erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase (20 min, 11°C). Anschließend wurde die Polymerase für 15-20 min bei 70°C hitzeinaktiviert. Alle Schritte wurden in den vom Enzym-Hersteller bereitgestellten Puffern durchgeführt.

### 2.2.1.8 Dephosphorylierung und Ligation von DNA

#### Dephosphorylierung:

Wird ein Vektor mit nur einem Enzym geschnitten, so entstehen zueinander passende Restriktionsenden, die in einer nachfolgenden Ligation wieder mit sich selbst religieren und somit den Einbau eines Inserts verhindern können. Um diese Religation der Vektorenden zu verhindern, wurden die für eine Ligation essentiellen endständigen Phosphatgruppen an den Restriktionsstellen des Vektors entfernt. Diese Dephosphorylierung erfolgte mit Hilfe des Enzyms „alkalische Phosphatase“ („*calf intestine alkaline phosphatase*“ [CIAP]) in dem vom Enzymhersteller bereitgestellten Puffer. Jeweils 1 U CIAP wurde pro pmol Vektorenden für die Dephosphorylierungs-Reaktion eingesetzt. Sie erfolgte für 30 min bei 37°C und wurde anschließend durch Hitzeinaktivierung der CIAP gestoppt (10 min, 74°C). Durch den Verlust der endständigen Phosphatgruppen des Vektors konnte so gewährleistet werden, dass nur unter Einbeziehung der Phosphatgruppen des unbehandelten Inserts eine Ligation des Vektors stattfinden konnte.

#### Ligation:

Mit Hilfe des T4-Bakteriophagen-Enzyms Ligase können die überhängenden, komplementären bzw. stumpfen DNA-Enden eines restringierten Vektors und die des entsprechenden Inserts miteinander verknüpft werden. Die Ligation der kompatiblen Restriktionsenden erfolgt dabei durch eine Ligase-vermittelte Verknüpfung des Phosphodiester-Rückgrats der beiden DNA-Fragmente. Ein optimales Mengenverhältnis der DNA-Enden von Vektor und Insert liegt für die Ligation zwischen 1:3 und 1:6. Alle Ligationen wurden in den vom Hersteller der Ligase (Fermentas) mitgelieferten Ligase-Puffern (10x) durchgeführt, die für die Ligasereaktion entsprechend auf einfache Konzentration verdünnt wurden. Für 50–400 ng Vektor-DNA wurden entsprechend der Herstellervorgaben 1-5 U T4-Ligase (1 U/μl) verwendet. Die Ligation erfolgte über Nacht in einem Wasserbad bei 16°C.

### 2.2.1.9 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zum Säubern der DNA von Proteinverunreinigungen wurden Phenol-Chloroform-Extraktionen durchgeführt. Dabei werden die Proteine durch die Zugabe von Phenol gefällt und nach Zentrifugation entfernt.

Die Phenol-Chloroform-Extraktion der DNA-Proben erfolgte in drei Schritten. Zunächst wurden die DNA-Proben mit jeweils 1 Volumenteil Phenol versetzt und stark gevortext (20 s). Um die gefällten Proteine von der zu reinigenden DNA zu trennen, wurde das DNA-



Phenol-Gemisch für 5 min bei 10000xg zentrifugiert. Die dadurch entstandene obere, wässrige Phase, welche die DNA enthält, wurde vorsichtig abgenommen. Dabei wurde darauf geachtet, die dünne, mittlere Phase nicht mit abzunehmen, da sich in dieser Phase die unerwünschten Proteine sammeln. Nach dem Überführen der oberen Phase in ein neues Reaktionsgefäß wurden im zweiten Schritt der Aufreinigung, ½ Volumenteil Phenol und ½ Volumenteil einer Chloroform-Isoamyl-Alkohol Lösung (24 Teile Chloroform/1 Teil Isoamyl-Alkohol) zu der isolierten, wässrigen DNA-Phase gegeben. Die Proben wurden erneut gevortext und zentrifugiert. Anschließend wurde die obere wässrige Phase, wie bereits im ersten Schritt beschrieben, abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Im dritten und letzten Schritt der Phenol-Chloroform-Extraktion wurde 1 Volumenteil der Chloroform-Isoamyl-Alkohol-Lösung (24 Teile Chloroform/1 Teil Isoamyl-Alkohol) zu der isolierten DNA gegeben. Nach einem weiteren Vortex- und Zentrifugationsschritt konnte dann die wässrige Phase ein letztes Mal extrahiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Um die DNA von verbliebenen Chloroform- bzw. Phenol-Rückständen zu befreien und ihre Konzentration zu erhöhen, erfolgte im Anschluss an die Phenol-Chloroform-Extraktion eine Ethanol-Fällung der DNA (siehe 2.2.1.10).

### **2.2.1.10 Nukleinsäurenpräzipitation mit Ethanol**

Die DNA wurde, beispielsweise nach Phenol-Chloroform-Extraktionen, gefällt, um sie zu säubern bzw. um sie stärker zu konzentrieren. Hierfür wurden zu den entsprechenden DNA-Proben jeweils 1/10 Teil Na-Azetat (3M) und 2 Teile Ethanol (100%, p.a.) hinzugefügt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei -20°C wurden die Proben abzentrifugiert (20 min, 15000 xg) und der Überstand verworfen. In einem weiteren Schritt wurde das DNA-Pellet in jeweils zwei Volumenteilen Ethanol (70%) aufgenommen und erneut zentrifugiert (15000xg, 10 min). Danach wurde das Pellet wiederum von dem Ethanolüberstand befreit und kurz (30-60 s) bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend konnte die DNA in einem beliebigen Volumen *dd*H<sub>2</sub>O aufgenommen und für weitere Versuche verwendet werden.

### **2.2.1.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase-chain-reaction*, PCR) können DNA-Abschnitte selektiv und exponentiell amplifiziert werden. Die PCR besteht aus drei Schritten, die zyklisch wiederholt werden, und in deren Verlauf, ausgehend von einer doppelsträngigen DNA-Vorlage, der sogenannten Matrize (engl. *Template*), DNA Fragmente amplifiziert werden. Um spezifische Sequenzen eines DNA-Abschnitts zu amplifizieren werden dem Reaktionsgemisch so genannte *primer* zugesetzt. Diese *primer* sind spezifisch

bindende, die Zielsequenz flankierende Oligonukleotide, die sich an die komplementären Sequenzen der DNA Einzelstränge anlagern. Der so genannte „*forward-primer*“ bestimmt dabei das 5'-Ende und der „*reverse-primer*“ das 3'-Ende der Zielsequenz.

Im ersten Schritt der PCR (Denaturierung) wird die doppelsträngige DNA-Probe zunächst auf  $>92^{\circ}\text{C}$  erhitzt und denaturiert dadurch zu DNA-Einzelsträngen. Im zweiten Schritt (*Annealing*) wird die DNA dann auf  $50\text{-}65^{\circ}\text{C}$  abgekühlt, wobei die optimale Temperatur hierbei von der Schmelztemperatur der verwendeten *primer* abhängig ist. Diese hybridisieren nun mit den denaturierten DNA-Einzelsträngen. An diese, die Zielsequenz flankierenden, Elemente bindet im dritten Schritt der PCR (Elongation) eine thermostabile DNA-Polymerase. Die Temperatur in diesem Schritt liegt dabei je nach Typ der für die Reaktion verwendeten Polymerase bei  $68\text{-}72^{\circ}\text{C}$ . Ausgehend von den gebundenen *primern* synthetisiert die Polymerase an beiden Einzelsträngen vom 5'-Ende zum 3'-Ende die komplementären Stränge der Matrizen-DNA.

Um eine ausreichende Menge der Zielfragmente zu amplifizieren, wurden diese drei Schritte der PCR 30– bis 35-mal wiederholt. Die im vorangegangenen Zyklus synthetisierten Einzelstränge des Zielfragments dienten dabei in den nächsten Zyklen als zusätzliche Matrizen. Die PCR-Reaktionen (20  $\mu\text{l}$ , 50  $\mu\text{l}$ ) wurden nach folgendem Standardschema auf Eis angesetzt und in einem Thermo-Cycler (MWG, Peqlab) durchgeführt.

<b>Standardansatz für PCR</b>	
DNA Template	10 – 200 ng
<i>forward-primer</i>	10 pmol
<i>reverse-primer</i>	10 pmol
dNTP-Mix	200 $\mu\text{M}$
PCR-Puffer	1x
DNA-Polymerase (Taq, Pfu)	2–5 Units
MgCl <sub>2</sub> in Taq-Puffer	1,5 mM

### 2.2.1.12 Reverse Transkription

Soll RNA als Matrize für eine PCR-Reaktion dienen, muss sie zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Dies ist erforderlich, da bei der PCR-Reaktion DNA-Polymerasen verwendet werden, die nicht in der Lage sind, RNA zu amplifizieren. Das Umschreiben der RNA in cDNA wurde durch das Enzym „reverse Transkriptase“, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, vorgenommen. Als *primer* dienten hierbei sogenannte Oligo-dT-*primer*, die aus 16-20 Thymidin-Nukleotiden bestehen. Die komplementäre Region, an die sie binden, ist der

Poly-A-Schwanz der mRNA. An diesen *primern* setzt die Reverse Transkriptase an und synthetisiert vom 3'- zum 5'-Ende der mRNA die cDNA.

Die für die reverse Transkription erforderliche RNA wurde zuvor, wie bereits in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben, aus kultivierten Zellen extrahiert. Die eigentliche reverse Transkription erfolgte dann mit Hilfe des „Enhanced Avian HS RT-PCR Kit“ (Sigma-Aldrich) und wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die reverse Transkription wurden jeweils 1–3 µg der extrahierten RNA eingesetzt. Zu dieser Matrize wurden jeweils 1 µl Deoxynukleotid-Mix (Sigma-Aldrich) und 1–3 µM Oligo-dT-*primer* hinzugefügt. Der Ansatz wurde dann mit *dd*H<sub>2</sub>O auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und für 10 min bei 70°C inkubiert. Durch das Erhitzen wurde die RNA denaturiert, wodurch störende Sekundärstrukturen aufgelöst wurden. Nach kurzem Abkühlen wurden 6 µl *dd*H<sub>2</sub>O, 2 µl AMV-RT-Puffer (10x, Sigma-Aldrich), 1 µl RNase-Inhibitor (1 U/µl) und 1 µl Enhanced-Avian reverse Transkriptase (1 U/µl, Sigma-Aldrich) zugegeben. Die cDNA-Synthese erfolgt dann bei 42°C (50 min) in einem Thermocycler.

### 2.2.1.13 Design und Annealing der shRNA-Einzelstränge

Durch den Einsatz von shRNA (*short hairpin* RNA) kann spezifisch die Translation von Proteinen verhindert bzw. ihre Expression herunterreguliert werden. In dieser Arbeit wurde ein Vektor-gestütztes System für die eukaryotische Expression von shRNA verwendet (pTER-Vektor). Für die entsprechenden Zielproteine wurden zunächst einzigartige, genspezifische Zielsequenzen ausgewählt (19–22 nt). Durch eine entsprechende, computer-gestützte Analyse von Gen-Datenbanken (NCBI-Blast) mit dieser Sequenz wurde ausgeschlossen, dass die gleiche Nukleotidfolge in anderen Genen enthalten ist. Um die Zielsequenz in den Vektor einzubringen und um nach der Transkription in der Zelle doppelsträngige RNA zu erzeugen, wurden die ausgewählten Zielsequenzen mit Linkern und einer Schleife (*engl. loop*) ergänzt. Für den verwendeten pTER-Vektor ist die daraus resultierende Sequenz wie folgt aufgebaut:

#### Forward:

5'-GATCCC-shRNA (sense Orientierung)-TTCAAGAGA-shRNA (antisense Orientierung)-TTTTTGGAAA-3'

#### Reverse:

5'-AGCTTTTCCAAAAA-shRNA (sense Orientierung)-TCTCTTGAA-shRNA (antisense Orientierung)-GG-3'

Diese DNA-Oligonukleotidsequenzen wurden synthetisiert (MWG), zu einer doppelsträngigen DNA-Sequenz aneinandergelagert (*engl. annealing*) und in den Zielvektor inkloniert. Jeweils 1 µl der Oligonukleotid-Einzelstränge (10 pmol) wurde in 48 µl Annealing-Puffer gegeben und für 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die

Oligonukleotide für 10 min bei 70°C inkubiert und dann langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Um zu überprüfen, ob dass Aneinanderlagern der Einzelstränge zu doppelsträngiger DNA erfolgreich war, wurden die bearbeiteten Proben, zusammen mit unbehandelten, einzelsträngigen Oligonukleotiden, auf einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (120 Volt, 15 min). Da die aneinandergelagerten Oligonukleotide einen DNA-Doppelstrang bilden, lassen sie sich klar von den nicht-aneinandergelagerten Einzelsträngen unterscheiden und konnten durch eine Gelaufreinigung aus dem Agarosegel isoliert werden. Über eine BglII/HindIII-Klonierung wurden die shRNA-Oligonukleotide dann in den gewünschten Zielvektor (mRFP-pTER, CFP-pTER, EGFP-pTER) inkloniert.

<b>Annealing Puffer</b>	
Kaliumazetat	100 mM
HEPES-KOH pH7,4	30 mM
Mg-Azetat	2 mM

### 2.2.1.14 Kompetente Bakterien

Für die Amplifikation von Plasmid-DNA wurden „XL1 Blue“-Bakterien verwendet. Um eine höhere Transformations-Effizienz der DNA-Plasmide zu erreichen, wurden die Bakterien zuvor einer Calcium-Chlorid Behandlung unterzogen. Die Bakterien wurden „kompetent“ gemacht.

Hierfür wurde von einer LB-Agarplatte eine „XL1 Blue“ Bakterienkolonie gepickt und über Nacht in 20 ml LB-Medium (mit Tetracyclin) bei 37°C auf einem Schüttler (200 U) inkubiert. Am folgenden Tag wurden 7 ml Selektions-LB-Medium (Tetracyclin) mit 0,5 ml dieser Über-Nacht-Kultur angeimpft. Das LB-Medium wurde dann bis zum Erreichen einer  $OD_{600nm}$  von 0,3 bei 37°C auf einem Schüttler (200 U) inkubiert. Mit 5 ml dieser Vorkultur wurden dann 100 ml Selektions-LB-Medium angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,48 kultiviert (37°C, 200 U). Sobald dieser Wert erreicht wurde, wurde die Bakterienkultur auf Eis abgekühlt und für 10 min bei 5000xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 30 ml eiskaltem TFBI-Puffer resuspendiert. Die Bakterien wurden dann für 1–2 Stunden auf Eis inkubiert und erneut, wie oben beschrieben, abzentrifugiert. Das entstandene Bakterienpellet konnte dann in 4 ml eiskaltem TFBII-Puffer resuspendiert und in 200 µl Portionen aliquotiert werden. Diese Aliquots wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und konnten bis zu einem Jahr bei -80°C gelagert werden. Um die Transformations-Effizienz der kompetenten Bakterien zu überprüfen, wurde jeweils ein Bakterien-Aliquot aufgetaut und testtransformiert.

<b>TFB I</b>	
RbCl <sub>2</sub>	100 mM
MnCl <sub>2</sub> /4H <sub>2</sub> O	50 mM
Kaliumacetat	30 mM
CaCl <sub>2</sub> /2H <sub>2</sub> O	10 mM
Glycerol	15 % (v/v)

<b>TFB II</b>	
RbCl <sub>2</sub>	10 mM
MOPS	10 mM
CaCl <sub>2</sub> /2H <sub>2</sub> O	75 mM
Glycerol	15 % (v/v)

→ pH 5,8 einstellen mit 0,2 M Essigsäure

→ pH auf 7,0 einstellen

<b>LB-Medium</b>	<b>1 Liter</b>
Bacto-Trypton	1 % (w/v)
Bacto-Yeast	0,5 % (w/v)
NaCl	0,5 % (w/v)

### 2.2.1.15 Kultivierung und Transformation von Bakterien

Die Amplifikation von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe von kompetenten Bakterien. Durch Transformationen wurde die zu amplifizierende Plasmid-DNA in die kompetenten Bakterien überführt. In den transformierten Bakterien erfolgte dann die eigentliche Amplifikation der Plasmid-DNA.

Für die Transformation des DNA-Plasmids wurde zunächst ein Aliquot (200 µl) der kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut. Die Bakterien wurden dann mit 100 ng der zu transformierenden Plasmid-DNA vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte in einem Wasserbad der Hitzeschock (2 min, 42°C), durch den die Bakterien das Plasmid aufnehmen. Die Bakterien wurden dann für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 1 ml Selektionsantibiotika-freiem LB-Medium (siehe 2.2.1.14) versetzt. Sie wurden dann für 30–40 min bei 37°C inkubiert, um es den transformierten Bakterien zu erlauben die mit dem Plasmid aufgenommenen Resistenzen zu entwickeln. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Bakterien bei 3000xg für zwei Minuten abzentrifugiert. Anschließend wurde 1 ml des LB-Mediums abgezogen. In den verbliebenen 200 µl wurden die Bakterien resuspendiert und auf Selektions-Agarplatten ausplattiert. Nur Bakterien, die erfolgreich transformiert wurden und somit die vom Plasmid vermittelte Resistenz aufweisen, konnten auf den entsprechenden Selektions-Agarplatten wachsen und Kolonien bilden. Um zu gewährleisten, dass die Bakterien nicht zu viele, aber auch nicht zu wenige Kolonien bildeten, wurden jeweils zwei Selektions-Agarplatten pro Transformation ausplattiert. Auf der ersten

Platte wurden 50 µl, auf der zweiten Platte 150 µl der Bakterienlösung verstrichen. Die Selektions-Agarplatten wurden dann über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert und konnten am folgenden Tag auf die Transformationseffizienz überprüft werden. Einzelne Bakterienklone wurden gepickt und für Mini- bzw. Maxi-Präparationen weiterkultiviert. Die Selektions-Agarplatten mit den Bakterien wurden bei 4°C bis zu vier Wochen gelagert.

<b>LB-Agar</b>	
Bacto-Trypton	1 % (w/v)
Bacto-Yeast	0,5 % (w/v)
NaCl	0,5 % (w/v)
Agar	1,4 % (w/v)

#### **2.2.1.16 Plasmidisolierung aus Bakterien (Mini- und Maxi-Präparation)**

Zum Isolieren der Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien wurden sogenannte Mini- und Maxi-Plasmidpräparationen vorgenommen. Diese Präparationen basieren auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) und wurden mit Hilfe von Plasmid-Purification-Kits (Qiagen) durchgeführt. Je nach gewünschter Menge der zu isolierenden Plasmid-DNA wurden verschiedene Kits verwendet. Für kleinere Mengen Plasmid-DNA, die beispielsweise für die Überprüfung von Klonierungsexperimenten verwendet wurden, wurde das „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen) benutzt, für größere Mengen das „QIAfilter Plasmid Maxi Kit“ (Qiagen). Die Präparation erfolgte in jedem Fall nach den Protokollen und Empfehlungen des Herstellers.

##### Plasmid-Minipräparation:

Zunächst wurden mit Hilfe eines autoklavierten Zahnstochers Bakterienkolonien von den entsprechenden Selektions-Agarplatten gepickt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Diese wurden über Nacht in 4 ml LB-Medium (siehe 2.2.1.14; mit entsprechendem Antibiotikum) auf einem Schüttler (37°C, 200 U) inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Bakterien abzentrifugiert, in den vom Kit bereitgestellten Puffern (P1, P2) resuspendiert und anschließend lysiert. Nach Abschluss der alkalischen Lyse wurden die im Lysat enthaltenen Proteine und die an die Bakterienmembran gebundene, chromosomale DNA durch Zugabe eines weiteren bereitgestellten Puffers (Puffer N3) präzipitiert und danach abzentrifugiert (10 min, 13000xg). Der Überstand wurde dann auf eine QIAprep-Spin-Säule (Qiagen) gegeben. Diese Silicamembran-Säule fungiert als Anionentauscher und ermöglicht eine selektive Adsorption von Nukleinsäuren. Nach dem Waschen der adsorbierten DNA mit ethanolhaltigen Puffern (PE-Puffer, Qiagen) konnte die DNA in 50µl *dd*H<sub>2</sub>O bzw. im

bereitgestellten Elution-Puffer (Qiagen) eluiert werden.

### Plasmid-Maxipräparation:

Wie bei der Minipäparation bereits beschrieben, wurden die Bakterien zunächst von den Selektions-Agarplatten gepickt. Die Inkubation der Bakterienklone erfolgte allerdings über Nacht (37°C, 200 U) in 200 ml LB-Medium (siehe 2.2.1.14) mit entsprechendem Selektions-Antibiotikum (siehe Kapitel 2.1.1 Tab. 2.2). Nach dem Abzentrifugieren wurden die Bakterien in den mitgelieferten Kit-Puffern resuspendiert (10 ml P1-Puffer), lysiert (10 ml P2-Puffer), neutralisiert und Proteine, sowie chromosomale DNA gefällt (10 ml P3-Puffer). Im Gegensatz zur Minipräparation wurden bei der Maxipräparation die unerwünschten Präzipitate nicht abzentrifugiert, sondern durch eine spezielle Filter-Spritze abfiltriert. Das Filtrat wurde dann auf eine zuvor äquilibrierte Säule gegeben. Die DNA wurde an der Säule gebunden, mehrmals gewaschen (2 x 20 ml QC-Puffer) und anschließend mit 15 ml QF-Puffer in ein Zentrifugenröhrchen eluiert. Um die Konzentration der eluierten DNA zu erhöhen wurde sie durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol gefällt und dann für 30 min (4°C) bei 15000xg abzentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das DNA-Pellet mit 5 ml 70% Ethanol (v/v) gewaschen und erneut bei 15000xg für 20 min (4°C) zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA vom Ethanol befreit und kurz bei Raumtemperatur getrocknet. Sie konnte nun in 200–600 µl  $d_dH_2O$  aufgenommen werden.

## **2.2.2 Biochemische Methoden**

### **2.2.2.1 Herstellung von Zelllysaten für die SDS-PAGE**

Zur Herstellung von Zelllysaten für die SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE) wurden die Zellen zunächst in 100 mm Zellkulturschalen bis zu einer Dichte von 80–90% kultiviert. Dann wurde das Zellkulturmedium abgezogen und die Zellen 2-3 mal vorsichtig mit 1 x PBS (siehe 2.2.1.1) gewaschen. Verbliebenes PBS wurde mit Pasteur-Pipetten abgesaugt. Je nach gewünschtem Konzentrationsgrad der Zelllysate wurden 200–500 µl reduzierender SDS-Auftragspuffer auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden dann zügig mit einem Gummispatel abgeschabt und in ein gekühltes (4°C) 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das gewonnene Zelllysate wurde dann sofort bei -20°C eingefroren. Vor der Verwendung für eine SDS-PAGE wurde das Lysat aufgetaut, resuspendiert und für 5 min bei 95°C aufgeköcht, um die enthaltenen Proteine zu denaturieren. Vorhandene Disulfidbrücken wurden durch das im Auftragspuffer enthaltene, reduzierend wirkende DTT bzw. Mercaptoethanol gespalten.

<b>Reduzierender SDS-Probenpuffer (6x)</b>	
Tris-HCl	62,5 mM
2% SDS	2% (w/v)
10% Glycerol	10% (w/v)
50 mM DTT	50 mM
Bromphenolblau	0,01 % (w/v)

### 2.2.2.2 Co-Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation ermöglicht es, gezielt Proteine mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers aus Proteinextrakten zu isolieren. Weiterhin ist es möglich, mit dieser Methode Interaktionspartner der isolierten Proteine zu detektieren. Die Interaktionspartner werden durch ihre Bindung an das Zielprotein ebenfalls isoliert. Man spricht von einer Co-Immunpräzipitation.

#### Herstellung von Zelllysaten für die Co-Immunpräzipitation

Für die Co-Immunpräzipitation wurden Zellen in einer 100 mm Zellkulturschale (Cellstar, Greiner) bis zu einer Dichte von 80–90% kultiviert. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig zweimal mit 5 ml PBS-EDTA (37°C) gewaschen, zügig mit einem Gummispatel in 1 ml PBS-EDTA abgekratzt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Um den proteolytischen Abbau der Proteine zu verhindern, wurde dem Lysepuffer (siehe unten) zusätzlich ein Protease-Inhibitor-Cocktail (siehe unten) zugefügt. Die Zellen wurden dann für 15 s bei 10000xg abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 ml vorgekühltem (auf Eis) Lysepuffer aufgenommen. Um eine möglichst vollständige Lyse der pelletierten Zellen zu erreichen, wurde das Reaktionsgefäß gevortext und anschließend für zwei Stunden in einem Überkopfschüttler bei 4°C langsam rotiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden verbliebene Zellrückstände abzentrifugiert (14000xg, 20 min, 4°C) und der Überstand (= Zelllysat) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Zelllysat konnte dann direkt für Immunpräzipitationen verwendet oder für spätere Versuche eingefroren werden.

#### Vorbereiten der Sepharose-Beads:

Mit Hilfe von an Sepharose beads gekoppelten Antikörpern, können gezielt Proteine aus dem Zelllysat extrahiert werden. In Abhängigkeit von der Spezies, aus der die Antikörper stammen, und je nachdem, um welche Antikörper-Klasse es sich handelt, wurden



verschiedene Sepharose-Beads für das Koppeln der Antikörper verwendet. Protein-A-Sepharose-Beads eignen sich hierbei besonders für die Kopplung mit Kaninchen-, Katzen-, Mensch-, Schwein- und Meerschweinchen-IgG-Antikörper sowie Maus-IgG<sub>2a</sub> und -IgG<sub>2b</sub>-Antikörper. An Protein-B-Sepharose hingegen binden stark IgG-Antikörper aus Schaf, Kuh, Ziege, Pferd, Kaninchen und Meerschweinchen, außerdem Maus IgG<sub>1</sub>- und IgG<sub>3</sub>-Antikörper. Vor Beginn der Immunpräzipitation wurden die Sepharose-Beads (Protein-A-Sepharose CL-4B, Amersham Biosciences) für den Versuch vorbereitet. Hierfür wurden 300 mg der getrockneten Beads abgewogen und mit 10 ml Lysepuffer über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Lysepuffer vorsichtig abgezogen und durch frischen Lysepuffer (10 ml) ersetzt. Die gequollenen und gereinigten Sepharose-Beads konnten dann für Versuche verwendet werden.

### Vorreinigung der Zellysate:

Um unspezifische Proteinbindungen an den Sepharose-Beads zu verhindern, kann mit Hilfe der hergestellten Zellysate eine sogenannte Vorreinigung durchgeführt werden. Dadurch werden Proteine aus dem Zellysate entfernt, die unspezifisch an die Sepharose-Beads binden und somit später zu falschen Signalen führen können.

Für das Vorreinigen der Zellysate wurden 50 µl der gequollenen und gereinigten Sepharose-Beads in 1,5 ml Reaktionsgefäße mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze pipettiert, um die Beads nicht zu beschädigen und je zweimal mit 500 µl Lysepuffer gewaschen. Anschließend wurden die Beads für 30 s bei 10000xg abzentrifugiert und der entstandene Überstand verworfen. Auf die Beads wurden dann jeweils 600 µl des entsprechenden Zellysates gegeben und für 30–60 min bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (10000xg, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das gereinigte Zellysate in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die verwendeten Beads wurden bei -20°C gelagert, vor der Verwendung mit Auftragspuffer versetzt, aufgekocht und bei der späteren SDS-PAGE als Kontrolle mit auf das entsprechende Gel aufgetragen.

### Immunpräzipitation:

In Abhängigkeit von den verwendeten Zielprotein-spezifischen Antikörpern wurde eine geeignete Menge der Antikörperlösung in 5-10 µl PBS (1x) verdünnt, zu dem Zellysate hinzugegeben und bei 4°C für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden 50 µl der gequollenen und gewaschenen Beads hinzugefügt. Das Zellysate wurde dann für 2 Stunden bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Danach wurden die Beads bei 5000xg (4°C) für 30 s abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Die Beads wurden dann dreimal mit 1 ml eiskaltem Waschpuffer gewaschen, um überschüssiges Zellysate zu

entfernen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Die Beads wurden dann in 50 µl Nicht-reduzierenden-SDS-Puffer aufgenommen. Vor der Verwendung für eine SDS-PAGE mussten die Beads gevortext und für 2 min bei 95°C aufgeköcht werden. Nach kurzem Abzentrifugieren (1000xg, 5-10 s) konnte dann der Überstand auf das SDS-PAGE-Gel aufgetragen werden.

<b>Protease-Inhibitor Cocktail</b>	
Leupeptin	10 µM
Pepstatin	10 µM
Aprotinin	20 µg/ml

<b>IP-Wasch Puffer</b>	
Nonidet P-40 / Empigen BB	0,1% (v/v)
EDTA	5 mM
In PBS; pH 7,4	-

<b>Nicht-reduzierender SDS-Probenpuffer (4x)</b>	
1,5 M Tris pH 6,8	62,5 mM
SDS	2% (w/v)
Glycerol	10% (w/v)
Bromphenolblau	0,01 % (w/v)

<b>IP-Lyse Puffer</b>	
Nonidet P-40 / Empigen BB	1% (v/v)
EDTA	5 mM
PMSF	0,1 mM
In PBS; pH 7,4	-

In späteren Versuchen wurde anstelle des Protease-Inhibitor-Cocktails der Breitband Inhibitor „Complete“ von Roche verwendet. Auf 50 ml Puffer wurde eine Tablette eingesetzt.

### 2.2.2.3 Keratinisolierung aus Zellen

Zum Aufreinigen von Keratinen aus Gesamtzelllysaten wurde ein Hochsalz-Puffer (siehe unten) verwendet. Die Zellen wurden auf 100 mm Zellkulturschalen bis zu einer Dichte von 90–100% kultiviert.

Zunächst wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS (1 x) gespült, um das Kulturmedium und eventuell hinzugefügte Drogen sorgfältig zu entfernen. Anschließend wurden sofort 500 µl eiskalter Hochsalz-Puffer zugegeben. Die Zellen wurden nun zügig mit einem Gummispatel abgeschabt und in ein auf Eis vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt, um eine Degradierung der Proteine zu verhindern. Die Zellen wurden in einen Dounce-Homogenisator überführt und mit 30 Stößen homogenisiert. Anschließend wurde mit Hochsalz-Puffer auf 10 ml aufgefüllt und 1 µl Benzonase hinzugegeben. Das Lysat wurde dann für mindestens 2 Stunden (über Nacht Inkubation auch möglich) bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert und anschließend für 20 min bei 4°C und 4000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet zweimal mit jeweils 10 ml PBS (1x) + PMSF (auf 4°C vorgekühlt) gewaschen, gevortext und

wiederum für 20 min bei 4000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Pellet in 100 µl SDS-Probenauftragspuffer (siehe 2.2.2.1) aufgenommen. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.

<b>Hochsalz-Puffer</b>	
Tris pH 7,5	10 mM
NaCl	140 mM
EDTA	5 mM
Triton-X 100	1% (v/v)
DTT	1 mM
KCl	1,5 M
PMSF	100 µg/ml
<i>dd</i> H <sub>2</sub> O	-

#### **2.2.2.4 Poly-Acrylamid-Gel Elektrophorese (PAGE):**

Das Molekulargewicht von Proteinen aus Zelllysaten und Gewebeextrakten wird mit Hilfe der SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese; nach Lämmli, 1970) bestimmt. Die Protein-enthaltenden Proben werden vor dem Auftragen auf das SDS-PAGE-Gel mit reduzierendem (siehe 2.2.2.1, mit DTT) bzw. nicht-reduzierendem (siehe 2.2.2.1, ohne DTT) SDS-Auftragspuffer versetzt und für 5 min bei 95°C hitzedenaturiert. Das anionische Detergenz überdeckt die Eigenladungen der Proteine, es bilden sich anionische Detergenz-Protein-Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die so entstandenen Mizellen durch die poröse Acrylamid-Matrix zur Anode. Kleinere Proteine bewegen sich hierbei schneller durch die Matrix als große Proteine. Dadurch werden die Proteine in Abhängigkeit ihrer Größe bzw. ihres Molekulargewichtes aufgetrennt.

In dieser Arbeit wurde zur Auftrennung der Proteine eine diskontinuierliche Acrylamid-Matrix verwendet, die aus einem 10-12%igen Trenngel bestand, welches mit einem 5%igen Sammelgel überschichtet wurde. Die Gelmatrix wurde mit Hilfe des Protean II Mini-Gelsystems (BioRad) hergestellt, welches aus zwei Glasplatten besteht, die in eine Gießvorrichtung eingespannt werden. Für das Gießen des SDS-PAGE-Gels wurde zunächst das Trenngel angesetzt (siehe unten) und in die Gießvorrichtung gegossen. Um eine gerade Grenze zwischen Sammel- und Trenngel zu erzeugen, wurde das Trenngel mit Isopropanol (60%) überschichtet. Das Trenngel polymerisierte innerhalb von 10-15 min bei Raumtemperatur. In dieser Zeit wurde das 5%ige Sammelgel angesetzt. Es wurde nach

Abgießen des Isopropanols auf das Trenngel gegossen. In das Sammelgel wurde ein Kamm mit 10 Taschen eingelassen, in die später die Proben aufgetragen wurden. Das Sammelgel polymerisierte nach 10-15 min. Die fertigen Acrylamid-Gele wurden dann zur Verwendung in die Elektrophoresekammer des Mini-Protean II System eingespannt und die Kammer mit 1x Elektrophoresepuffer befüllt. Dann wurden die Proben mit einer 100µl-Hamilton-Pipette aufgetragen. Zur späteren Bestimmung des Molekulargewichts der aufgetragenen Proteine wurde außerdem ein Pre-stained Marker (Fermentas) in einer zusätzlichen Geltasche aufgetragen. Die Gelelektrophorese-Kammer wurde mit einem Deckel verschlossen, der mit der Spannungsquelle (PowerPac 300, BioRad) verbunden wurde. Zur Auftrennung der Proteine wurde eine Spannung von 100-200 Volt angelegt, bis die gefärbte Laufmittelfront fast vollständig das Gel passiert hatte. Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden dann wahlweise mit Coomassie Blau (siehe 2.2.2.5) bzw. Silbernitrat (siehe 2.2.2.6) angefärbt oder mittels Elektrotransfer auf eine Membran übertragen (siehe 2.2.2.7).

<b>10% Trenngel</b>	<b>15 ml</b>
H <sub>2</sub> O	5,9 ml
Rotiphorese NF-Acrylamid/ Bis-Lösung 30% (29:1)	5 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	3,8 ml
10% SDS	0,15 ml
10% APS	0,15 ml
TEMED	0,006 ml

<b>12% Trenngel</b>	<b>15 ml</b>
H <sub>2</sub> O	5 ml
Rotiphorese NF-Acrylamid/ Bis-Lösung 30% (29:1)	6 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	3,8 ml
10% SDS	0,15 ml
10% APS	0,15 ml
TEMED	0,006 ml

<b>5% Sammelgel</b>	<b>6 ml</b>
H <sub>2</sub> O	4,1 ml
Rotiphorese NF-Acrylamid/ Bis-Lösung 30% (29:1)	1 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	0,75 ml
10% SDS	0,06 ml
10% APS	0,06 ml
TEMED	0,006 ml

<b>Elektrodenpuffer für 1 Liter SDS-PAGE (10x)</b>	
Glycin	144g
Tris-Base	30 g
SDS	10 g
<i>dd</i> H <sub>2</sub> O	ad 1l

#### **APS (Ammoniumperoxodisulfat)**

Wird 10%ig angesetzt für SDS-PAGE-Gele. Die Aliquots werden bei -20°C gelagert.

### 2.2.2.5 Coomassie-Blau Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Coomassie-Blau bindet unspezifisch an fast alle Proteine. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,1-2 µg Protein. Das SDS-Gel wurde unfixiert für 5-10 min bei Raumtemperatur in die Färbelösung (siehe unten) eingelegt. Anschließend wurde das Gel kurz mit Wasser abgespült und über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler in Entfärbelösung (siehe unten) inkubiert. Wahlweise kann die Entfärbung des Gels auch in einer Mikrowelle erfolgen. Hierfür wird das Gel in ein Glasgefäß mit Wasser gegeben und für 1-2 min in einer Mikrowelle erhitzt. Nach dem Entfärben wurde das Gel getrocknet, oder in Glycerol eingeschweißt.

Färbelösung	
Coomassie Blau	0,25% (w/v)
Ethanol	50% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)

Entfärbelösung	
Ethanol	30% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)

### 2.2.2.6 Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen

Zur Markierung von Proteinen auf Polyacrylamid-Gelen empfiehlt es sich, besonders bei geringen Proteinmengen, das Gel mit Silbernitrat zu färben. Dadurch wird eine 10- bis 100-mal gesteigerte Sensitivität im Vergleich zu einer Coomassie-Färbung erreicht.

Vor Beginn der Färbung wurde das Gel in 50% Ethanol fixiert (15x10cm-Gele 15 min, 20x15cm-Gele >30 min) und anschließend mit *dd*H<sub>2</sub>O kurz abgespült. Dann wurde das Gel unter leichtem Schütteln für 15 min mit der frisch angesetzten Färbelösung inkubiert (siehe unten). Danach wurde das Gel 5 min in *dd*H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend bis zum deutlichen Erkennen von Banden in den Entwickler gegeben. Das Gel wurde dann unverzüglich in die Stopplösung überführt und für etwa 10 bis 15 min inkubiert. Im Anschluss daran konnte das Gel getrocknet oder in Glycerol eingeschweißt werden.

#### Färbelösung:

*Lösung A):* 0,8 g AgNO<sub>3</sub> wurden in einem 50 ml-Erlenmeierkolben abgewogen und in 4 ml *dd*H<sub>2</sub>O gelöst

*Lösung B):* 2,1 ml 1N NaOH wurden in einen 100 ml Erlenmeierkolben mit 1,6 ml NH<sub>3</sub> vermischt.

Die Lösung A) wurde langsam zur Lösung B) gegeben, dabei wurde der Kolben geschwenkt. Anschließend wurde mit *dd*H<sub>2</sub>O auf 100 ml aufgefüllt.

### Entwickler:

250 mg Zitronensäure wurden in einen 250 ml-Erlenmeierkolben gegeben und dieser bis auf 250 ml aufgefüllt (*dd*H<sub>2</sub>O). Nach dem Lösen der Zitronensäure wurden 0,8 ml Formaldehydlösung (37%) zugegeben.

Stopperlösung	
Ethanol oder Methanol	50% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)
<i>dd</i> H <sub>2</sub> O	40% (v/v)

### 2.2.2.7 Semi-dry Western Blot

Durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine lassen sich weiter untersuchen und charakterisieren, indem man sie auf eine Membran überträgt und mit Antikörpern markiert. Diese Western-Blot (Khyse-Andersen, 1984) genannte Methode erlaubt es, die hohe Trennschärfe der SDS-PAGE mit der hohen Spezifität und Empfindlichkeit einer Antikörpermarkierung zu kombinieren. Durch das „Blotten“ der Gele werden die Proteine elektrophoretisch und senkrecht zur Trennrichtung vom SDS-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Die durch hydrophobe Wechselwirkung, an der Membran gebundenen Proteine behalten bei diesem Prozess die Anordnung, die sie durch ihre Auftrennung in der SDS-PAGE erhalten haben. Die Identität der Proteine kann nun mit Hilfe einer Antikörpermarkierung bestimmt werden. Der Protein-spezifische primäre Antikörper bindet hierbei an dem spezifischen Epitop des Zielproteins. An den primären Antikörper wird wiederum ein sekundärer Antikörper gebunden, der über Chemilumineszenz detektiert werden kann.

Das ungefärbte SDS-Gel wurde aus der Laufkammer entnommen und nach dem Abtrennen der Geltaschen in Transferpuffer eingelegt. Sechs Stücke Filterpapier (Whatman-Papier, Schleicher & Schuell) wurden in Gelgröße ausgeschnitten und in Transferpuffer (siehe unten) eingeweicht. Dann wurden drei Lagen des eingeweichten Filterpapiers auf die Anodenplatte des Blotting Gerätes (Transfer Cell Transblot SD, Biorad) gelegt. Auf diese drei Lagen Filterpapier wurde ein Stück, ebenfalls in Transfer-Puffer eingeweichte und auf Gelgröße zugeschnittene, Nitrozellulose gelegt. Dann wurde das SDS-Gel vorsichtig auf der Nitrocellulose platziert und mit drei Lagen eingeweichtem Filterpapier bedeckt. Eventuell entstandene Luftblasen wurden mit Hilfe einer abgeschnittenen serologischen Pipette herausgedrückt. Die Blotkammer wurde nun mit der Kathodenplatte verschlossen und mit dem Netzgerät verbunden. Der Transfer erfolgte für 60–120 min bei 74 mA. Die angelegte Stromstärke wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{1 \text{ mA}}{\text{Geloberfläche (cm}^2)} \times 1,5 = \text{Stromstärke (mA)}$$

Nach dem Proteintransfer wurde die Blotkammer vorsichtig geöffnet und die Filterpapiere entfernt. Die Nitrocellulosemembran konnte dann getrocknet oder direkt für eine Immundetektion verwendet werden. Die Proteine wurden mit Hilfe einer Coomassie- oder Silberfärbung (siehe 2.2.2.5 und 2.2.2.6) markiert, um die Transfereffizienz zu überprüfen.

<b>Transferpuffer (semi-dry)</b>	
Tris-Base	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	10% (v/v)
<i>dd</i> H <sub>2</sub> O	-

#### 2.2.2.8 Ponceau-S-Färbung von Nitrocellulose Membranen

Um die Effizienz des Proteintransfers eines Western-Blots zu überprüfen, bzw. um Proteinbanden vor der Inkubation mit Antikörpern auf der Membran lokalisieren zu können, wurde die Nitrocellulosemembran mit Ponceau-S angefärbt. Dadurch wurden die an der Membran gebundenen Proteine unspezifisch markiert. Die Nachweisgrenze liegt bei dieser Färbung bei 5-15 ng Protein/mm<sup>2</sup>.

Für die Färbung wurde die Nitrocellulosemembran zunächst für 5–10 min in der Ponceau-S Arbeitslösung (siehe unten) inkubiert und anschließend vorsichtig mit TBS (1x) gewaschen. Die markierten Proteinbanden wurden dann mit einem Bleistift auf der Membran markiert und konnten auf diese Weise, auch nach dem kompletten Auswaschen der Ponceau-S-Markierung, weiterhin lokalisiert werden.

<b>Ponceau-S Stammlösung</b>	
Ponceau-S	2% (w/v)
Trichloressigsäure	30% (w/v)
Sulfosalicylsäure	30% (w/v)

**Arbeitslösung:** 1 Volumenteil Stammlösung + 9 Volumenteile *dd*H<sub>2</sub>O

### 2.2.2.9 Immundetektion von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen

Um die von dem SDS-Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulose übertragenen Proteine detektieren zu können, wurden sie mit Zielprotein-spezifischen, Antikörpern markiert. Zuvor mussten die Membranen jedoch geblockt werden, um unspezifische Antikörperbindungen zu reduzieren. Hierfür wurden sie für 1-2 Stunden, unter leichtem Schütteln und bei Raumtemperatur in Blocklösung (siehe unten) inkubiert. Anschließend wurden die Nitrocellulosemembranen vorsichtig mit Waschlösung (siehe unten) gespült, um die überschüssige Blocklösung zu entfernen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper. Dieser wurde in Erstantikörper-Verdünnungslösung (2 ml/Membran, siehe unten) verdünnt und zusammen mit jeweils einer Nitrocellulosemembran luftblasenfrei in Plastikfolie eingeschweißt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler. Am folgenden Tag wurde die Antikörperlösung entfernt und die Membranen wurden dreimal für je 5 min mit Waschpuffer (1 x TBS/T) gewaschen. Anschließend wurden sie mit dem HRP (*Horse-Radish-Peroxidase*) konjugierten Sekundäntikörper (in Blocklösung verdünnt) inkubiert. Dafür wurden die Membranen erneut in Plastikfolie eingeschweißt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einen Schüttler gelegt. Die überschüssigen Sekundäntikörper wurden dann in drei Waschschrritten von jeweils 5–10 min mit Waschlösung abgewaschen. Die Nitrozellulosemembranen wurden in frisch angesetzter ECL-Lösung (siehe unten) für eine Minute unter Lichtausschluss inkubiert und danach sofort in eine Röntgenfilmkassette eingelegt. In der Dunkelkammer wurde dann ein passendes Stück Hyperfilm (Amersham Biosciences) für eine definierte Belichtungszeit (abhängig von Antikörperverdünnung und Versuch) aufgelegt. Der belichtete Film wurde anschließend in ein Entwicklerbad (LX 24, Kodak) gelegt bis die Banden in der gewünschten Stärke sichtbar wurden. Dann wurde der Film kurz in Wasser gewaschen und unter leichtem Schwenken für 10 min in Fixierlösung inkubiert. Zuletzt wurde der Film dann unter fließendem Wasser abgespült und zum Trocknen in einen Trockenschrank mit Gebläse aufgehängt. Nach dem Trocknen konnte der Film eingescannt und die Proteinmarkerbanden von den Blotmembranen übertragen werden.

<b>Blockpuffer</b>	
TBS	1x TBS
Tween - 20	0,1 % (v/v)
Trockenmilchpulver	5 % (w/v)
<i>dd</i> H <sub>2</sub> O	-

<b>Erstantikörper – Verdünnungspuffer</b>	
TBS (10 x)	1 x TBS
Tween - 20	0,1% (v/v)
BSA	5% (w/v)
<i>dd</i> H <sub>2</sub> O	-



<b>TBS (10x)</b>	<b>1 Liter</b>
Tris Base	24,2 g
NaCl	80 g

<b>Waschpuffer (TBS/T)</b>	
TBS (10x)	1 x
Tween - 20	0,1% (v/v)

<b>ECL-Lösung</b>	
<b>Lösung A</b>	
Luminol	250 mM
<b>Lösung B</b>	
Cumarsäure	90 mM
<b>Lösung C</b>	
Tris, pH 8,5	1 M

Vor der Verwendung musste das Reagenz, nach folgendem Protokoll, frisch angesetzt werden:

2000 µl **Lösung A** + 890 µl **Lösung B** + 20 ml **Lösung C** → ad 200 ml  $_{dd}H_2O$

Unmittelbar vor dem Gebrauch wurden zu je 20 ml Reagenz 6,1 µl 30%  $H_2O_2$  hinzugefügt.

### 2.2.2.10 Strippen von Blotmembranen

Blotmembranen können mehrmals hintereinander mit verschiedenen Antikörpern markiert werden, um die Verteilung unterschiedlicher Proteine zu visualisieren. Bevor ein zweiter Antikörper für die Markierung einer Blotmembran verwendet werden kann, muss zunächst der zuvor verwendete Antikörper entfernt werden, um Kreuzreaktionen zu vermeiden. Diesen Vorgang nennt man „*strippen*“ einer Blotmembran. Hierfür wurden die Blotmembranen nach der ersten Verwendung aus der Röntgenkassette entnommen und für 30 min in 50 ml Stripping-Puffer (siehe unten) bei 55°C in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Membranen solange mit  $H_2O$  gewaschen bis kein Mercaptoethanolgeruch mehr wahrnehmbar war. Die Blotmembranen konnten dann wieder geblockt und mit weiteren Primärantikörpern inkubiert werden (siehe 2.2.2.9).

<b>Stripping-Puffer (pH 6,7)</b>	
SDS	2 % (w/v)
Tris-Base	62,5 mM
$_{dd}H_2O$	-

Unmittelbar vor dem Gebrauch wurden zu je 50 ml des Puffers 350 µl Mercaptoethanol hinzugefügt.

## **2.2.3 Methoden der Zellkultur**

### **2.2.3.1 Kultivierung von Zellen**

Für die Versuche dieser Doktorarbeit wurden ausschließlich adhärent wachsende Zelllinien verwendet. Die verschiedenen Zelllinien (siehe Kapitel 2.1.9, Tabelle 2.17) wurden in optimalem Wachstumsmedium (DMEM + 10% FCS) in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Zum Kultivieren der Zellen wurden außerdem 50 ml Zellkulturflaschen (Filtertop, Greiner bio-one) verwendet. Die Zellen wurden wöchentlich zweimal passagiert, um eine optimale Dichte und somit ein optimales Wachstum der Zellen zu gewährleisten. Zunächst wurde hierbei das alte Medium abgesaugt. Die Zellen wurden dann mit warmer (37°C) EDTA-Lösung gewaschen und anschließend mit Hilfe einer Trypsinlösung (0,25% (v/v); in PBS) von der Oberfläche der Zellkulturflaschen abgelöst. Die gelösten Zellen wurden in 5-10 ml Wachstumsmedium (37°C) aufgenommen, durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt und nach einer dem Zelltyp entsprechenden Verdünnung in neue Zellkulturflaschen überführt. Durch leichtes Schwenken der Zellkulturflaschen wurden die Zellen gleichmäßig verteilt. Anschließend wurden die Zellkulturflaschen auf 7 ml mit Wachstumsmedium (37°C) aufgefüllt und bis zur nächsten Passage bzw. bis zur Verwendung der Zellen in einem Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert.

### **2.2.3.2 Vorbereitung von Glasplättchen für die Zellkultur**

Für viele Versuche war es notwendig, Zellen auf Glasplättchen zu kultivieren. Dies erleichterte die Handhabung der Zellen für mikroskopische Untersuchungen.

Die verwendeten Glasplättchen wurden über Nacht in Ethanol eingetaucht, mit fusselfreien Papiertüchern abgetrocknet, für 2 Stunden bei 200°C im Trockenschrank sterilisiert und anschließend steril gelagert. Bei Bedarf wurden sie steril in einer Laminar-Flow-Werkbank in Zellkulturschalen eingebracht. Zuvor mit Hilfe von Trypsinlösung (0,25% (v/v)) vereinzelt und in Abhängigkeit vom Versuch in Wachstumsmedium verdünnte Zellen wurden dann auf die Glasplättchen gegeben werden. Anschließend wurden sie im Brutschrank (37°C; 5% CO<sub>2</sub>) bis zu der gewünschten Dichte kultiviert und für die entsprechenden Versuche mit Hilfe einer sterilen Pinzette entnommen und verarbeitet werden.

### **2.2.3.3 Einfrieren von Zellen**

Zur Sicherung der Zelllinien vor Verkeimungen und um eine Überalterung der Zellen zu verhindern, wurden die Zelllinien daher eingefroren und in flüssigem Stickstoff (-196°C) aufbewahrt. Hierfür wurden die Zellen zunächst bis zu einer Dichte von 90% in

Zellkulturflaschen kultiviert. Anschließend wurden sie mit EDTA-Lösung gewaschen und mit Trypsinlösung (0,25% (v/v)) von der Oberfläche der Zellkulturflasche gelöst. Nach dem Abspülen der Zellen mit 4 ml Wachstumsmedium (37°C) wurden sie vorsichtig vereinzelt, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 1000xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1,5 ml Einfriermedium (DMEM + 10% FCS + 10% DMSO) aufgenommen. Die Zellen wurden dann sofort in ein Cryoröhrchen überführt und in einem Cryocontainer (Nalgene) bei -70°C eingefroren. Am folgenden Tag konnten die Cryoröhrchen dem Cryocontainer entnommen und zur weiteren Lagerung in Stickstofftanks überführt werden.

### **2.2.3.4 Auftauen von Zellen**

Eingefrorene Zellen wurden je nach Bedarf wieder aufgetaut und erneut in Kultur genommen. Hierfür wurden die Cryoröhrchen der entsprechenden Zelllinien dem Stickstofftank entnommen und unter leichtem Schwenken in einem Wasserbad (37°C) aufgetaut. Um Verkeimungen zu vermeiden, wurden die entnommenen Cryoröhrchen nach dem Auftauen zunächst mit Ethanol (70%) gründlich gesäubert. Da das im Einfriermedium (siehe 2.2.3.3) enthaltene DMSO bei Raumtemperatur toxisch auf Zellen wirkt, mussten die weiteren Schritte zügig durchgeführt werden. Der Inhalt der Cryoröhrchen wurde in Zentrifugenröhrchen gegeben, die mit 8 ml Wachstumsmedium (DMEM+10 % FCS) befüllt wurden. Die Zellen wurden dann für 5–10 min bei 1000xg abzentrifugiert. Dabei wanderten sie durch die Mediumsäule und wurden so von dem Einfriermedium befreit. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Das Zellpellet hingegen wurde mit 2 ml Wachstumsmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche mit 5 ml Wachstumsmedium überführt. Die Zellen wurden dann über Nacht im Brutschrank kultiviert und am nächsten Tag auf Verkeimungen überprüft.

### **2.2.3.5 Bestimmung der Zellzahl**

In einigen Versuchen war es wichtig die Anzahl der eingesetzten Zellen abzuschätzen. Eine Methode, die Zellzahl zu bestimmen, ist die Auszählung der Zellen mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer (Roth).

Die Zellen wurden hierfür mit EDTA-Lösung gewaschen, mit Trypsinlösung (0,25% (v/v)) von der Zellkulturflaschenoberfläche abgelöst und in 4 ml Wachstumsmedium aufgenommen. Nachdem die Zellen durch wiederholtes Pipettieren vereinzelt worden waren, wurde mit einer Pipette ein Tropfen der Zellsuspension auf die Zählkammer gegeben. Unter Verwendung eines inversen Mikroskops wurde die Anzahl der Zellen in den markierten Bereichen der

Neubauerkammer ermittelt. Mit Hilfe der folgenden Formel konnte dann die Gesamtanzahl der Zellen in den 4 ml Zellsuspension abgeschätzt werden:

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

### 2.2.3.6 Calcium-Phosphat-Transfektion von Zellen

Als Transfektion wird das Einbringen fremder Plasmid-DNA in eine eukaryotische Zelle bezeichnet. In dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden der Transfektion von Zellen angewendet. Je nach Verträglichkeit und Zelltyp wurde entweder eine Lipotransfektion oder eine Calcium-Phosphat-Transfektion vorgenommen.

Bei der Calcium-Phosphat-Transfektion wird die Plasmid-DNA mit Calciumchlorid- und Natriumphosphat-Puffern vermischt. Es entstehen DNA-Calciumphosphat Komplexe, die ausfallen und von Säugerzellen phagozytiert werden. Dadurch gelangt die kopräzipitierte Plasmid-DNA in die Zellen und kann dort exprimiert werden.

Die zu transfizierenden Zellen wurden in 35 bzw. 60 mm Schalen bis zu einer Dichte von 70–80% kultiviert. Dann wurden für das Herstellen des Transfektionsreagenzes zwei Reaktionsgefäße vorbereitet. In das erste Gefäß wurden 12,5 µg der Plasmid-DNA vorgelegt, 25 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub> hinzugefügt und anschließend mit *dd*H<sub>2</sub>O auf 225µl aufgefüllt. Im zweiten Gefäß wurden 250 µl BES-Puffer (2x) vorgelegt. Dazu wurde anschließend tropfenweise der Inhalt des ersten Gefäßes gegeben. Zur vollständigen Bildung der Calcium-Phosphat-Kristalle wurde das Gemisch für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Transfektionsreagenz konnte dann langsam zu den kultivierten Zellen gegeben werden. Um Verkeimungen vorzubeugen, wurden die Zellen außerdem mit 1% Pen/Strep (Gibco) behandelt. Am folgenden Tag konnten die transfizierten Zellen für Versuche verwendet werden.

<b>BES (2x)</b>	
BES	50 mM
NaCl	280 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 mM
<i>dd</i> H <sub>2</sub> O	-

### 2.2.3.7 Lipotransfektion von Zellen

Eine andere Methode der Transfektion von eukaryotischen Zellen ist die Lipotransfektion. Hierbei werden kationische Lipide verwendet, um die Plasmid-DNA zu binden und in die Zelle einzuschleusen. Die negativ geladene Plasmid-DNA bindet über elektrostatische

Wechselwirkungen an die kationischen Lipide, es entsteht ein DNA-Liposomen-Komplex. Dieser Komplex fusioniert mit der Zellmembran, wodurch die gebundene DNA in die Zelle gelangt.

In dieser Arbeit wurde für die meisten Versuche das Transfektionsreagenz „Lipofectamine 2000“ (Invitrogen) für Lipotransfektionen verwendet. Die Zielzellen wurden bis zu einer Dichte von 70–90% in 35 mm Zellkulturschalen kultiviert. Die Transfektion erfolgte dann steril in einer Lamina-Flow-Werkbank, um Kontaminationen zu vermeiden. Zum Ansetzen des Transfektionsreagenzes wurden zwei Reaktionsgefäße vorbereitet. In das erste Gefäß wurde eine vom Konstrukt abhängige Menge an Plasmid-DNA (Endmenge 4 µg pro Ansatz) pipettiert und mit OPTI-MEM (Gibco) auf 250 µl aufgefüllt. In das zweite Gefäß wurden 3–4 µl Lipofectamine 2000 gegeben und ebenfalls mit OPTI-MEM auf 250 µl aufgefüllt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur, wurde das DNA-OPTIMEM-Gemisch vorsichtig in das zweite Reaktionsgefäß überführt. Durch eine hierauf folgende 20-minütige Inkubation bei RT bildeten sich DNA-Liposomen-Komplexe. Anschließend wurde das fertige Transfektionsreagenz tropfenweise zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden über Nacht in einem Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert und konnten am folgenden Tag für Versuche verwendet werden.

### 2.2.3.8 Generierung stabiler Zelllinien

Stabile Zelllinien bieten im Vergleich zu transient transfizierten Zellen einige wichtige Vorteile. Zum einen ist die kurzfristige Verfügbarkeit der stabil transfizierten Zellen deutlich besser, da sie vor Versuchen nicht erst umständlich transfiziert werden müssen. Außerdem ist der Anteil an Zellen, die das Zielprotein exprimieren, wesentlich höher als bei transient transfizierten Zellen. Dies ist besonders für biochemische Untersuchungen essentiell. Des Weiteren kommt es zwischen den einzelnen Zellen eines stabil transfizierten Zellklons nicht zu starken Schwankungen in der Quantität der Transfektion und der Qualität der Expression der transfizierten Proteine.

Für die Generierung einer stabilen Zelllinie wurde zunächst eine Transfektion der Zellen (siehe 2.2.3.6 und 2.2.3.7) durchgeführt. Nach 24-48 Stunden wurden die Zellen mit Trypsinlösung (0,25% (v/v)) von der Zellkulturschale abgelöst und in 4 ml Wachstumsmedium (37°C) aufgenommen. Dann wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen in drei Reaktionsgefäßen so verdünnt, dass 100, 200 bzw. 300 Zellen auf 10 ml Wachstumsmedium verteilt vorlagen. Nun wurden die 10 ml Zellsuspensionen auf jeweils eine 96-Loch-Platte verteilt, so dass jedes Plattenloch mit 100 µl der verdünnten Zellsuspension befüllt war. Zum Schutz gegen Verdunstung wurden die 96-Loch-Platten dann

mit Frischhaltefolie umwickelt und für 8 bis 10 Tage im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Danach wurden die Platten nach einzelnen Zellklonen abgesucht und diese bis zum Erreichen von 80% Konfluenz weiter kultiviert. Dann wurden die Zellen resuspendiert und in 24-Loch-Gewebekulturschalen überführt. Abschließend wurden die Zellklone dann auf die Expression des transfizierten Zielproteins untersucht.

### **2.2.3.9 Hyperosmotischer Zellstress**

Für einige Experimente wurden Zellen hyperosmotischem Stress ausgesetzt. Diese Art von Stress wurde durch Zugabe von Sorbitol (200 mM) zum Zellkulturmedium erzeugt. Hierfür wurden die Zellen in 35 mm Zellkulturschalen auf Glasplättchen bis zu einer Dichte von 70–80% kultiviert. Dann wurde das Zellkulturmedium (je nach Zelltyp und Experiment) für 5 bis 25 min durch Sorbitol-Medium (200 mM) ersetzt. Anschließend wurden die mit Zellen bewachsenen Glasplättchen aus der Kulturschale entfernt und nach kurzem Abspülen mit PBS (1x, 37°C) mit Methanol/Aceton (siehe 2.2.4.1) fixiert. Die Zellen konnten dann direkt eingebettet oder für Antikörper-Markierungen verwendet werden.

### **2.2.3.10 Hypoosmotischer Zellstress**

In Experimenten, bei denen Zellen hypoosmotischem Stress ausgesetzt wurden, erfolgte ihre Kultivierung zunächst in 35 mm Zellkulturschalen auf Glasplättchen. Nach dem Erreichen von 70–80% Zelldichte wurden dem Wachstumsmedium 150 mM Harnstoff zugesetzt. Je nach Zelltyp und Experiment erfolgte dieser hypoosmotische Schock der Zellen für 5-15 min im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Anschließend wurde das hypoosmotische Medium entfernt und durch das Standard-Wachstumsmedium ersetzt. Die Zellen wurden dann für weitere 10–20 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Glasplättchen aus der Kulturschale entfernt, kurz mit PBS (1x, 37°C) gespült und mit Methanol/Aceton (siehe 2.2.4.1) fixiert. Die Zellen konnten dann direkt eingebettet oder für Antikörper-Markierungen verwendet werden.

### **2.2.3.11 Hitzestress**

Zellen, die Hitzestress ausgesetzt werden sollten, wurden zunächst auf Glasplättchen in 35 mm Zellkulturschalen kultiviert. Nach dem Erreichen einer Zelldichte von 70–80% wurden die Zellkulturschalen für 5–10 min bei 60°C in einem Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Glasplättchen aus der Kulturschale entfernt und nach kurzem Abspülen mit PBS (1x, 37°C) mit Methanol/Aceton (siehe 2.2.4.1) fixiert. Die Zellen konnten dann direkt eingebettet oder für Antikörper-Markierungen verwendet werden.

## 2.2.4 Mikroskopische Methoden

### 2.2.4.1 Fixieren von Zellen

#### Methanol-Aceton Fixierung:

Die mit Zellen bewachsenen Glasplättchen wurden aus den Kulturschalen entnommen und in einen Deckglasständer eingesetzt. Danach wurden die Zellen kurz in 1x PBS (37°C) eingetaucht und anschließend sofort für 5 min in kaltem Methanol (-20°C, 100%) inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen für 10 s in kaltes Aceton eingetaucht. Die fixierten Zellen konnten dann bis zu 24 Stunden bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt oder direkt für Antikörpermarkierungen und/oder (Fluoreszenz-)Mikroskopie verwendet werden.

#### Paraformaldehyd (PFA)-Fixierung:

Zum Abwaschen des verbliebenen Wachstumsmediums wurden die mit Zellen bewachsenen Glasplättchen aus den Zellkulturschalen entnommen und in einen Deckglasständer eingesetzt. Dann wurden die Zellen kurz in 1x PBS (37°C) eingetaucht, wieder aus dem Deckglasständer entnommen und in eine feuchte Kammer auf Objektträger gelegt, die zuvor mit Parafilm überzogenen wurden. Dort wurden sie sofort mit 4% PFA (50-100µl pro Deckglas) überschichtet und für 10 min bei 4°C mit inkubiert. Anschließend wurden die Glasplättchen erneut in einen Deckglasständer überführt und für 15 min bei 4°C in 1xPBS gewaschen. Nach diesem Waschschritt wurden die Glasplättchen erneut in die feuchte Kammer gelegt und mit 0,01% Digitonin-Lösung überschichtet. Das Detergenz Digitonin diente hierbei zum Aufbrechen der Plasmamembran fixierter Zellen. Dies ist notwendig damit Antikörper in die Zelle eindringen und die entsprechenden Proteine markieren können. Nach der Digitonin Behandlung wurden die Zellen erneut für 10-15 min mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden sie für 10–15 min mit 5% BSA geblockt, um unspezifische Markierungen zu verhindern. Nach erneutem, kurzem Waschen konnten die Zellen dann mit dem Erstantikörper markiert werden (siehe 2.2.4.2).

### 2.2.4.2 Immuncytochemische Antikörpermarkierung

Durch eine immunzytochemische Antikörpermarkierung können gezielt Proteine in fixierten Zellen markiert werden. In dieser Arbeit wurden zahlreiche Proteine mit Hilfe von spezifischen Erstantikörpern und den entsprechenden, fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern detektiert.

Hierfür wurden zunächst die auf Glasplättchen kultivierten Zellen fixiert (siehe 2.2.4.1) und anschließend in einer feuchten Kammer inkubiert. Der zu verwendende Primärantikörper wurde kurz abzentrifugiert, um Präzipitate zu entfernen und Antikörper-spezifisch (siehe

Kapitel 2.1.6, Tabelle 2.9) in 1x PBS verdünnt. Mit dieser verdünnten Antikörperlösung wurden dann die fixierten Zellen gleichmäßig überschichtet (50 µl/Deckglas) und für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Glasplättchen aus der feuchten Kammer entfernt, in einen Deckglasständer eingesetzt, für 15 min in 1x PBS gewaschen und wieder zurück in die feuchte Kammer überführt. Die Zellen wurden dann mit dem entsprechenden, in 1x PBS vorverdünnten Sekundärantikörper überschichtet (50 µl/Deckglas) und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Je nach Verwendungszweck und Experiment standen verschiedene, mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelte Sekundärantikörper, aus unterschiedlichen Spezies, zur Auswahl (siehe Kapitel 2.1.6. Tab. 2.10). Nach der Inkubation mit den Sekundärantikörpern wurden die Zellen ein letztes Mal für 15–20 min in 1x PBS gewaschen, um überschüssige unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurden die Glasplättchen kurz mit *dd*H<sub>2</sub>O gespült, um der Entstehung von Salzkristallen durch das trocknende PBS vorzubeugen. Für die spätere mikroskopische Analyse wurden die Glasplättchen abschließend mit Elvanol auf Objektträgern fixiert (siehe 2.2.4.3).

### 2.2.4.3 Einbetten von Zellen und DAPI-Färbung

Nach der Fixierung und wurden die auf Glasplättchen kultivierten Zellen auf Objektträger aufgebracht. Die Glasplättchen wurden hierfür zunächst kurz mit *dd*H<sub>2</sub>O gespült, um eventuell verbliebene Salzreste zu entfernen. Anschließend auf einen Objektträger gelegt, auf dem sich ein Tropfen Elvanol befindet. Das Elvanol dient zur Konservierung der Fluoreszenzmarkierung und zur Fixierung der Glasplättchen auf dem Objektträger. In einigen Fällen wurde dem Elvanol zur Markierung der Zellkerne DAPI oder Hoechst 33258 hinzugefügt (0,1 µg/ml). Nach dem Aufbringen der Glasplättchen auf die Objektträger wurden diese über Nacht bei 4°C inkubiert, um ein Aushärten des Elvanol zu ermöglichen.

<b>Elvanol</b>
----------------

1 g Mowiol 4-88 (Sigma-Aldrich) wurde in 4 ml 1xPBS (pH 8.0) gelöst. Die Lösung wird 16 Stunden gerührt und danach mit 2 ml Glycerin versetzt. Nach einer 15 minütigen Zentrifugation (12000xg) wird der Überstand abgenommen und aliquotiert.
--



#### 2.2.4.4 Fluoreszenzmikroskopie und Lebendzellmikroskopie

Die Analyse der fluoreszenzmarkierten Präparate erfolgte mit Hilfe eines inversen Olympus IX 70 Mikroskops. Für die Analyse der fluoreszenzmarkierten Zelllinien erforderliche Excitationswellenlängen (siehe unten) wurden mit Hilfe eines „Polychrome IV“ Monochromators (TILL-Photonics) erzeugt.

Um Autofluoreszenz und andere unerwünschte optische Effekte, die durch Plastikzellkulturschalen hervorgerufen werden zu vermeiden, wurden Zellen auf speziellen  $\gamma$ -sterilisierten Glasbodenschalen kultiviert (MaTek). Um zu gewährleisten, dass die lebenden Zellen längere Aufnahmezeiten unbeschadet überstehen, wurde das Kulturmedium vor dem Beginn der Aufnahme durch Hanks-Hepes Medium ersetzt. Das in dieser Lösung enthaltene Hepes wirkt als Puffer, der verhindert, dass die Zellen aufgrund von CO<sub>2</sub>-Mangel im Laufe der Aufnahmen absterben. Außerdem wurde die für lebende Zellen benötigte Temperatur von 37°C mit Hilfe einer Heizung und einer das Mikroskop umgebenden Plexiglaskammer aufrechterhalten. In Abhängigkeit von den für die Markierung der transfizierten Proteine verwendeten Fluorophoren wurden die Proben mit entsprechend langwelligem Licht bestrahlt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Proben nicht zu lange dem Licht ausgesetzt waren, um zytotoxische Effekte auszuschließen.

Des Weiteren verfügte das verwendete Mikroskop über einen Shutter (Uniblitz VMM-D1; Vincent Associates), der es ermöglichte zwischen Fluoreszenz- und Phasenkontrastanregung zu wechseln. Dadurch war es möglich, gleichzeitig computergesteuerte Filme von Fluoreszenzmarkierung und von Phasenkontrastaufnahmen der Zellen anzufertigen. Während längerer Lebendzellaufnahmen erlaubte ein Piezo-gesteuerter Schrittmotor (Physik Instrumente) die Justierung der Fokusebene der Objektive. Dadurch konnten Zellbewegungen, die zu einem Verlust der Fokusebene geführt hätten, noch während der Aufnahme ausgeglichen werden. Der motorisierte Mikroskoptisch (Märzhäuser) konnte zusätzlich mit Hilfe eines Joysticks, der außerhalb der Klimakammer angebracht war, gesteuert werden. Die Aufnahmen erfolgten mit Hilfe einer IMAGO „slow scan charged-coupled device“ Kamera (TILL-Photonics), die durch die Software TILLvisION (TILL-Photonics) gesteuert wurde.

<b>Fluorophore</b>	<b>Excitation</b>
EGFP	496nm
CFP	436nm
DAPI	400nm
YFP	498nm
mRFP	570nm

<b>Hanks-Hepes</b>	
Hanks-Salzlösung (HBSS ohne Phenolrot)	200 ml
MEM <i>non-essential amino acid solution</i> (100x)	2,2 ml
MEM <i>essential amino acid solution</i> (50x)	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

Die Lösung wurde steril filtriert und anschließend mit 25 mM HEPES versetzt.

#### **2.2.4.5 Messung Transportgeschwindigkeit von Keratinpartikeln**

Um die Geschwindigkeit zu bestimmen, mit der ein Keratinpartikel in der Zelle transportiert wird, wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Olympus IX 70) Zeitrafferaufnahmen lebender Zellen angefertigt. Die Zellen wurden hierfür, wie bereits beschrieben, auf Glasbodenschalen in Hanks-Hepes-Puffer kultiviert (siehe 2.2.4.4) und mit Hilfe des beschriebenen Fluoreszenzmikroskopes über einen definierten Zeitraum gefilmt. Die Positionen einzelner Keratinfilamente wurden in jedem Einzelbild der Zeitrafferaufnahme markiert. Anschließend wurden die Einzelbilder übereinander projiziert und mit Hilfe eines Computerprogramms die zurückgelegten Strecken der Keratinpartikel in aufeinander folgenden Aufnahmen gemessen. In Abhängigkeit vom Aufnahmeabstand konnte dadurch die Durchschnittsgeschwindigkeit der Partikelbewegung ermittelt werden.

#### **2.2.4.6 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie**

Bilder fluoreszenzmarkierter Präparate wurden zum Teil mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops von Leica Microsystems aufgenommen. Das inverse DMI 6000 CS Trino Mikroskop von Leica ist mit einem SP5 Punkt-Scanningsystem und einem Resonanzscanner ausgerüstet. Mit Hilfe des Resonanzscanners konnten sehr schnelle Aufnahmen (8000Hz) durchgeführt werden. Dies ist besonders bei Lebendzellenaufnahmen notwendig, um die zytotoxischen Effekte des Laserlichts zu begrenzen. Um Lebendzellenaufnahmen zu ermöglichen, ist das Mikroskop mit der Klimakammer „The Box“ von *Life imaging sciences* und der dazugehörigen Klimavorrichtung „The Cube“ ausgerüstet. Für die Kultivierung der Zellen galten die gleichen Voraussetzungen wie in Kapitel 2.2.3.1 beschrieben. Die Fluoreszenzbilder wurden durch drei Konfokal-Detektoren aufgezeichnet. Die Steuerung des Mikroskops und der Aufnahmen erfolgte über einen motorisierten

Fokustrieb und unter Verwendung der Leica Software LAS-AF. Zur Anregung der Fluoreszenzmarkierungen in den Zellen standen vier Laser zur Verfügung. Jeweils ein 405 Diodenlaser, ein Argonlaser, ein DPSS 561 Laser und ein HeNe633 Laser. Die entsprechenden möglichen Excitationswellenlängen können der folgenden Tabelle entnommen werden.

<b>Fluorophore</b>	<b>Excitation</b>	<b>Laser</b>
DAPI	405 nm	405 Diode
CFP	458 nm	Argon
Cy2, Alexa 488, Fitec, GFP	488 nm	Argon
EGFP	496 nm	Argon
YFP	514 nm	Argon
DsRed, Cy3, mRFP	561 nm	DPSS 561
Cy5	633 nm	HeNe 633

#### **2.2.4.7 Elektronische Datenverarbeitung**

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten wurden mit Hilfe eines PC bearbeitet. Unter Verwendung der PC-Programme Adobe Photoshop (CS und CS2; Adobe Systems) und Corel Draw 12 (Corel) wurden die Rohdaten der Fluoreszenzaufnahmen und der eingescannten Immunoblots zurechtgeschnitten. Die Tonwert- und Kontrastkorrekturen wurden bei allen Bildern und Blots, auch den Negativkontrollen im selben Maßstab ausgeführt und dienten lediglich einer verbesserten drucktechnischen Darstellung. Da die Bilder der Fluoreszenzmarkierungen mit einer Schwarz/Weiss-Kamera bzw. mit dem LSM aufgenommen wurden und somit keine Farbinformationen enthielten, erfolgte eine nachträgliche Kolorierung der Bilder, um eine bessere Visualisierung der aufgenommenen Strukturen zu erreichen.

Für die Messungen der integrierten optischen Dichte der Immunoblots wurde das Programm Gel-Pro Analyzer (Bio-Rad) verwendet. Die Auswertung der Messungen sowie die statistischen Erhebungen erfolgten mit den Programmen Excel (Microsoft) und Sigma-Stat (Systat). Die Zusammensetzung von Einzelaufnahmen zu Filmen und die Nachbearbeitung dieser Filme erfolgte mit dem Programm ImagePro Plus 4 (Media Cybernetics). Sequenzierungen von klonierten DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms Chromas (Conor McCarthy, Technelysium) ausgewertet und exportiert. Die Planung von Klonierungen und das Annealing von Sequenzen erfolgte mit dem Programm Clone-Manager Suite (Sci Ed Central).

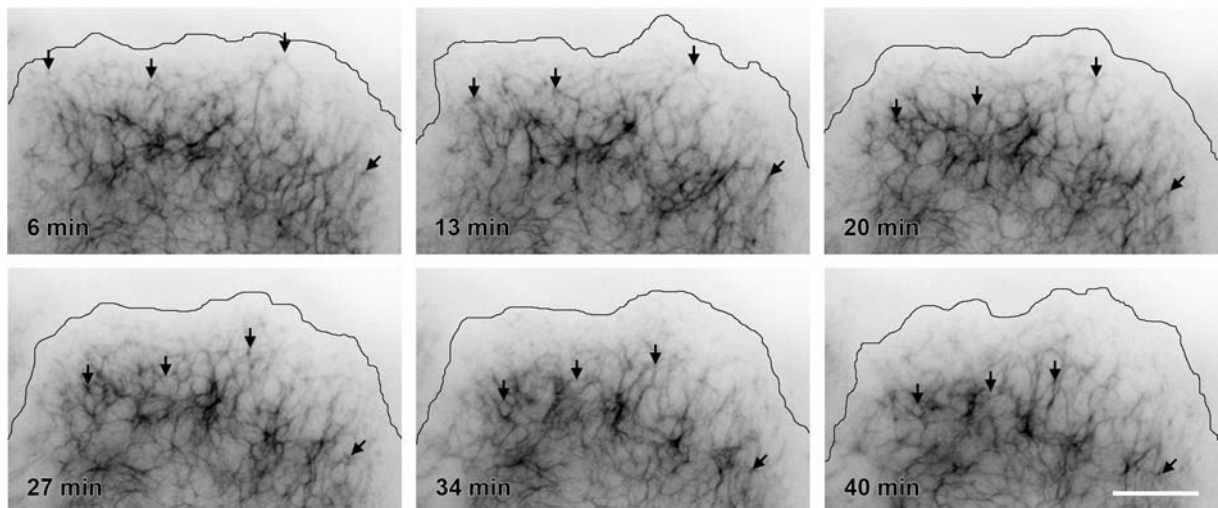
## 3. Ergebnisse

### 3.1 Entstehung und Motilität von Keratinfilamentvorläufern

#### 3.1.1 Keratinfilamentvorläuferbildung in der Peripherie von A431 Zellen

Die Lokalisierung des Entstehungsortes der Keratinfilamentvorläufer (KFP) und die Analyse der Dynamik der KFP in A431 Zellen erfolgten mit Hilfe von Fluoreszenz-Zeitrafferaufnahmen. Hierfür wurden fluoreszenzmarkierte Zellen des AK13-1 Klons verwendet, welche stabil mit EGFP-markiertem HK13 transfiziert sind (Windoffer und Leube, 2001). Mit Hilfe dieser Fluoreszenzmarkierung und unter Verwendung eines inversen Epifluoreszenzmikroskopes konnten durch Zeitrafferaufnahmen Musterveränderungen und Transportereignisse im Keratinsystem der A431 Zellen detektiert und daraus Rückschlüsse auf die Dynamik des Keratinnetzwerks gezogen werden.

In Film 1 ist deutlich zu erkennen, dass sich das Keratinnetzwerk in einer kontinuierlichen, einwärts gerichteten Bewegung befindet. Diese Bewegung ist besonders deutlich im peripheren Zytoplasma der Zellen (siehe Film 1). In diesem membranahen Bereich können außerdem die ersten KFP detektiert werden (Abb. 3.1; Pfeile). Sie entstehen in einem Bereich unmittelbar unter der Zellmembran und bewegen sich ebenfalls in Richtung des Zellzentrums. Diese Beobachtungen bestätigen die Resultate vorangegangener Versuche mit dem gleichen Zellklon (Windoffer und Leube, 2001).



**Abbildung 3.1: Entstehung und Motilität von KFP in der Zellperipherie von AK13-1 Zellen.** Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen der Zellperipherie von AK13-1 Zellen (invertierte Darstellung; Aufnahmeabstand 20 s). Für die komplette Sequenz siehe Film 1. Bildung von KFP im submembranösen Bereich der Zellperipherie (siehe eingezeichnete Plasmamembran). Die KFP bewegen sich in Richtung des Zellzentrums und werden in das periphere Keratinnetzwerk integriert (Pfeile). Größenbalken: 10 µm.

### 3.1.2 Reversible Keratingranulabildung in A431 Zellen während der Mitose und nach Inkubation mit OV

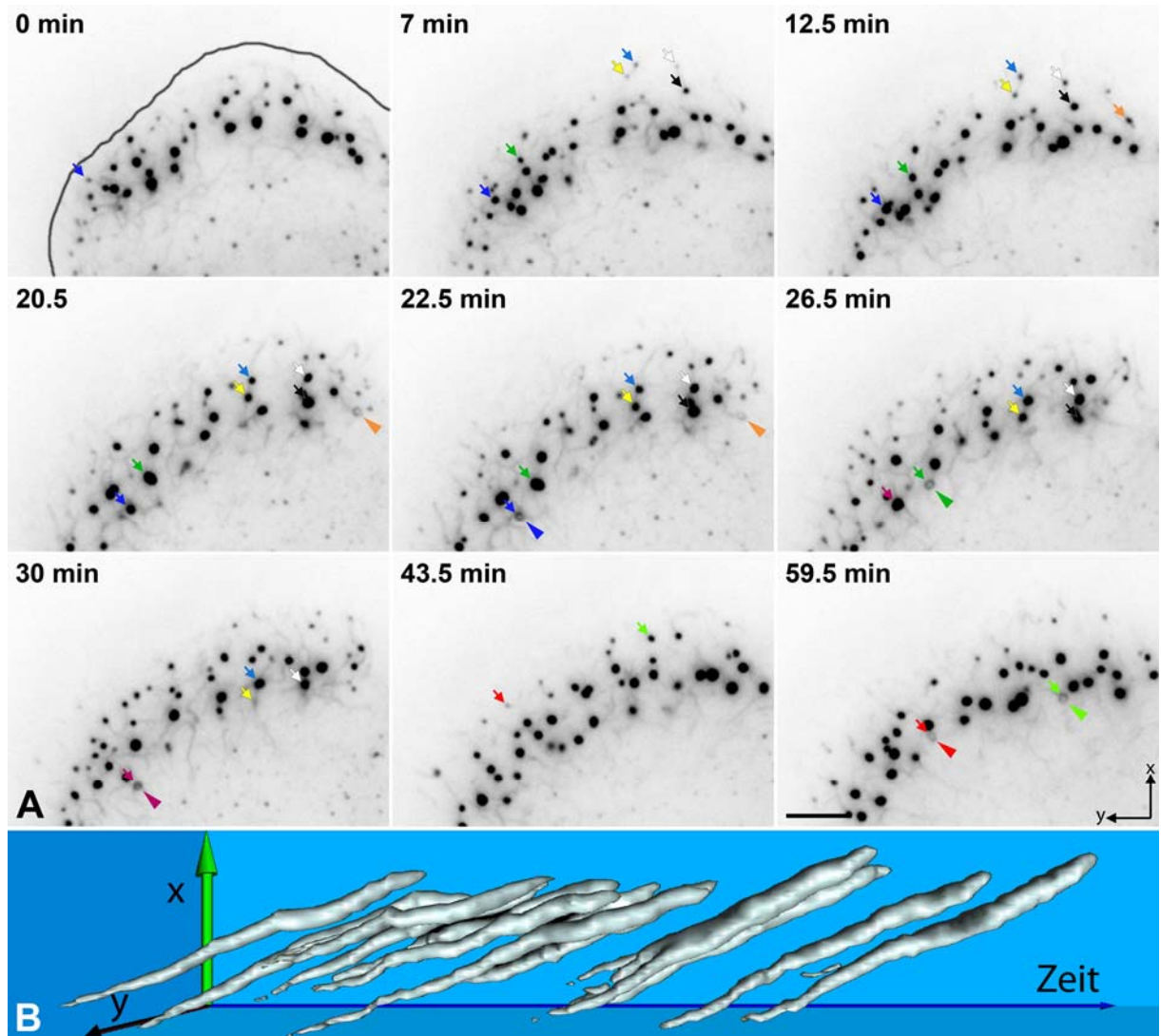
Zu Beginn der Mitose wird das Keratinnetzwerk der A431 Zellen abgebaut. Wie durch Windoffer und Leube (2001) gezeigt wurde, geht dabei ein Teil der Keratine in den löslichen Pool über. Der restliche Teil der vormals filamentösen Keratine bildet Granula, die hauptsächlich in der Zellperipherie lokalisiert sind (Windoffer und Leube, 2001).

Ähnliche Keratingranula können mit Hilfe des Phosphataseinhibitors Orthovanadat (OV) in AK13-1 Zellen induziert werden (Strnad *et al.*, 2002). Sowohl die Bildung der mitotischen Granula, als auch die Entstehung der durch OV induzierten Granula sind reversible Prozesse. Mit Hilfe von Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen wurde die Dynamik des mitotischen und OV induzierten Abbaus in AK13-1 Zellen untersucht (Film 2, 3 und 4).

Zu Beginn der Mitose rundet sich die Zelle zunächst ab. Dabei wird das Keratinnetzwerk innerhalb weniger Minuten (ca. 5 min) aufgelöst. Aus den Keratinfilamenten entstehen Keratingranula, die über die gesamte Zelle verteilt sind (siehe Film 2).

Werden AK13-1 Zellen mit OV (20 mM) inkubiert, bilden sich die ersten Granula bereits nach 5 Minuten. Es zeigte sich, dass diese hauptsächlich im submembranen Bereich der Zellen entstehen (Abb. 3.2 A). Dieser Bereich ist  $< 2 \mu\text{m}$  von der Zellmembran entfernt. Von dort werden sie kontinuierlich in Richtung des Zellzentrums transportiert. Die einzelnen Granula sind durch feine Filamentbrücken miteinander verbunden. Häufig erscheinen sie dadurch wie an einer Schnur aufgereiht (siehe Film 3 und 4). Später neu entstehende Granula konnten in der gleichen Region der Zellperipherie detektiert werden, in der bereits die zuvor entstandenen Granula zum ersten Mal detektiert wurden. Dies lässt auf einen gleichen Entstehungsort schließen. Während des Transports wachsen die Granula um ein Vielfaches an. Weniger als 20 Minuten ( $19,3 \text{ min} \pm 43\text{s}$ ;  $n = 9$ ) nach ihrer Entstehung und einem rasanten Wachstum erreichen die Granula eine scharf begrenzte Übergangszone, in der sie sich wieder auflösen (Abb. 3.2 A, B; Film 3 und 4). Das sehr schnelle Auflösen der Granula ( $< 4,2 \text{ min}$ ;  $n = 9$ ) erfolgte in den meisten Fällen über ein Ringstadium (siehe Pfeilköpfe in Abb. 3.2 A). Dabei löst sich zuerst das Innere der Granula auf, es entstehen Hohlkugeln, aus denen sich seitlich feine Filamente ausbilden. Im Anschluss lösen sich auch diese ringförmigen Strukturen auf (siehe Film 4).

Die Analyse ausgewählter Granula in einem Raum-Zeit-Diagramm verdeutlicht diese Abläufe noch (Abb. 3.2 B). Man erkennt deutlich das Wachstum der Granula und den darauf folgenden schnellen Abbau an einer distinkten Übergangslinie (Abb. 3.2 B).



**Abbildung 3.2: Entstehung, Transport und Abbau von OV-induzierten Keratingranula in AK13-1 Zellen.** (A) Zeitrafferfluoreszenzaufnahmen von EGFP-markierten Keratinen (HK13-EGFP; invertierte Darstellung) in AK13-1 Zellen, die mit 10 mM OV inkubiert wurden. Die Zellmembran (Linie in A) wurde mit Hilfe von Phasenkontrastaufnahmen eingezeichnet. Kleine Granula werden unterhalb der Plasmamembran gebildet. Sie sind mit dünnen Keratinfilamentbrücken miteinander verbunden und bewegen sich in Richtung des Zellzentrums (siehe bunte Pfeile). Dabei wachsen die Granula auf ein Vielfaches ihrer Ausgangsgröße an. Nach Erreichen einer distinkten Zone in der Zellperipherie werden die Granula schnell kleiner und verschwinden (siehe bunte Pfeilköpfe). Der Abbau der Granula geht dabei vom Granulainneren aus und führt über eine Ringform (siehe bunte Pfeilköpfe). (B) Raum-Zeit-Diagramm einer Region aus A (für die Orientierung des Zellausschnitts im Raum-Zeit-Diagramm siehe Markierung in A, 59,5 min), welches die Bewegung der Granula, das Granulawachstum und den schnellen Granulaabbau an einer distinkten Zone zeigt. Größenbalken: 5 µm.

### 3.1.3 Erzeugung und Charakterisierung des SK18/8-2 Klon aus SW-13

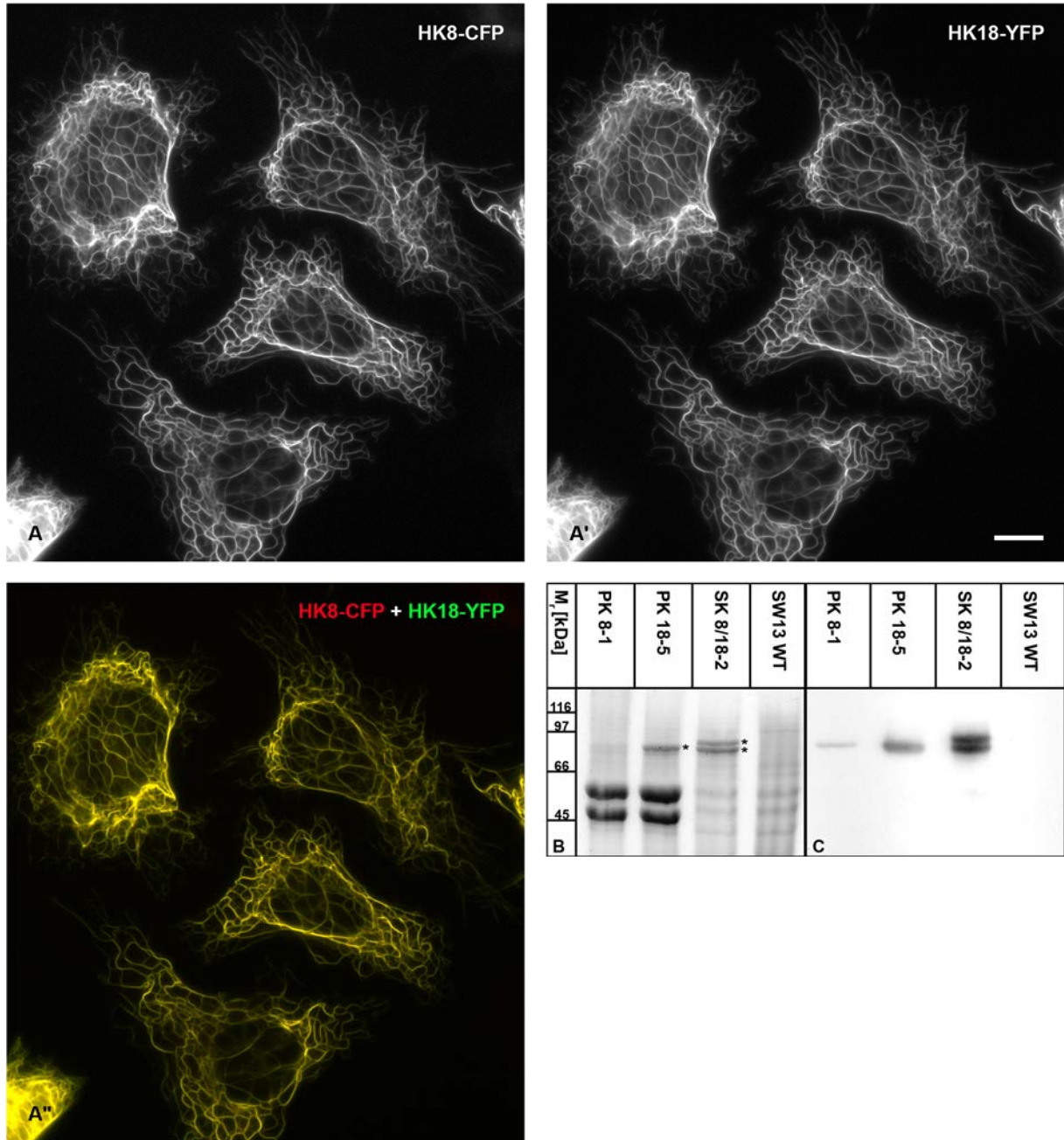
#### Zellen

Alle bisher untersuchten Zelllinien (A431, PLC und HaCat) waren epithelialen Ursprungs (Windoffer und Leube, 1999; Strnad *et al.*, 2002). Bei jeder der genannten Zelllinien konnte die in 3.1.1 und 3.1.2 beschriebene, einwärts gerichtete Keratinbewegung, ausgehend vom submembranen Bereich, beobachtet werden. Um zu untersuchen, ob es sich hierbei nur um ein auf epitheliale Zelllinien beschränktes Phänomen handelt oder ob sich Keratinnetzwerke in nicht-epithelialen Zellen ähnlich verhalten, wurden SW-13 Zellen (Herkunft: Nebennierenrinde) mit HK8-CFP und HK18-YFP bzw. mit HK5-CFP und HK14-YFP kotransfiziert. SW-13 Zellen sind Intermediärfilament-defiziente Zellen, die keinerlei endogene Keratine exprimieren und daher auch kein Keratinfilamentnetzwerk besitzen (Hedberg und Chen, 1986; Yoon *et al.*, 2001). Nach Transfektion der SW13-Zellen mit den Keratin-kodierenden DNA-Plasmiden konnten Keratinfilamentnetzwerke nachgewiesen werden (Film 5). Diese Keratinnetzwerke bestehen vollständig aus fluoreszenzmarkierten Polypeptiden. Um die Eigenschaften und Charakteristika dieser ektopischen Netzwerke genauer zu untersuchen, wurde durch limitierende Selektion der stabile Klon SK8/18-2 isoliert, der sowohl HK8-CFP als auch HK18-YFP exprimiert.

In allen Zellen des SK8/18-2 Klons konnten durch Fluoreszenzmikroskopie Keratinfilamentnetzwerke nachgewiesen werden (Abb. 3.3 A–A''). Die Fluoreszenzmuster von HK8-CFP (Abb. 3.3 A) und HK18-YFP (Abb. 3.3 A') waren nahezu vollkommen identisch (Abb. 3.3 A''), was aufgrund der obligatorischen Heteropolymerisierung auch zu erwarten war. Lediglich eine etwas schwächere Fluoreszenz der CFP-markierten Proteine im Vergleich zu den YFP-markierten Proteinen konnte festgestellt werden. Dies ist jedoch durch die niedrigere Fluoreszenzausbeute der CFP-Fluorophore zu erklären.

Im Folgenden wurden die Keratinpolypeptide durch eine Hochsalzextraktion aus Zellen des Klons angereichert, über eine SDS-PAGE (10%) aufgetrennt und mit Hilfe von Coomassie Blue (Abb. 3.3 B) bzw. Anti-GFP-Antikörpern (Abb. 3.3 C) untersucht. Dabei wurden weder in Wildtyp-SW-13 Zellen noch in Zellen des SK8/18-2 Klons Wildtyp-Keratine detektiert. Das gesamte Keratinnetzwerk des SK8/18-2 Klons setzt sich somit ausschließlich aus fluoreszenzmarkierten Keratinen zusammen. Diese Markierung der Heteropolymere hat keine negativen Auswirkungen auf die Bildung des Keratinnetzwerkes (Windoffer und Leube, 1999). Der SK8/18-2 Klon eignet sich daher und aufgrund seines auch in der Zellperipherie übersichtlichen Netzwerkes besonders gut für Untersuchungen, welche die Entstehung und Entwicklung der Keratinfilamente betreffen.





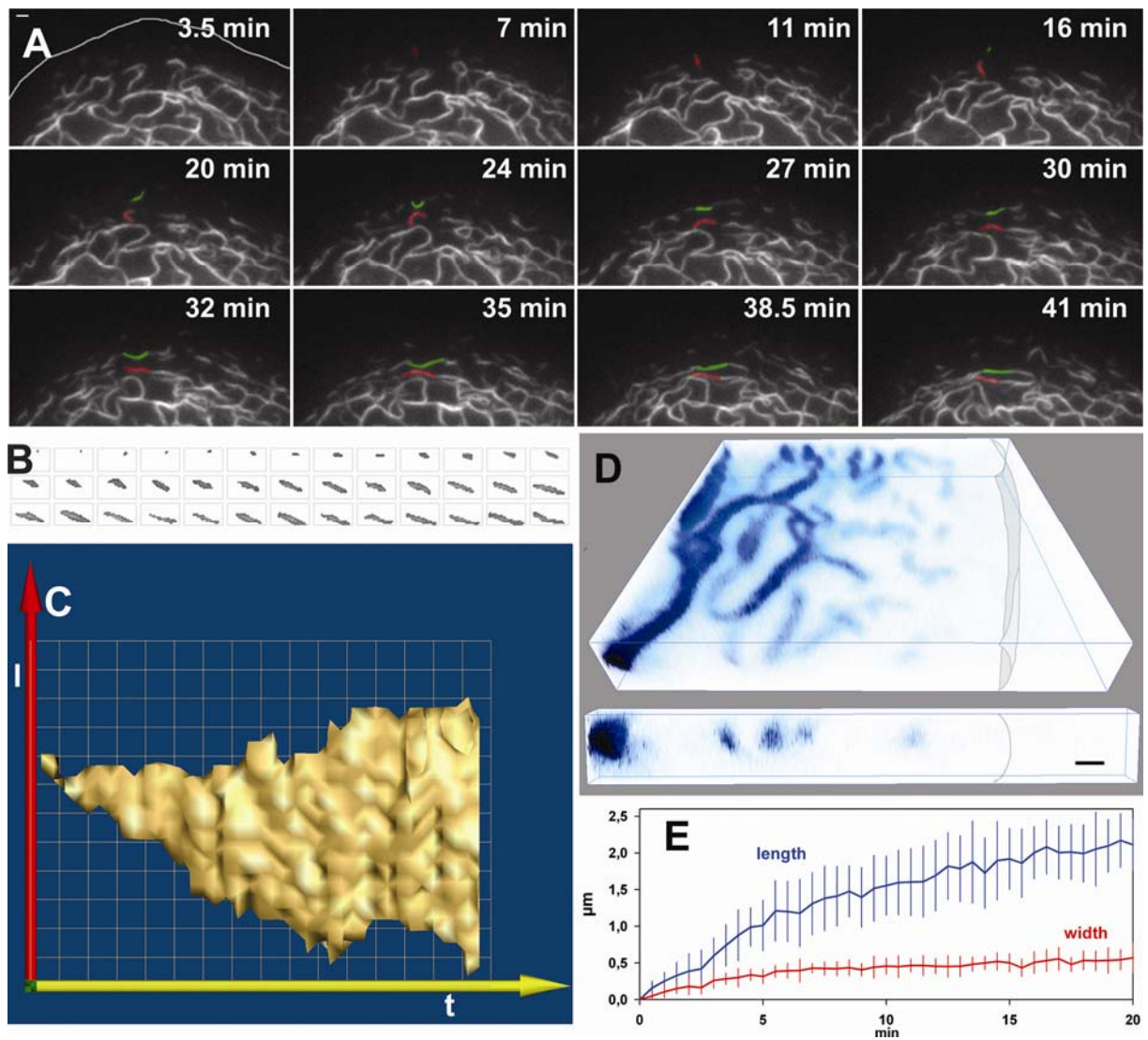
**Abbildung 3.3: Nachweis der fluoreszenzmarkierten Keratinchimären HK8-CFP und HK18-YFP in Zellen des SW13-Klons SK8/18-2.** (A-A'') Fluoreszenzaufnahmen von Methanol/Acetonfixierten SK8/18-2 Zellen. HK8-CFP (A) und HK18-YFP (A') sind im gesamten Filamentnetzwerk der Zellen nach gleichem Muster verteilt und koloalisieren (Überlagerung in A''). Größenbalken: 10  $\mu$ m. (B, C) Coomassie Brilliant-Blue-Markierung (B) und Immunblot-Analyse (C) von Polypeptiden, die in Zytoskelett-Fractionen aus unterschiedlichen Zelllinien angereichert und mit Hilfe einer 10% SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Die Zytoskelettextrakte wurden aus nicht-transfizierten SW13 Zellen und SK8/18-2 Zellen sowie den beiden PLC Zellklonen PK8-1, welcher die trunkierte Keratinchimäre HK8 $\Delta$ T-EGFP exprimiert, und PK18-5 Zellen, welche HK18-YFP produzieren, hergestellt. Die exprimierten Hybridpolypeptide sind in den Zytoskelettfractionen der Zellen durch Coomassie-Blau Markierung (Sterne in B, ausgenommen HK8 $\Delta$ T-EGFP in PK 8-1) und durch Markierung mit GFP-Antikörpern (C) nachweisbar. Zusätzlich dazu sind in den PK8-1 und PK18-5 Zellen die Wildtypkeratine 8 und 18 detektierbar (B, PK 8-1 und PK 18-5). In den SK8/18-2 und SW13 Zytoskelettextrakten hingegen sind lediglich nicht-IF Hintergrundbanden nachweisbar.



### **3.1.4 Entstehung und Entwicklung der KFP in der Zellperipherie von SK8/18-2 Zellen**

Um die Dynamik des Keratinnetzwerks in SK8/18-2 Zellen zu untersuchen, wurden Zeitrafferaufnahmen des fluoreszenzmarkierten Keratinnetzwerks angefertigt. Die Auswertung der Aufnahmen ergab, dass sich auch in diesen nicht-epithelialen Zellen das gesamte Keratinnetzwerk kontinuierlich und unidirektional in Richtung des Zellzentrums bewegt (Film 6 und 7). Am deutlichsten war die Bewegung der Keratine im Bereich der Zellperipherie (Abb. 3.4 A). Dort fanden sich KFP, die zuerst im submembranösen Bereich detektiert werden konnten und kontinuierlich in Richtung des Zellzentrums transportiert wurden. Diese nicht filamentösen Partikel wurden im Weiteren genauer untersucht. Basierend auf Fluoreszenz-Zeitrafferaufnahmen wurden Raum-Zeit Diagramme einzelner Partikel ( $n = 10$ ) erstellt (Abb. 3.4 C) und ausgewertet. Es zeigte sich, dass die in der Peripherie auftauchenden Partikel während ihrer Einwärtsbewegung in die Länge wachsen (Abb. 3.4 B, C und E). Die durchschnittliche Wachstumsgeschwindigkeit konnte dabei für alle erfassten Partikel mit  $\sim 100$  nm/min gemessen werden. In den ersten 5 Minuten war die Wachstumsgeschwindigkeit mit 200 nm/min allerdings deutlich schneller, als in den folgenden 15 Minuten ( $< 100$  nm/min). Nach 15 bis 25 Minuten konnten die individuellen Partikel nicht weiter verfolgt werden, da sie sich zu diesem Zeitpunkt in das bestehende periphere Netzwerk integriert hatten (Film 6). Anders als das Längenwachstum, nahm der Durchmesser der Keratinpartikel nur in den ersten 5 Minuten zu (Abb. 3.4 B, E). Nach Integration der Partikel in das Netzwerk erfolgt dann wieder eine deutliche Zunahme im Filamentdurchmesser (Abb. 3.4 D).

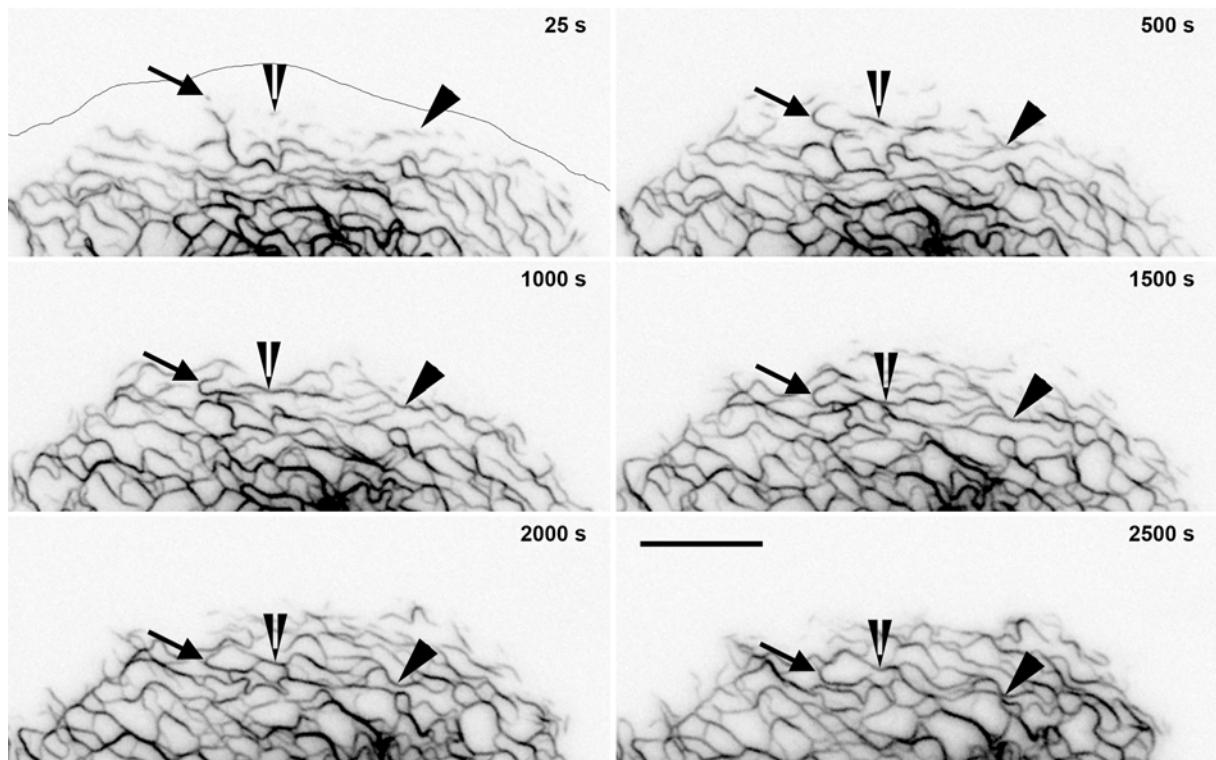
Man kann somit zwei Phasen in der Entwicklung vom Keratinpartikel zum Keratinfilamentvorläufer unterscheiden. In der ersten Phase nimmt sowohl der Durchmesser als auch die Länge der Keratinpartikel schnell zu. In der zweiten Phase bleibt der Durchmesser unverändert. Es kommt jedoch zu einer Elongation der Partikel, die bis zu Ihrer Integration in das periphere Keratinfilamentnetzwerk anhält.



**Abbildung 3.4: Entstehung und Entwicklung von KFP in der Zellperipherie von SK8/18-2 Zellen.** (A) Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen der Entstehung von KFP in einem charakteristischen Ausschnitt der Zellperipherie (Detektion von HK18-YFP). Darstellung der verschiedenen Stadien der KFP-Entwicklung durch die farbliche Hervorhebung zweier KFP. Die Neubildung der KFP in Form kleiner Granula findet unterhalb der Zellmembran statt. Durch Elongation wachsen die KFP und werden durch Fusion in das Keratinfilamentnetzwerk integriert (siehe Film 6). (B) Größenveränderung eines einzelnen KFP, angefangen von seiner Detektion bis zum Einbau in das Keratinfilamentnetzwerk (Aufnahmeabstand = 30s). (C) Ausgehend von (B) erstellter Graph, der die Oberflächenansicht der sich verändernden Partikeldimensionen zeigt. Der Partikel erfährt über die Zeit ( $t$ ) eine beständige, gleichmäßige Elongation ( $l$ ), bevor er mit dem Keratinnetzwerk fusioniert. (D) 3D-Rekonstruktion (Vortex Darstellung) der HK18-YFP Fluoreszenz erstellt aus konfokalen Laser-Scanning-Aufnahmen der Zellperipherie. Deutlich sind Unterschiede in den Filamenten in Abhängigkeit von ihrer Lokalisierung in der Zellperipherie erkennbar (Position der Zellmembran ist markiert). Das Volumen der oberen Box beträgt  $20 \times 20 \times 3,5 \mu\text{m}$ . Die untere Box ist ein Querschnitt durch diese Box und verdeutlicht die Zunahme des KFP-Durchmessers nach Integration in das periphere Keratinfilamentnetzwerk. (E) Zusammenfassende Grafik einer Analyse von 10 Raum-Zeit-Diagrammen, die das Wachstum in der Länge (blaue Linie) und der Breite (rote Linie) der entstehenden KFP veranschaulicht. Man beachte die stetige Zunahme in der KFP-Länge über die gesamte Messdauer. Der Zuwachs in der KFP-Dicke ist hingegen auf die ersten 5 Minuten beschränkt. Größenbalken:  $1 \mu\text{m}$  in A und D.

### 3.1.5 Flexibilität und Fusionskompetenz der Keratinpartikel

Mit Hilfe der Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen konnten noch weitere Eigenschaften der Keratinpartikel aufgedeckt werden. Im Zuge der Einwärtsbewegung können benachbarte Partikel miteinander an ihren Enden fusionieren und so längere Partikel erzeugen (Abb. 3.5 gespaltener Pfeilkopf; Film 6 und 7). Auf die gleiche Weise erfolgt vermutlich auch die Integration der Partikel in das bestehende Netzwerk. Erreichen die Keratinpartikel den peripheren Bereich des Keratinnetzwerkes, fusionieren sie über ihre Enden mit bestehenden Keratinfilamenten. (Abb. 3.5; Film 7; siehe auch Abb. 3.4 A). Sowohl die Fusion der Partikel untereinander als auch ihre Integration in das Keratinnetzwerk erfolgt ausschließlich über die Enden der KFP. Diese Vorgänge werden durch eine weitere Eigenschaft der Keratinpartikel erleichtert. Sie sind keinesfalls starre bzw. spröde Strukturen, sondern ausgesprochen flexibel und in der Lage sich je nach Bedarf zu verbiegen (Abb. 3.5 Pfeil; Film 7). Die Partikelenden können dadurch leicht in Kontakt mit potentiellen Fusionspartnern treten. Nach Integration in das Keratinnetzwerk wandern die Filamente weiter kontinuierlich in Richtung des Zellzentrums. Sie vergrößern sich weiter und bilden dickere Filamentbündel (Abb. 3.4 D).

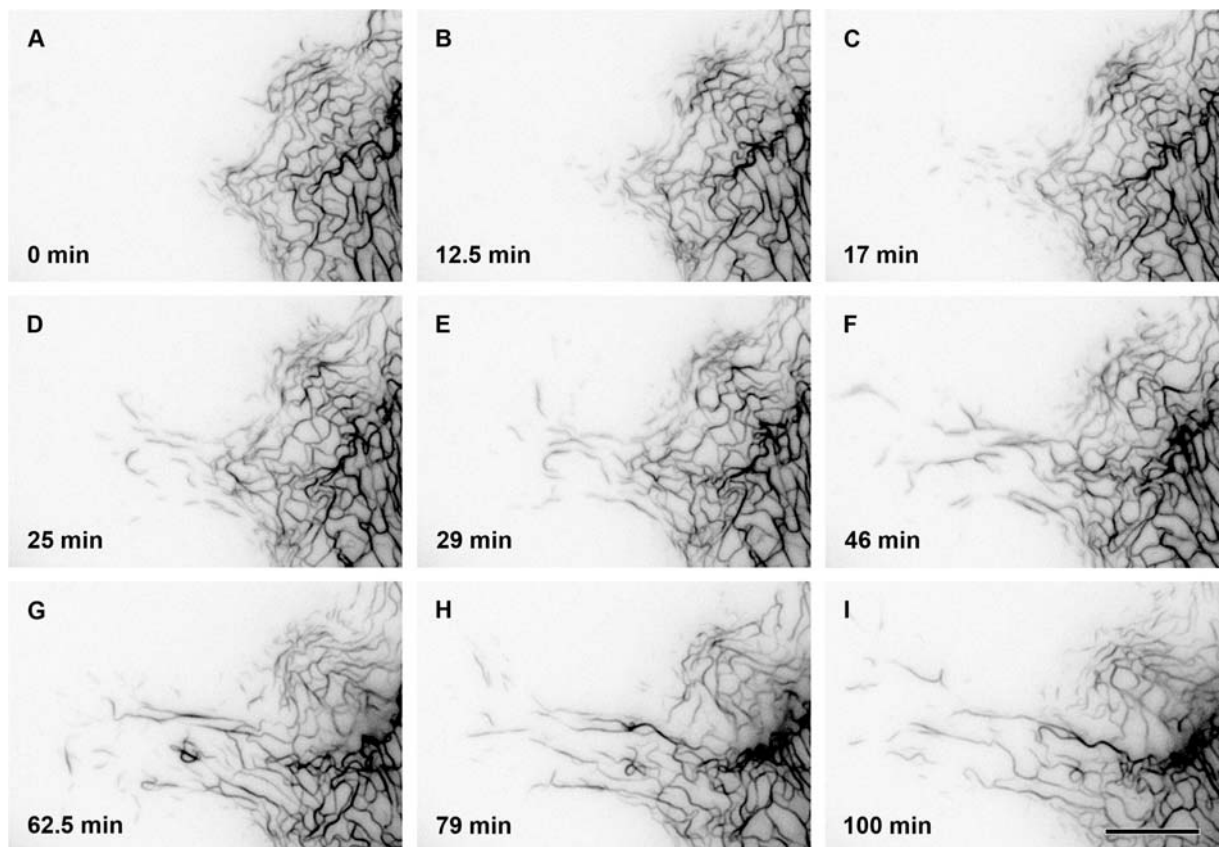


**Abbildung 3.5: Einwärtsbewegung, Wachstum und Fusion von KFP in der Zellperipherie von SK8/18-2 Zellen.** Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen (Aufnahmeabstand 25 s) von SK8/18-2 Zellen (invertierte Darstellung; siehe Film 7). Abgebildet ist ein Ausschnitt aus der Zellperipherie in direkter Nachbarschaft zur Plasmamembran (siehe Linie zum Zeitpunkt 25 s). Die KFP entstehen in unmittelbarer Nähe zur Plasmamembran, elongieren und bewegen sich in Richtung des Zellzentrums (siehe Pfeil und Pfeilköpfe). Dabei sind die KFP parallel zur Zellmembran orientiert. Im Bereich des peripheren Keratinnetzwerkes fusionieren die KFP mit dem Keratinnetzwerk und werden integriert. Größenbalken: 10 µm.

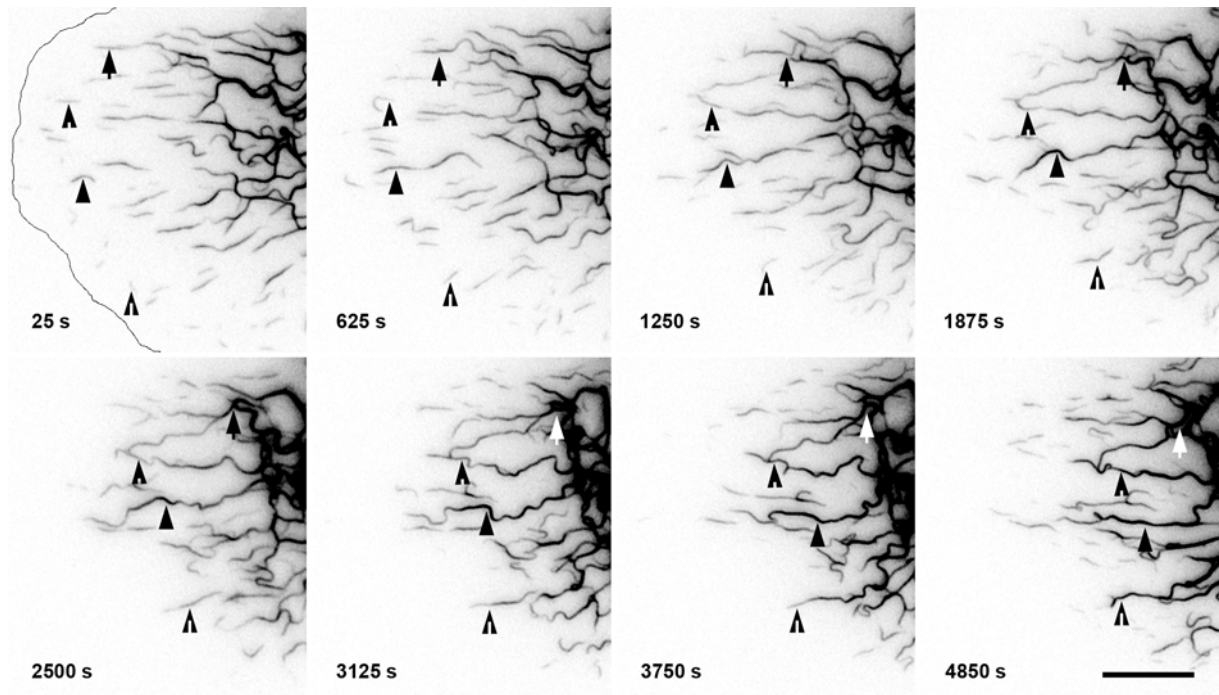
### 3.1.6 Unterschiedliche Formen der Keratinbewegung in SW-13 Zellen

Zwei unterschiedliche Formen der Keratinpartikelbewegung konnten in unterschiedlichen Bereichen der Zellperipherie beobachtet werden.

So zeigten Untersuchungen von Lamellipodien, dass diese zunächst keratinfreie, zytoplasmatische Ausstülpungen sind. Innerhalb weniger Minuten nach ihrer Ausbildung können jedoch Keratinpartikel im submembranösen Bereich detektiert werden (Abb. 3.6 B und C; Film 8). Wie in anderen Bereichen der Zellperipherie bewegen sich die Keratinpartikel in Lamellipodien kontinuierlich in Richtung des Zellzentrums und werden in das bestehende Keratinnetzwerk integriert (Film 8 und 9). Die in 3.1.4 und 3.1.5 beschriebene Elongation und Fusion, die während der Einwärtsbewegung der KFP stattfindet, kann auch in Lamellipodien beobachtet werden (Film 9). Die Geschwindigkeit der Partikel-Einwärtsbewegung in Lamellipodien ( $229,0 \pm 15$  nm/min; n=14) unterscheidet sich nicht signifikant von der Geschwindigkeit in anderen Bereichen der Zellperipherie ( $232,4 \pm 25$  nm/min; n=10). Ein Unterschied besteht jedoch in der Orientierung der Keratinpartikel zur Zellmembran.



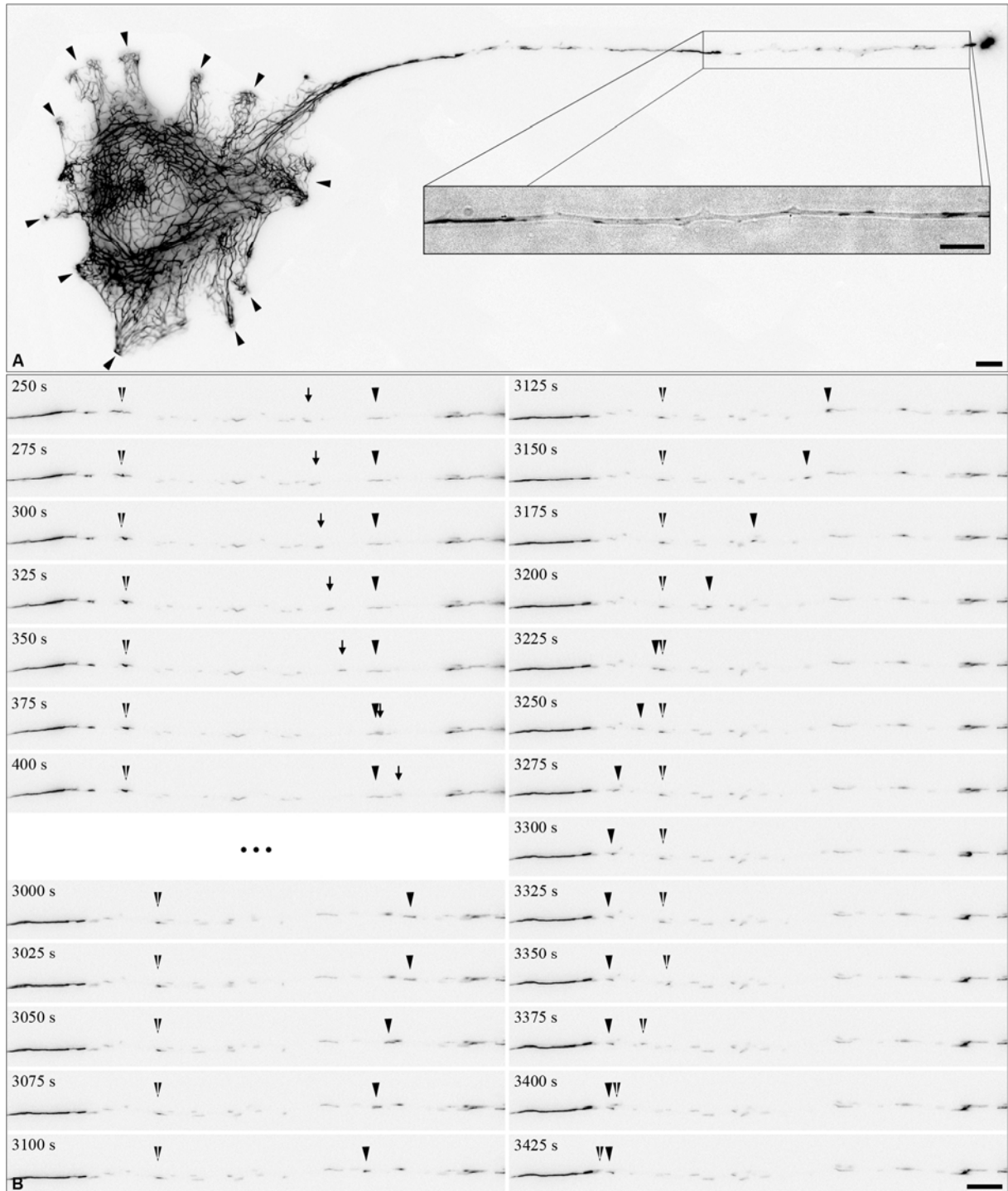
**Abbildung 3.6: Keratinfilamentbildung in einem entstehenden Lamellipodium.** (A-I) Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen (invertierte Darstellung, Aufnahmeabstand 25 s) der Zellperipherie einer SK8/18-2 Zelle. Ausgewählte Zeitpunkte aus dem Film 8. Bemerkenswert ist die schnelle Entstehung der ersten KFP in der Peripherie des neu gebildeten Lamellipodiums. Bereits nach wenigen Minuten wird das Keratinnetzwerk in das Lamellipodium hinein erweitert. In den äußeren Bereichen des Lamellipodiums entstehen KFP, die sich in Richtung des Zellzentrums bewegen, dabei wachsen und schließlich mit dem Keratinnetzwerk fusionieren. Größenbalken: 10 µm.



**Abbildung 3.7: Dynamik und Orientierung der KFP in Lamellipodien.** Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen eines Lamellipodiums in der Zellperipherie von SK8/18-2 Zellen (invertierte Darstellung, Aufnahmeabstand 25s). Für die Gesamtsequenz siehe Film 9. Die KFP entstehen in der Zellperipherie unterhalb der Plasmamembran (Linie zum Zeitpunkt 25s). Sie bewegen sich in Richtung des Zellzentrums und elongieren. Dort fusionieren die KFP mit den Filamenten des peripheren Netzwerks und werden dadurch integriert (Pfeilköpfe). Beachte, dass im Bereich des Lamellipodiums, im Gegensatz zu anderen Bereichen der Zellperipherie, die KFP perpendicular zur Zellmembran orientiert sind (vergleiche Kapitel 3.1.5). Größenbalken: 10  $\mu\text{m}$ .

In Lamellipodien sind die Partikel nicht parallel (Abb. 3.5), sondern häufig senkrecht zur Plasmamembran ausgerichtet (Abb. 3.7; Film 9).

Bei den Untersuchungen an SK8/18-2 Zellen stachen vereinzelt Zellen hervor, die extrem lange, axonartige Zellfortsätze ausbildeten. Die Übersichtsaufnahme einer solchen Zelle ist in Abb. 3.8 A zu sehen. Der riesige Fortsatz dieser Zelle erstreckt sich über eine Länge von 0,3 mm und besitzt einen durchschnittlichen Durchmesser von  $\sim 1,5 \mu\text{m}$ . Über seine gesamte Länge sind multiple, „Mikrospike“-artige Ausstülpungen der Zellmembran verteilt, die temporär gebildet und wieder abgebaut werden (Abb. 3.8 A Inlay). Am distalen Ende des Fortsatzes befindet sich eine wachstumskegelartige Struktur. Im Fortsatz selbst konnten zahlreiche Keratinpartikel detektiert und durch Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen untersucht werden. Ein Großteil der Keratinpartikel verharrte für längere Zeit stationär im Fortsatz. Diese langen Wartezeiten, die bis zu einer Stunde andauern konnten, wurden nur durch kleine oszillierende Bewegungen unterbrochen (Abb. 3.8 B; Film 10). Im Anschluss an diese Warteintervalle folgten sehr schnelle Bewegungen der Keratinpartikel. Diese Bewegungen waren zum größten Teil retrograd gerichtet, also in Richtung des Zellzentrums. Es wurden aber auch zahlreiche Keratinpartikel beobachtet, die in die entgegengesetzte Richtung (anterograd) transportiert wurden (Abb. 3.8 B, Film 10). Unabhängig von der Richtung der



**Abbildung 3.8: Transport von KFP in Zellausläufern der SK8/18-2 Zellen.** Fluoreszenz-Zeitrafferaufnahmen (invertierte Darstellung, Aufnahmeabstand 25s) von einer lebenden SK8/18-2 Zelle. **(A)** In der Zellperipherie befinden sich zahlreiche Lamellipodien (Pfeilköpfe). Ein langer, axonartiger Ausläufer erstreckt sich aus dem Zellkörper und endet in einer wachstumskegelartigen Struktur. Ein Ausschnitt dieses Ausläufers, ist als Überlagerung der Fluoreszenzaufnahme mit dem entsprechenden Interferenzkontrast-Bild eingefügt und zeigt, dass der Ausläufer zahlreiche Mikrospike-artige Ausstülpungen aufweist. **(B)** Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen (siehe Film 10) dieses Bereichs zeigen, dass die im Ausläufer vorhandenen KFP für lange Zeit geringe Motilität aufweisen, gefolgt von kurzen Perioden mit schnellem Transport. Der Transport dieser KFP erfolgt sowohl in Richtung des Zellzentrums (siehe Pfeilköpfe), als auch in die entgegengesetzte Richtung (siehe Pfeile). Größenbalken: 10 µm.

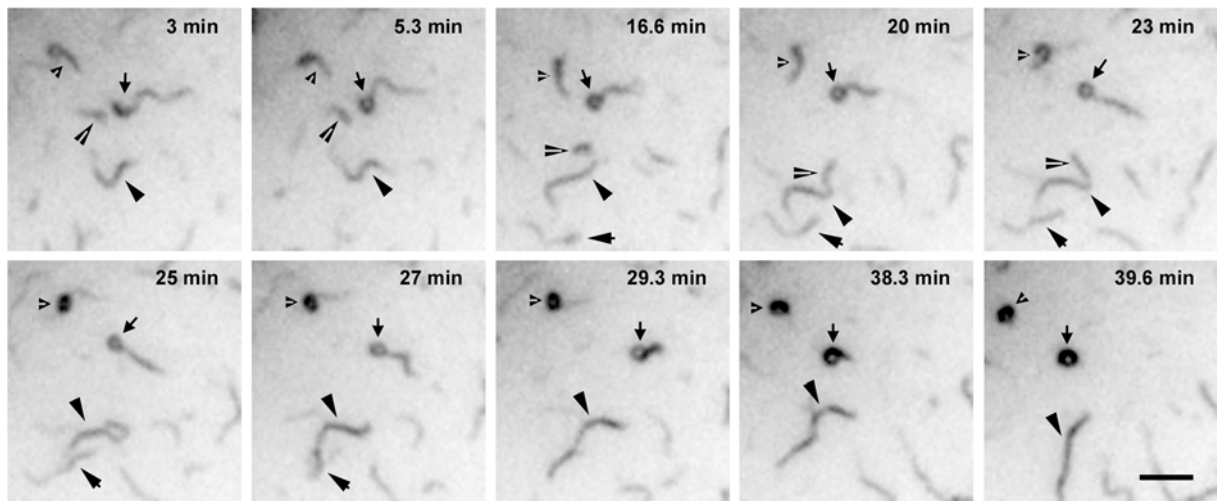


Bewegung war die Geschwindigkeit fast um zwei Größenordnungen höher als die Geschwindigkeit, die bei Keratinpartikeln in der Zellperipherie und in Lamellipodien gemessen wurde. Die Geschwindigkeit der anterograden Bewegung der Keratinpartikel wurde mit  $19,36 \pm 1,6 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $n = 4$ ), die der retrograden Bewegung mit  $16,914 \pm 0,8 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $n = 2$ ) gemessen.

#### **3.1.7 Unvollständige Keratinfilament-Netzwerkbildung in SW13 Zellen, die K5/14 und K6a/16 exprimieren**

Neben Keratin 8 und 18 existieren zahlreiche weitere Keratinpaare, die obligate Heteropolymere bilden und je nach Zelltyp und Differenzierungsgrad der Zellen in epithelialen Geweben exprimiert werden. Um zu überprüfen, ob auch die Expression anderer Keratinpaare zur Bildung von Keratinfilamenten in SW-13 Zellen führt, wurden diese mit HK5-CFP/HK14-YFP bzw. HK6a-YFP/HK16 transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurde die Verteilung der transfizierten, fluoreszenzmarkierten Keratine mit Hilfe von Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen untersucht. (Abb. 3.9; Film 11). Im Gegensatz zu den SW13 Zellen, die mit HK8-CFP/HK18-YFP transfiziert wurden, führte die Transfektion von HK5-CFP/HK14-YFP bzw. HK6a-YFP/HK16 nicht zum Entstehen eines intakten Keratinnetzwerks. Vielmehr bildeten sich in den transfizierten Zellen kurze Filamente bzw. Filamentstücke, die gleichmäßig über das Zytoplasma der Zelle verteilt vorlagen. Wie die Vorläufer der HK8/18 Filamente konnten auch diese Filamentstücke zuerst in der Zellperipherie detektiert werden. Von dort bewegen sie sich langsam in Richtung des Zellzentrums. Ähnlich wie die KFP in HK8/18 transfizierten Zellen sind sie fusionskompetent und daher in der Lage längere Filamente zu bilden (siehe Abb. 3.9, große Pfeilköpfe). Diese sind hauptsächlich im zentralen Bereich der Zellen lokalisiert, aber offensichtlich nicht in der Lage, ein weit verzweigtes Netzwerk aufzubauen (siehe Film 11).

Zusätzlich wurden über die ganze Zelle verteilte ringförmige Keratin-Strukturen detektiert. Mit Hilfe von Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen konnte ermittelt werden, dass es sich bei diesen Keratinringen um Filamentstücke handelt, deren fusionskompetente Enden miteinander oder mit einer anderen Region des gleichen Filaments fusionierten (Film 12). Im letzteren Fall bildet sich zunächst eine  $\delta$ -förmige Struktur. Das „überstehende“ Filamentstück wird dann in den Ring integriert, so dass über ein  $\sigma$ -Stadium schließlich ein gleichmäßiger Ring entsteht (Abb. 3.9, kleine Pfeilköpfe und Pfeile; Film 12).



**Abbildung 3.9: Ringbildung und Fusion von Keratinfilamentstücken in SW-13 Zellen.** Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen von SW-13 Zellen, die mit fluoreszenzmarkiertem Keratin 5 und 14 transfiziert wurden (Aufnahmeabstand 20 s). Für die komplette Sequenz siehe Film 12. Die Filamentstücke sind in der Lage, miteinander zu längeren Filamentstücken zu fusionieren (siehe große Pfeilköpfe). Des Weiteren sind sie in der Lage, ringförmige Strukturen durch Fusion zu erzeugen (siehe kleine Pfeilköpfe und Pfeile). Größenbalken: 5 µm.

## 3.2 Einfluss der Aktinfilamente und Mikrotubuli auf die Motilität der KFP

Die Untersuchungen an SK8/18-2 Zellen ließen zwei unterschiedliche Bewegungsformen der Keratinpartikel erkennen: Eine schnelle, bidirektionale, diskontinuierliche Form der Partikelbewegung und eine langsame, unidirektionale, kontinuierliche Bewegungsform (siehe Kapitel 3.1.6). Da intrazelluläre Bewegungen entweder von Aktinfilamenten oder von Mikrotubuli vermittelt werden, sollte die Keratinpartikelbewegung in Abwesenheit von Aktinfilamenten bzw. Mikrotubuli untersucht werden. Außerdem sollte geklärt werden, wie dies die Keratinfilamentbildung beeinflusst.

### 3.2.1 KFP-Bewegung entlang von Aktinfilamenten in Lamellipodien

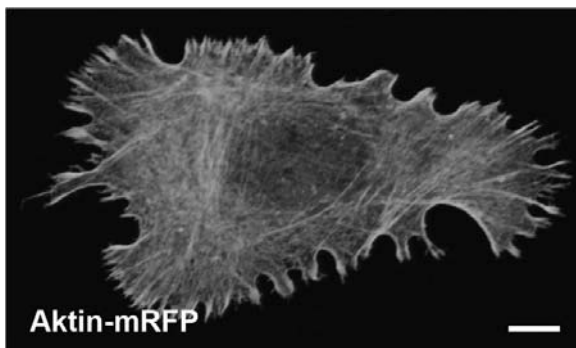
Zur Markierung der Aktinfilamente wurden Zellen mit einem für mRFP- $\beta$ -Aktin-kodierenden Plasmid-Konstrukt transfiziert (Abb. 3.10). Die für EGFP kodierende Sequenz des pEGFP-Aktin Vektors (Clontech) wurde durch eine Sequenz, die für monomeres rot fluoreszierendes Protein (mRFP) kodiert, ersetzt. Dazu wurde zunächst durch eine PCR mit Hilfe der *Primer* #0388 und #0389 (siehe Kapitel 2.1.8, Tabelle 2.11) mRFP aus dem Vektor mRFP-pRSETB (Campbell *et al.*, 2002) amplifiziert. Gleichzeitig wurde über den Primer #0388 eine NheI Schnittstelle und über den Primer #0389 eine BglII Schnittstelle an die mRFP Sequenz angefügt. Durch eine Restriktion wurde dann mit den gleichen Schnittstellen die für EGFP kodierende Sequenz aus dem pEGFP-Aktin-Plasmid (Clontech) entfernt. Anschließend wurde



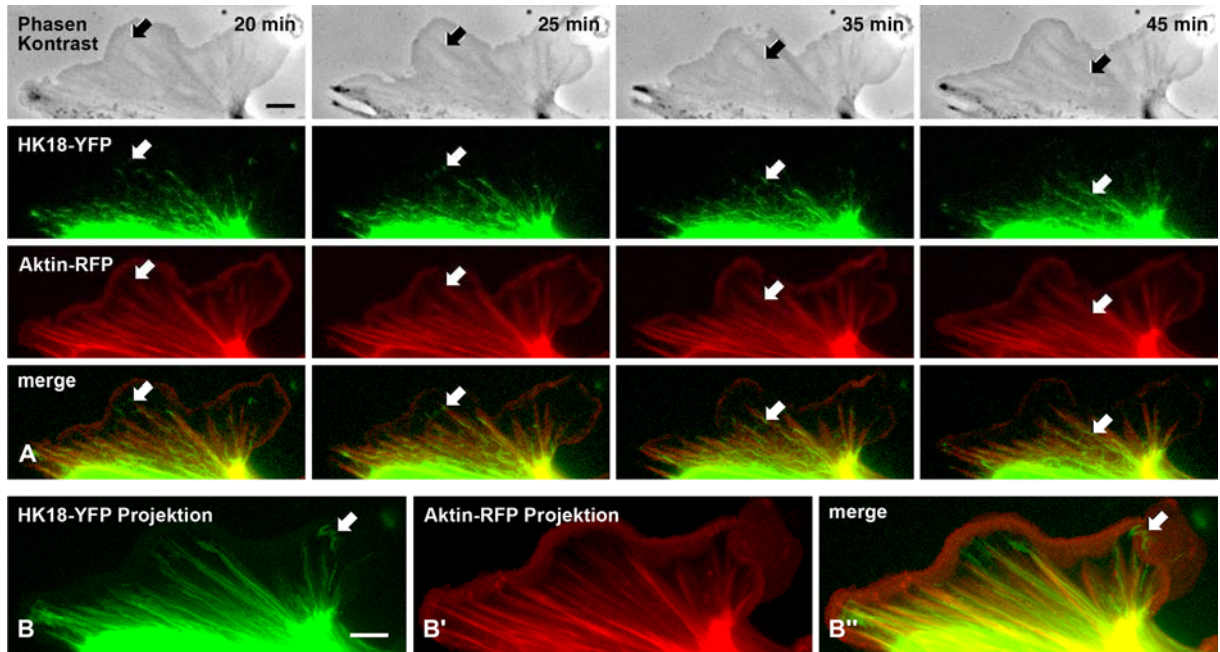
das PCR-Produkt mit beiden Restriktionsendonukleasen verdaut und durch Ligation in den Aktin Vektor eingefügt.

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Aktinfilamente der Zelle auf die Einwärtsbewegung der KFP haben, wurden EpH4 Zellen mit dem klonierten Aktin-mRFP Konstrukt transfiziert. Zusätzlich erfolgte eine Transfektion der Zellen mit HK18-YFP, um eine Detektion der KFP zu ermöglichen. Nach 24 Stunden wurden Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen und Phasenkontrastaufnahmen der transfizierten Zellen angefertigt. Dabei wurden in erster Linie die Lamellipodien der Zellen untersucht. Diese peripheren Zellbereiche sind reich an Aktin und Aktin-Stressfasern und erlauben es, aufgrund des Fehlens eines Keratinnetzwerks, die KFP über längere Strecken zu detektieren als dies in der übrigen Zellperipherie möglich wäre. Um möglichst zahlreiche Lamellipodien für diesen Versuch untersuchen zu können, wurden EpH4 Zellen verwendet, da sie zahlreiche und große Lamellipodien ausbilden (Oliferenko *et al.*, 2000).

Anhand von Doppelfluoreszenz-Zeitrafferaufnahmen konnte eine Kollokalisierung von KFP und Aktinstressfasern nachgewiesen werden. Die detektierten KFP bewegen sich langsam und kontinuierlich entlang der Aktinstressfasern in Richtung des Zellzentrums (Abb. 3.11, A; Film 13). Durch die Überlagerung der einzelnen Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen konnte eine Projektion der KFP-Bewegungspfade und der Aktinstressfasern erstellt werden (Abb. 3.11 B–B’). Anhand dieser Projektion lässt sich erkennen, dass die von den KFP zurückgelegten Strecken parallel zu den Aktinstressfasern laufen und sich teilweise mit diesen überkreuzen (Abb. 3.11 B). In seltenen Fällen wurden KFP detektiert, die nicht mit den Aktinstressfasern assoziiert sind. Diese KFP wiesen ein verändertes Bewegungsmuster auf. Sie bewegten sich diskontinuierlich, bidirektional und im Gegensatz zu den übrigen KFP deutlich schneller (Film 13 im rechten, oberen Bildausschnitt).



**Abbildung 3.10.: Expression von Aktin-mRFP in SW13-Zellen.** Detektion von Aktin-mRFP mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops. SW13-Zellen wurden transient mit Aktin-mRFP transfiziert und mit Methanol/Aceton fixiert. Die Aktinmarkierung wird besonders durch die stark ausgeprägten Stressfasern deutlich. Größenbalken: 5 µm.

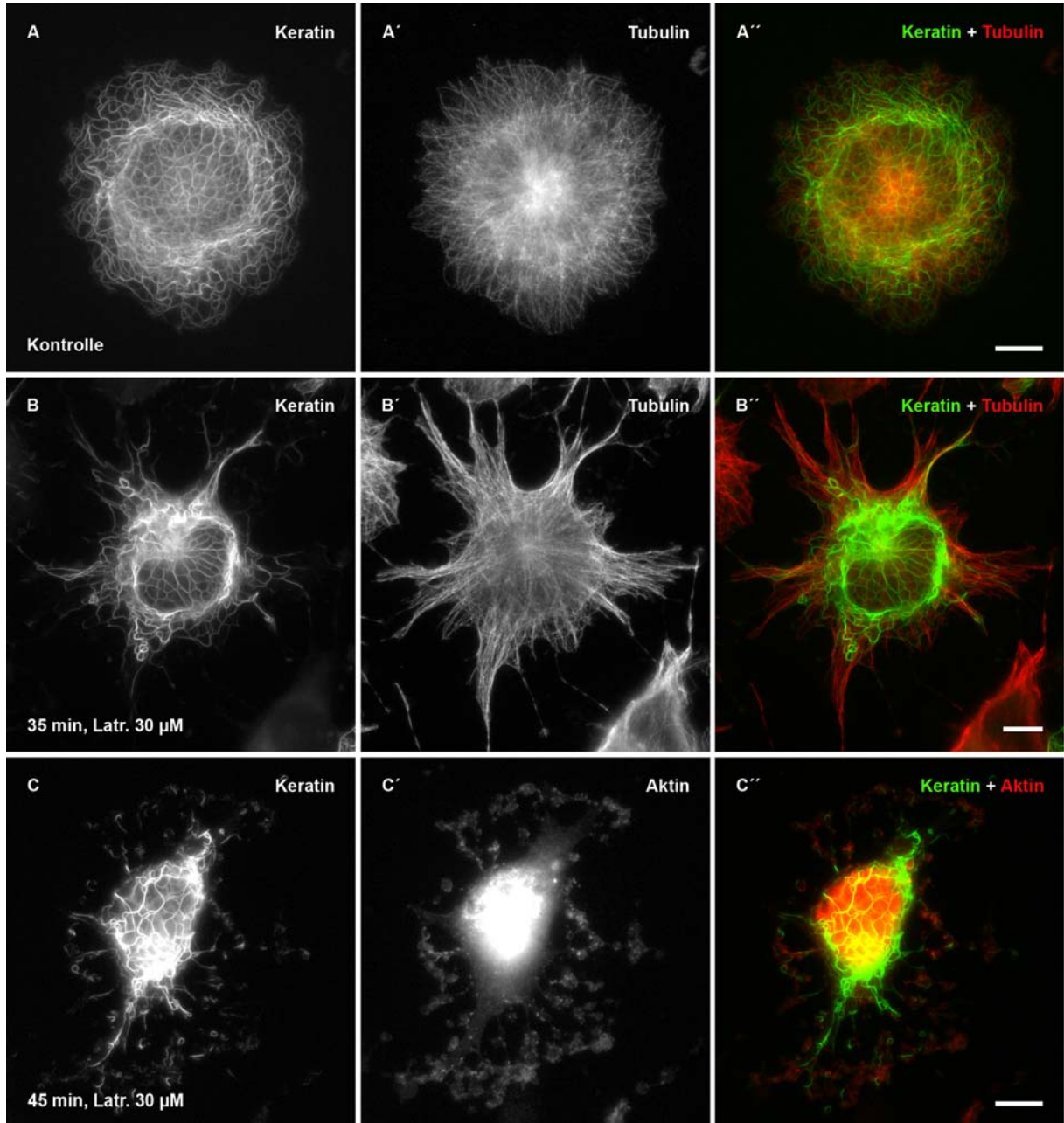


**Abbildung 3.11.: KFP-Transport entlang von Aktinstressfasern.** (A) Phasenkontrast-Aufnahmen (erste Zeile) und Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen (Aufnahmeabstand 15 s) von HK18-YFP (grün; zweite Zeile) und Aktin-mRFP (rot; dritte Zeile). Für die komplette Sequenz siehe Film 13 (Aufnahmeabstand 15 s). Die KFP werden, ausgehend vom submembranösen Bereich der Zellperipherie, in Richtung des Zellzentrums transportiert. Dabei bewegen sie sich entlang der Aktinstressfasern (siehe Pfeile). Zur besseren Visualisierung wurden die Bilder überlagert (siehe Zeile 3). (B) Projektion von 200 Einzelbildern die jeweils der HK18-YFP (B) bzw. der Aktin-mRFP (B') Sequenz des Films 13 entnommen wurden. (B'') Überlagerung (merge) der Abbildungen (B) und (B'). Einer der seltenen, sich schnell und diskontinuierlich bewegenden KFP wurde mit einem Pfeil markiert (siehe B und B''). Größenbalken: 5  $\mu\text{m}$ .

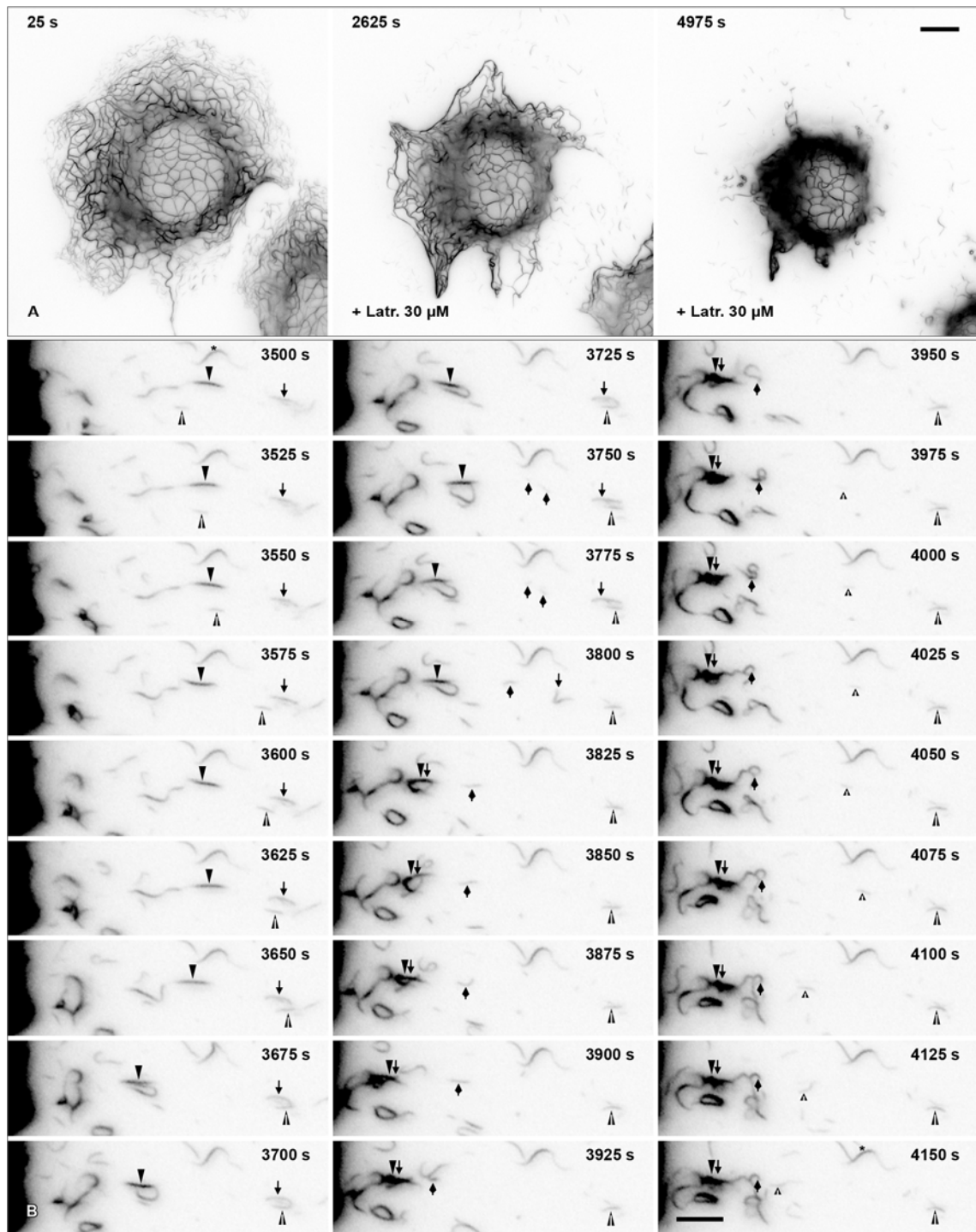
### 3.2.2 Inhibierung der langsamen, kontinuierlichen und einwärts

#### gerichteten Motilität der KFP durch den Abbau der Aktinfilamente

Um zu ermitteln, ob die Zerstörung der Aktinfilamente die Bewegung der KFP und die Organisation des Keratinnetzwerks beeinflusst, wurden SK8/18-2 Zellen mit Latrunculin B inkubiert. Latrunculin B ist ein Toxin, das aus dem roten Seeschwamm *Latruncula magnifica* gewonnen wird. Es verhindert die Aktinpolymerisation und zerstört dadurch Aktinfilamente (Spector *et al.*, 1983). Die Zellen wurden für 35–45 min mit 30  $\mu\text{M}$  Latrunculin B inkubiert und anschließend fixiert. Aktinfilamente und Mikrotubuli wurden fluoreszenzmarkiert. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass die Aktinfilamente vollständig zerstört waren (Abb. 3.12 C'-C''), während das Mikrotubulussystem nicht beeinträchtigt wurde (Abb. 3.12 B'). Es wurde lediglich aufgrund der Kontraktion der Zellen etwas komprimiert. Die Keratinfilamente konzentrierten sich in dichten Bündeln um den Nukleus (Abb. 3.12 B und C). Nach längerer Inkubation mit Latrunculin B (45 min) konnten im Bereich des peripheren Zytoplasmas zahlreiche Keratinpartikel detektiert werden, welche zum Teil ringförmig vorlagen (Abb. 3.12 C-C''). Ob es sich dabei um neu entstandene Keratinpartikel handelt und



**Abbildung 3.12: Auswirkung von Latrunculin auf die Lokalisierung von Keratin, Tubulin und Aktin in SK8/18-2 Zellen.** Doppelfluoreszenzmarkierung von Methanol/Aceton-fixierten Zellen unter Standardbedingungen (Kontrolle) und nach Inkubation mit 30  $\mu\text{M}$  Latrunculin B (latr.; 35 min und 45 min). (A, B, C) Detektion der stabil-transfizierten HK18-YFP Chimäre (Keratin). (A', B') Detektion von Tubulin mit Hilfe von monoklonalen  $\alpha$ -Tubulin-Antikörpern in Kombination mit Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern (Tubulin). (C') Detektion von Aktin mit Hilfe von Texas-Red-gekoppelten Phalloidin (Aktin). Die entsprechenden Fluoreszenzaufnahmen wurden zur besseren Visualisierung eingefärbt (Keratin = grün; Aktin bzw. Tubulin = rot) und überlagert (A'', B'', C''). Die Inkubation der Zellen mit Latrunculin B führt zum Abbau von Aktinfilamenten (C') und zum Zusammenziehen der Zellen. Die Mikrotubuli sind weiterhin vorhanden (B'). Größenbalken: 10  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 3.13: Latrunculin B führt zu einer Konzentrierung des Keratinnetzwerks um den Nukleus und zu einer veränderten Bewegung der KFP.** Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen von SK8/18-2 Zellen, die mit 30 µM Latrunculin B inkubiert wurden (Zugabe zum Zeitpunkt 1050 s). **(A)** Übersichtsaufnahmen der gesamten Zelle, vor Zugabe und nach Zugabe von Latrunculin B. Für die Gesamtsequenz siehe Film 14 (Aufnahmeabstand 25 s). Das Keratinnetzwerk zieht sich nach Zugabe von Latrunculin B um den Nukleus zusammen. In der Zellperipherie entstehen weiterhin KFP, die sich in Richtung des Zellzentrums bewegen. **(B)** Detailausschnitte der Zellperipherie der rechten, unteren Zelle in (A), (nach Konzentration des Keratinnetzwerks). Eine kontinuierliche Bewegung der KFP ausgehend von der Zellperipherie in Richtung des Zellzentrums ist nicht länger detektierbar. Stattdessen verbleiben die KFP für längere Zeit stationär in der Zellperipherie (Pfeile) und bewegen sich dann schnell in kurzen Intervallen in Richtung des verbliebenen Keratinnetzwerks (Pfeile). Dort werden sie durch Fusion mit Keratinfilamenten integriert. Einzelne KFP werden auch in die entgegengesetzte Richtung transportiert (geteilter Pfeilkopf). Für die Gesamtsequenz siehe Film 15. Größenbalken: 10 µm in **(A)**; 5 µm in **(B)**.

inwiefern die Zerstörung des Aktinnetzwerkes die Motilität dieser Partikel beeinflusst, wurde mit Hilfe von Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen untersucht (Abb. 3.13, Film 14 und 15).

Die Keratinpartikel bewegten sich ähnlich wie die in Kapitel 3.1.6 beschriebenen Partikel. Langen stationären Perioden folgten kurze Transportintervalle. Der Großteil der Partikel bewegte sich in Richtung des Zellzentrums, einige jedoch auch in die entgegengesetzte Richtung (geteilter Pfeilkopf, Abb. 3.13 B). Dabei erfolgte der Transport entlang von Routen, auf denen häufig mehrere Partikel hintereinander transportiert werden. Die Geschwindigkeit der Partikel während der Transportphase betrug  $15,77 \pm 2,7 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $n = 12$ ). Sie waren flexibel, bildeten teilweise ringförmige Strukturen aus (Abb. 3.13 B, kleiner kurzer Pfeil ab 3975 s) und waren weiterhin in der Lage zu fusionieren und sich in das kompaktierte Netzwerk zu integrieren. Die langsamen, kontinuierlichen Bewegungen der Keratinpartikel, wie sie in unbehandelten Zellen beobachtet werden können, konnten nicht mehr festgestellt werden.

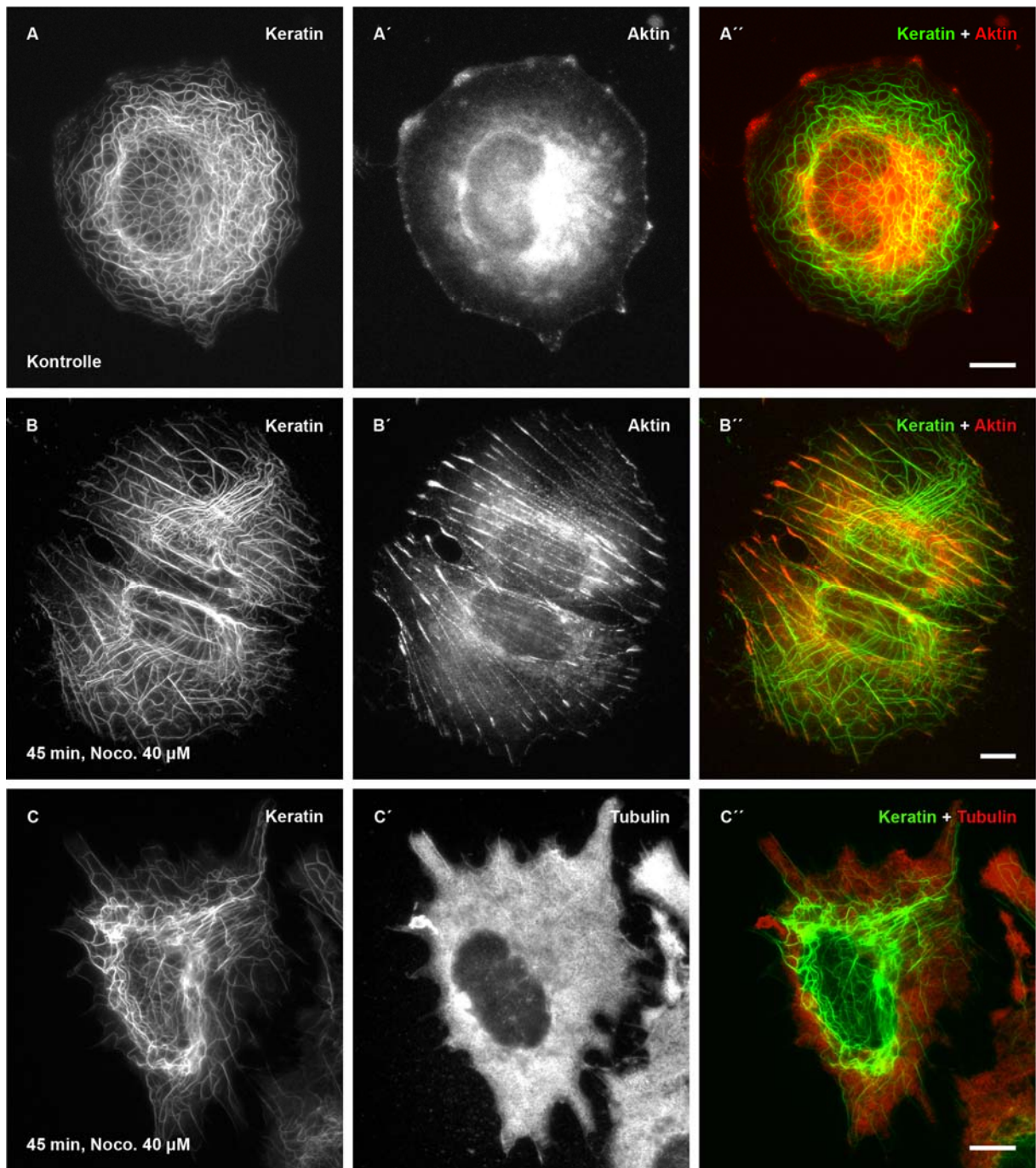
#### **3.2.3 Inhibierung der schnellen, diskontinuierlichen und bidirektionalen Motilität der KFP durch den Abbau der Mikrotubuli**

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Mikrotubuli auf das Keratinnetzwerk haben, wurden SK8/18-2 Zellen mit Nocodazol (40-100 $\mu\text{M}$ ) behandelt und anschließend fixiert. Nocodazol zerstört vorhandene Mikrotubuli und verhindert ihre Neubildung, indem es die Polymerisation von  $\beta$ -Tubulin unterbindet (Lin und Hamel, 1981; Luduena und Roach, 1991). Die Wirkung von Nocodazol wurde anhand der fixierten SK8/18-2 Zellen mit Hilfe eines monoklonalen anti-Tubulin-Antikörpers überprüft. Das gesamte Mikrotubulussystem ist nach 45 min Inkubation mit 40  $\mu\text{M}$  Nocodazol zerstört (Abb. 3.14 C-C').

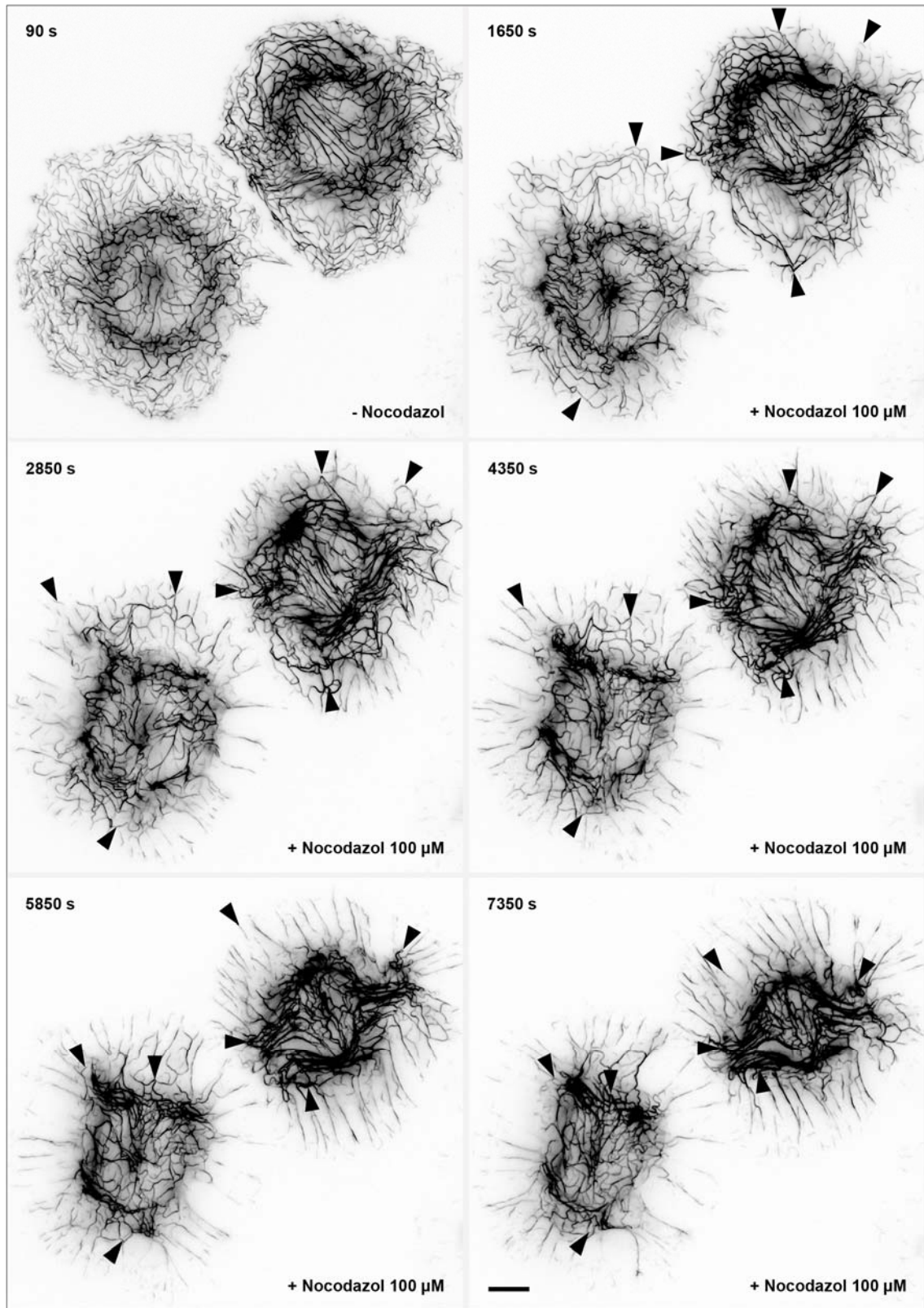
Außerdem zeigten sich deutliche Veränderungen im Keratinfilamentnetzwerk. Das Zerstören der Mikrotubuli führt zu einem Rearrangement der Keratinfilamente. Der Großteil der Keratinfilamente konzentriert sich um den Nukleus. Einige Keratinfilamente sind jedoch weiterhin in die Zellperipherie ausgestreckt (Abb. 3.14 B, C). Wie eine Markierung der Aktinfilamente mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin zeigte, sind diese Keratinfilamente an Aktinstressfasern angelagert (siehe auch Osborn *et al.*, 1980) und kolokalisieren mit diesen (Abb. 3.14 B''). Die Stressfasern entstanden ebenfalls durch die Inkubation der Zellen mit Nocodazol (vergleiche Abb. 3.14 A' und B').

Mit Hilfe von Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen wurde die Dynamik der Keratinfilamente (HK18-YFP) in Nocodazol-behandelten (100 $\mu\text{M}$ ) SK8/18-2 Zellen untersucht. Der Kollaps und Rückzug der Keratinfilamente in Richtung des Nukleus konnte so dokumentiert werden





**Abbildung 3.14: Dokumentation der Auswirkung von Nocodazol (Noco) auf die Lokalisierung von Aktin und Tubulin durch Doppelfluoreszenzmarkierung in Methanol/Aceton-fixierten SK8/18-2 Zellen.** Zum Vergleich sind unbehandelte Kontrollzellen (Kontrolle) dargestellt. (A, B, C) Detektion der stabil transfizierten HK18-YFP Chimären. (A', B') Detektion von Aktin mit Hilfe von Texas-Red-gekoppeltem Phalloidin. (C') Detektion von Tubulin mit Hilfe von monoklonalen  $\alpha$ -Tubulin-Antikörpern in Kombination mit Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern. Zur Veranschaulichung der räumlichen Verteilung der detektierten Proteine in der Zelle wurden die Fluoreszenzaufnahmen übereinander gelagert und farbig dargestellt (A'', B'', C''); Keratin = grün, Aktin bzw. Tubulin = rot). Die Inkubation der Zellen mit Nocodazol (B, C) führt zum Abbau der Mikrotubuli (C') und zur Bildung von Aktinstressfasern (B'). An diese Stressfasern lagern sich Keratinfilamente an (B''). Größenbalken: 10  $\mu$ m.



**Abbildung 3.15: Nocodazol induzierter Kollaps der Keratinfilamente bei erhaltener Motilität der KFP.** Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen (invertierte Darstellung) der Verteilung von HK18-YFP in SK8/18-2 Zellen vor (- Nocodazol) und nach Inkubation mit 100 µM Nocodazol (+ Nocodazol; ab dem Zeitpunkt 300 s). Für die Gesamtsequenz siehe Film 16 (Aufnahmeabstand 30 s). Die Inkubation der Zellen mit Nocodazol führt zu einer Konzentration der Keratinfilamente um den Nucleus, beeinträchtigt aber nicht die Entstehung der KFP in der Zellperipherie und ihre Bewegung in Richtung des Zellzentrums (siehe Pfeile). Größenbalken: 10 µm.

(Abb. 3.15; Film 16). Bemerkenswert ist hierbei, dass die Keratinfilamentneubildung in der Peripherie der Zellen nicht gestört ist (Abb. 3.15 Pfeilköpfe). Insbesondere im Bereich der verbliebenen, ausgestreckten Keratinfilamente werden weiterhin Keratinpartikel in der Zellperipherie gebildet und kontinuierlich in Richtung des Zellzentrums transportiert (Abb. 3.15; Film 16). Die Geschwindigkeit ( $239,2 \pm 21,4$  nm/min,  $n = 12$ ), mit der die Keratinpartikel einwandern, gleicht hierbei der Geschwindigkeit von Keratinpartikeln unbehandelter Zellen (siehe 3.1.6;  $232,4 \pm 25$  nm/min,  $n = 10$ ). Im Gegensatz zu diesen konnten jedoch nicht mehr die ebenfalls in Kapitel 3.1.6 beschriebenen schnellen und diskontinuierlichen Bewegungen festgestellt werden. Die Inkubation der Zellen mit Nocodazol beeinflusste nicht die Fähigkeit der Keratinpartikel zu fusionieren und sich in das bestehende Netzwerk zu integrieren (Film 16).

### **3.2.4 Vollständiger Stopp der Keratinpartikelbewegungen nach Abbau von Aktinfilamenten und Mikrotubuli**

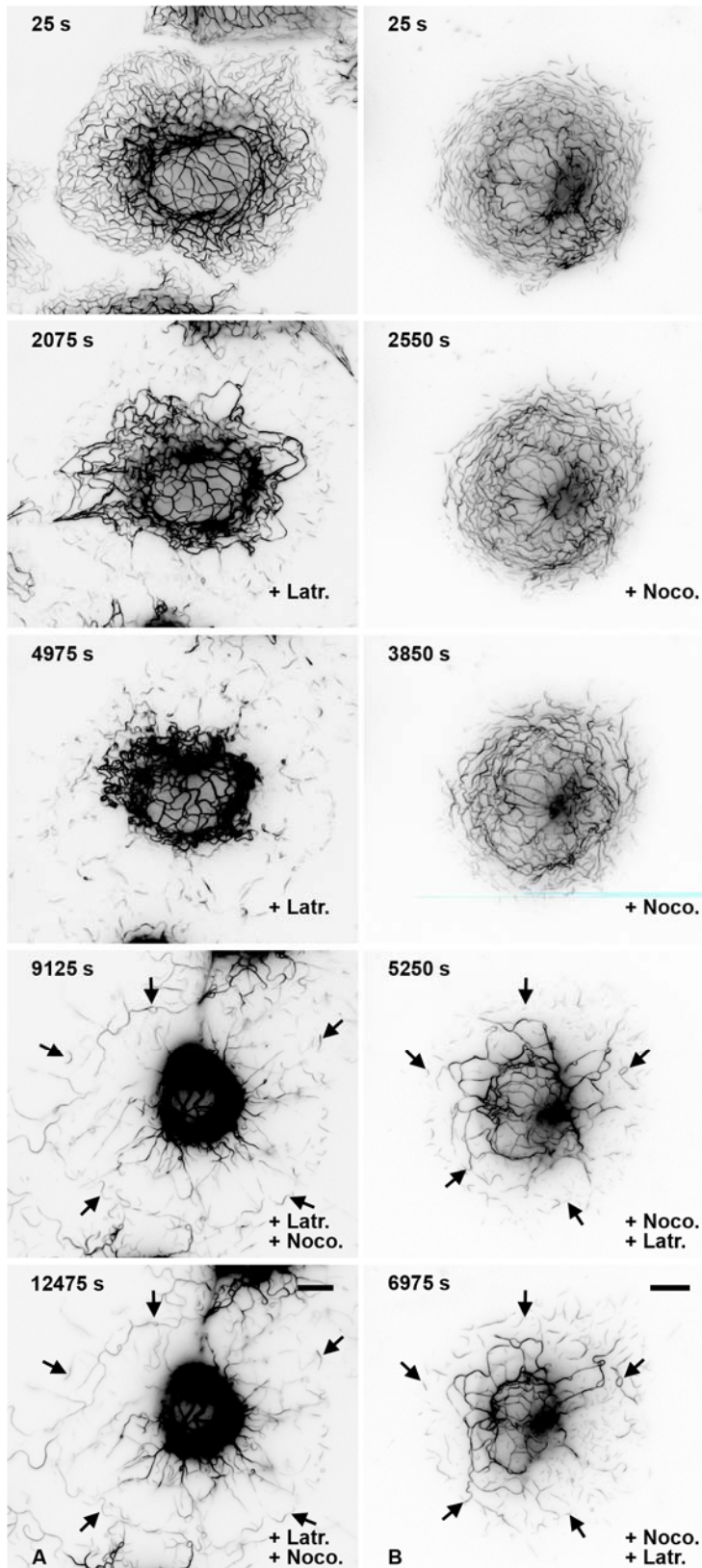
Sowohl durch die Zerstörung der Mikrotubuli als auch durch die Zerstörung der Aktinfilamente wurde das Keratinnetzwerk beeinflusst. In beiden Fällen kam es allerdings nicht zu einem kompletten Stopp der Keratinbewegung und auch die Keratinneubildung in der Zellperipherie wurde nicht beeinflusst. Um nun zu ermitteln, ob Mikrotubuli und Aktinfilamente alleine für den Transport der Keratinpartikel verantwortlich sind oder ob möglicherweise noch andere Faktoren eine Rolle spielen, wurden Zellen sowohl mit Latrunculin B als auch mit Nocodazol behandelt. Dies geschah durch gleichzeitige (Abb. 3.17) bzw. hintereinander folgende Applikation der Drogen (Abb. 3.16; Filme 17 und 18). Durch die kombinierte Applikation der beiden Drogen kollabierte das Keratinnetzwerk und kontrahierte sich um den Nukleus (Abb. 3.17 A). Lediglich einige Filamente waren weiterhin bis in die Peripherie ausgebreitet. Diese Filamente standen mit Bereichen in Kontakt, in denen Tubulin-Immunfluoreszenzmarkierung detektiert werden konnten (Abb. 3.17 C).

Die Motilität der Keratinpartikel bei Applikation beider Drogen wurde wiederum mit Hilfe von Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen untersucht. Wurde zunächst Latrunculin B zugegeben, kam es zu einer Kompaktion des Keratinnetzwerks um den Nukleus. Keratinpartikel wurden weiterhin in der Peripherie gebildet und in kurzen, schnellen Transportintervallen zum Zellzentrum transportiert (Abb. 3.16 A; Film 17). Nach Zugabe von Nocodazol stoppten sämtliche Transportbewegungen der Keratinpartikel (Abb. 3.16 A; siehe Pfeile). Zusätzlich konnte keine Neubildung von Partikeln in der Peripherie festgestellt werden. Die verbliebenen Keratinpartikel zeigten allerdings weiterhin Fusionskompetenz (Abb. 3.16 A; Film 17).

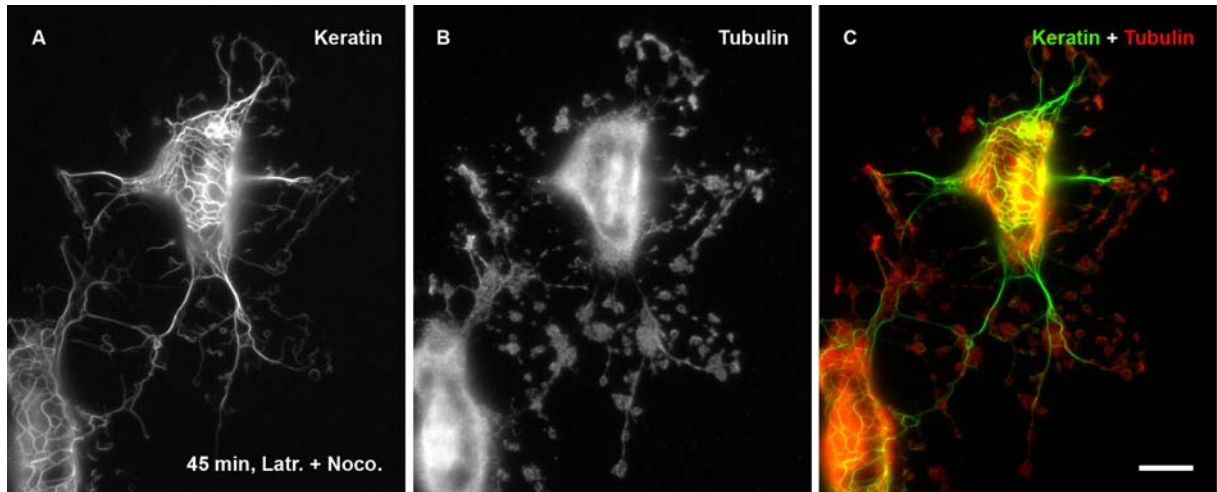
Ein ähnliches Bild zeigte sich, wenn zunächst Nocodazol zugegeben wurde (Abb. 3.16 B;



Film 18). Zunächst bildeten sich in der Peripherie weiterhin Keratinpartikel. Diese wurden langsam und kontinuierlich einwärts transportiert. Durch zusätzliche Inkubation mit Latrunculin B wurde dieser Transport gestoppt. Das Keratinnetzwerk kompaktierte sich um den Nukleus und es fand keine Neubildung in der Peripherie statt (Abb. 3.16 B, siehe Pfeile; Film 18).



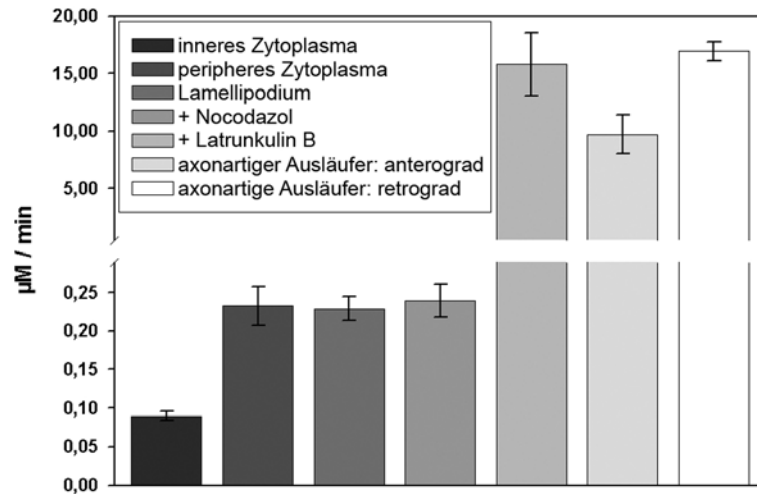
**Abbildung 3.16: Inkubation von SK8/18-2 Zellen mit Nocodazol und Latrunculin B führt zum vollständigen Stopp der KFP-Bewegung.** Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen von HK18-YFP in SK8/18-2 Zellen. (A) Die Zellen wurden zuerst mit 30  $\mu\text{M}$  Latrunculin B behandelt (Latr.; ab 1125 s), dann wurden die Zellen mit 30  $\mu\text{M}$  Latrunculin und zusätzlich mit 40  $\mu\text{M}$  Nocodazol (Noco.; ab 5000 s) inkubiert. Für die Gesamtsequenz siehe Film 17. (B) Die Zellen wurden zuerst mit 40  $\mu\text{M}$  Nocodazol behandelt (Noco.; ab 2475 s), dann mit 40  $\mu\text{M}$  Nocodazol und 30  $\mu\text{M}$  Latrunculin (Latr.; ab 3975 s). Für die Gesamtsequenz siehe Film 18. Die Inkubation der Zellen mit Latrunculin B und Nocodazol führt zu einer Konzentration des Keratinnetzwerks um den Nukleus und verhindert den Transport der KFPs aus der Zellperipherie (Pfeile). Größenbalken: 10  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 3.17: Inkubation von SK8/18-2 Zellen mit Nocodazol und Latrunculin B führt zur Kontraktion der Zellen und des Keratinnetzwerks.** (A, B, C) Doppelfluoreszenzmarkierung von Methanol/Aceton fixierten SK8/18-2 Zellen, die für 45 min mit 30  $\mu\text{M}$  Latrunculin B (Latr.) und 40  $\mu\text{M}$  Nocodazol (Noco) inkubiert wurden. (A) Detektion der stabil transfizierten HK18-YFP Chimäre. (B) Detektion von Tubulin mit monoklonalen  $\alpha$ -Tubulin-Antikörpern in Kombination mit Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern (Tubulin). (C) Überlagerung von (A) und (B) zur besseren Visualisierung der räumlichen Verteilung der detektierten Proteine (Keratin = grün, Tubulin = rot). Nach der Kontraktion des Keratinnetzwerks stehen die verbliebenen bis in die Peripherie ausgebreiteten Filamente mit Bereichen in Kontakt, in denen Tubulin detektiert werden kann. Größenbalken: 10  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.5 Messung der Geschwindigkeit der Keratinpartikel: Zwei Arten des Transports

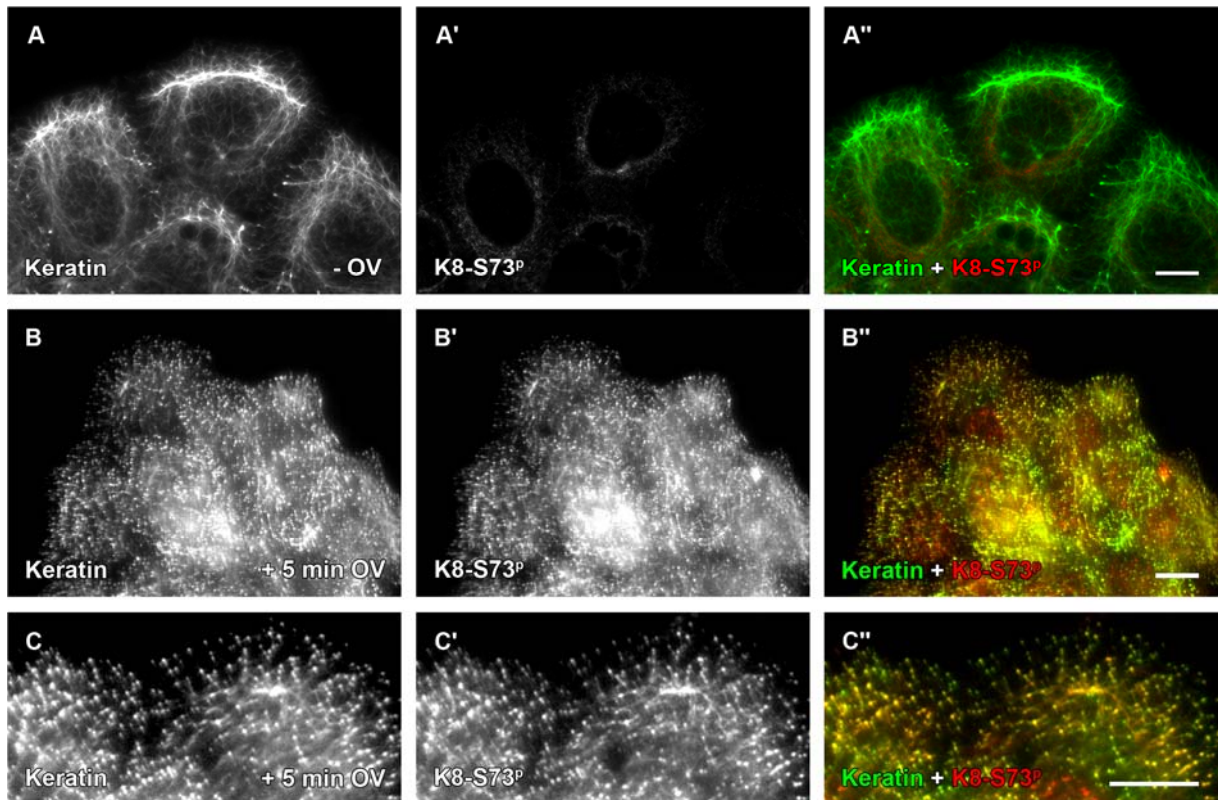
Die Geschwindigkeit der Keratinpartikel wurde mit Hilfe von Fluoreszenz-Zeitrafferaufnahmen in verschiedenen Zellbereichen und zusätzlich in Gegenwart von Nocodazol und/oder Latrunculin B gemessen. Die Messwerte sind in dem Histogramm in Abb. 3.18 zusammengefasst und lassen zwei unterschiedliche Arten der Keratinpartikelbewegung in der Zellperipherie erkennen. Im submembranösen Bereich, in Lamellipodien und in Zellen, die mit Nocodazol behandelt wurden, konnte ein langsamer, kontinuierlicher Transport mit einer Durchschnittsgeschwindigkeit von 231 nm/min festgestellt werden (siehe Kapitel 3.1.6 und 3.2.3). Im Gegensatz dazu wurde in den axonartigen Fortsätzen der Zellen und in Zellen, die mit Latrunculin B behandelt wurden, ein schneller, sprunghafter Transport festgestellt (siehe Kapitel 3.1.6 und 3.2.2). Die Durchschnittsgeschwindigkeit dieser Bewegung liegt bei 9,7  $\mu\text{m}/\text{min}$  für den anterograden und 16,9  $\mu\text{m}/\text{min}$  für den retrograden Transport. Durch Zugabe von Nocodazol konnte der langsame Transport (239 nm/min) nicht gestoppt werden, der schnelle sprunghafte hingegen schon. Umgekehrt konnte durch Latrunculin B Zugabe der schnelle Transport (15,7  $\mu\text{m}/\text{min}$ ) nicht gestoppt werden, der langsame Transport allerdings schon. Der langsame Transport ist demnach abhängig von intakten Aktinfilamenten, der schnelle Transport von intakten MT.



**Abbildung 3.18: Histogramm der durchschnittlichen Partikelgeschwindigkeit (mit SEM) der Keratinfilamentvorläufer.** Messungen der Geschwindigkeit von KFP-Bewegungen im zentralen Zytoplasma (n = 10), im peripheren Zytoplasma (n = 10), in Lamellipodien (n = 14) und in axonartigen-Zellausläufern (in Richtung des perinukleären Zytoplasmas (retrograd; n = 2) und in die entgegen gesetzte Richtung (anterograd; n = 4)), in unbehandelten Zelle und in Zellen, die mit Nocodazol oder Latrunculin B inkubiert wurden. Die unterschiedlichen Transportgeschwindigkeiten zeigen zwei Arten des Transportes von KFP. Ein langsamer Aktin-abhängiger Transport, der dem Transport der KFP in der Zellperipherie entspricht, und ein schneller MT-abhängiger Transport, der dem Transport der KFP in axonartigen Ausläufern entspricht.

### 3.3 Dynamik des Auf- und Abbaus des Keratinnetzwerks

Wie bereits in Kapitel 3.1.2 erwähnt, verändert sich während der Mitose das gesamte Keratinnetzwerk drastisch. Die Keratinfilamente werden abgebaut, es bilden sich Keratingranula und ein Großteil des Keratins geht in den löslichen, nicht filamentösen Keratinpool der Zellen über. Im Anschluss an die Mitose werden neue Keratinfilamente in der Zellperipherie gebildet und das Keratinnetzwerk wiederhergestellt (Windoffer und Leube, 2001). Auch die durch OV-Inkubation erzeugte Auflösung der Keratinfilamente ist reversibel und kann durch Auswaschen des OV rückgängig gemacht werden (Strnad *et al.*, 2002). Es bilden sich dann wieder neue Keratinfilamente. Das Keratinnetzwerk der Zellen ist also kein statisches Gebilde und kann äußerst schnell und flexibel an die Bedürfnisse der Zellen angepasst werden. Doch wodurch wird der schnelle Auf- und Abbau der Keratinfilamente gesteuert? Welche Regelmechanismen erlauben es der Zelle, das Keratinnetzwerk bei Bedarf auf- und abzubauen? Da die Regulation komplexer Vorgänge in der Zelle häufig durch Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen gesteuert wird und Keratine Phosphoproteine sind, soll in diesem Abschnitt der Arbeit untersucht werden, welche Bedeutung diese Vorgänge für den Auf- und Abbau des Keratinnetzwerks haben und welche Moleküle daran beteiligt sind.

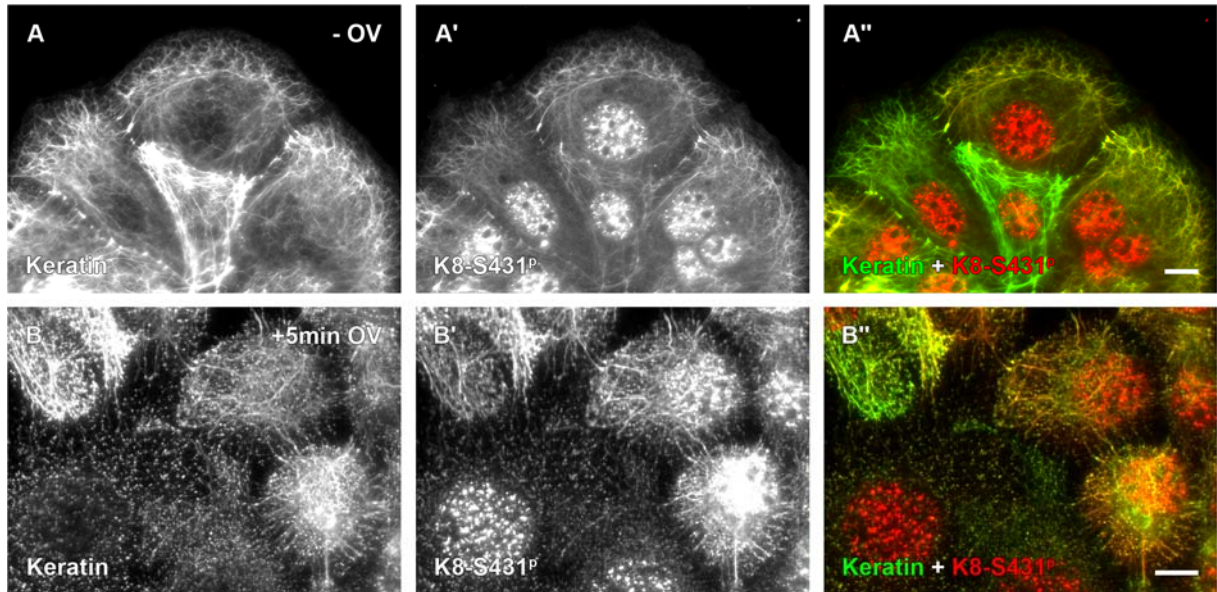


**Abbildung 3.19: OV führt zu einer schnellen Phosphorylierung von Keratin 8 an S73.** Immunfluoreszenzaufnahmen von Methanol/Aceton-fixierten, unbehandelten AK13-1 Zellen (A) und von Zellen, die für 5 Minuten mit 20 mM OV inkubiert wurden (B; Vergrößerung in C). Detektion von stabil exprimiertem HK13-EGFP (A-C). Detektion des K8-S73<sup>p</sup>-Epitop mit Hilfe von Phosphoepitop-spezifischen Antikörpern, in Kombination mit Cy3-gekoppelten Sekundäntikörpern (A'-C'). Zur Verdeutlichung wurden die entsprechenden Fluoreszenzaufnahmen eingefärbt (Keratin = grün; K8-S73<sup>p</sup> = rot) und überlagert (A''-C''). Durch die OV-Inkubation kommt es zur Bildung von Granula und zur Phosphorylierung von K8-S73 (B, C). Größenbalken: 10  $\mu$ m.

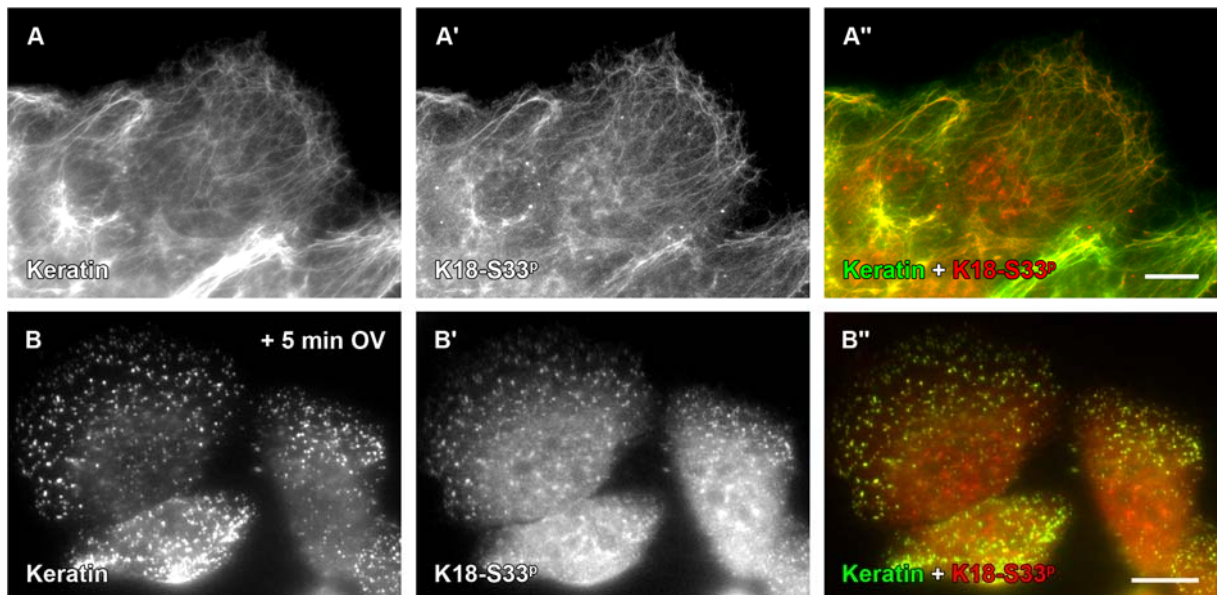
### 3.3.1 Abbau der Keratinfilamente und Bildung von Keratingranula aufgrund erhöhter OV-induzierter Phosphorylierung

In AK13-1 Zellen entstehen im Laufe der Mitose Keratingranula. Ähnliche Keratingranula können durch OV-Inkubation der AK13-1 Zellen induziert werden (siehe Abb. 3.2 A). Da OV ein Phosphataseinhibitor ist (Gordon, J. A., 1991), kommt es in den behandelten Zellen zu Hyperphosphorylierungen. Die Bildung von Keratingranula könnte daher auf einer verstärkten Phosphorylierung der Keratine selbst beruhen oder durch die erhöhte Phosphorylierung weiterer Proteine eingeleitet werden. Mehrere spezifische Phosphorylierungsstellen sind für die Keratine bekannt. So weiß man, dass Keratin 18 unter anderem an der Aminosäure S33 phosphoryliert wird (Ku *et al.*, 1998; Fausther *et al.*, 2004). Für Keratin 8 wurden Phosphorylierungen an den Aminosäuren S73 (Toivola *et al.*, 2002) und S431 beschrieben (Ku und Omary, 1997).





**Abbildung 3.20: Die Phosphorylierung von K8-S431 wird nicht durch OV beeinflusst.** Immunfluoreszenzaufnahmen von Methanol/Aceton-fixierten, unbehandelten AK13-1 Zellen (**A**), und Aufnahmen von AK13-1 Zellen, die für 5 Minuten mit 20 mM OV inkubiert wurden (**B**). Detektion von stabil exprimiertem HK13-EGFP (**A**, **B**). Detektion des K8-S431<sup>P</sup> Epitop mit Hilfe von phosphoepitop-spezifischen Antikörpern in Kombination mit Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern (**A'**, **B'**). Die Inkubation mit OV führt zur Bildung von Keratingranula, hat aber keinen sichtbaren Einfluss auf die Phosphorylierung von K8-S431. Größenbalken: 10 µm.

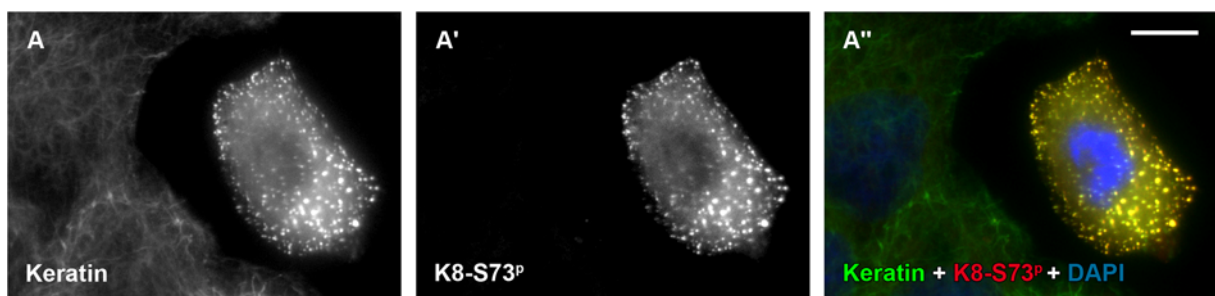


**Abbildung 3.21: Die Phosphorylierung von K18-S33 wird nicht durch OV beeinflusst.** Immunfluoreszenzaufnahmen von Methanol/Aceton-fixierten, unbehandelten AK13-1 Zellen (**A**), und Aufnahmen von AK13-1 Zellen, die für 5 min mit 20 mM OV inkubiert wurden (**B**). Detektion von stabil exprimiertem HK13-EGFP (**A**, **B**). Detektion des K18-S33<sup>P</sup>-Epitop mit Hilfe von Phosphoepitop-spezifischen Antikörpern in Kombination mit Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern (**A'**, **B'**). Die Inkubation mit OV führt zur Bildung von Keratingranula, hat aber keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von K18-S33. Größenbalken: 10 µm.

Um zu ermitteln, ob die OV-Inkubation zu einer erhöhten Phosphorylierung der Keratine führt, wurden AK13-1 Zellen nach Inkubation mit OV (5 min, 20 mM) mit Phosphoepitop-spezifischen Antikörpern gegen K8-S73 und K8-S431 markiert. Kontrollzellen, die nicht mit OV inkubiert wurden, zeigten ein intaktes Keratinnetzwerk, das sich über die gesamte Zelle ausbreitete (Abb. 3.19 A). Die Keratinfilamente wiesen keine detektierbare Phosphorylierung an K8-S73 auf (Abb. 3.19 A'). Zellen, die mit OV inkubiert wurden hingegen, zeigten eine kräftige Fluoreszenzmarkierung der Keratingranula (Abb. 3.19 B', C'). Im Gegensatz dazu waren sowohl die Keratinfilamente un behandelter Zellen als auch die Keratingranula an K8-S431 phosphoryliert (Abb. 3.20 A', B'). Gleiches gilt für K18-S33 (Abb. 3.21 A', B'). Die Inkubation der Zellen mit OV führte also zu einer selektiv erhöhten Phosphorylierung von K8-S73, aber nicht zu einer nachweisbar gesteigerten Phosphorylierung anderer bekannter Phosphorylierungsstellen.

### 3.3.2 Phosphorylierung von K8-S73 in der Mitose

Auch unter physiologischen Voraussetzungen kommt es zum Abbau der Keratinfilamente und zur Bildung von Granula. Unter anderem geschieht dies, wie bereits in Kapitel 3.1.2 beschrieben, in der Mitose. Um zu ermitteln, ob auch in der Mitose eine selektiv erhöhte Phosphorylierung von Keratinen auftritt, wurden AK13-1 Zellen in geringer Dichte ausgesät. Dadurch konnte erreicht werden, dass möglichst viele mitotische Zellen in der Kultur enthalten sind. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit Methanol/Aceton fixiert und mit Phosphoepitop-spezifischen Antikörpern markiert. Während in Interphasezellen wiederum keine detektierbare Phosphorylierung von K8-S73 nachgewiesen werden konnte (siehe auch Liao et al., 1997), wurde in mitotischen Zellen eine starke Phosphorylierung dieser Phosphorylierungsstelle beobachtet (Abb. 3.22 A').



**Abbildung 3.22: Phosphorylierung von K8-S73 in Interphase und Mitose.** Immun-Fluoreszenzaufnahmen von Methanol/Aceton fixierten AK13-1 Zellen. Detektion von HK13-EGFP (A), K8-S73<sup>P</sup> (A') und Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen (A''); Keratin = grün, K8-S73<sup>P</sup> = rot). Im Gegensatz zu Interphase-Zellen ist K8-S73 in mitotischen Zellen stark phosphoryliert. Größenbalken: 10 µm.

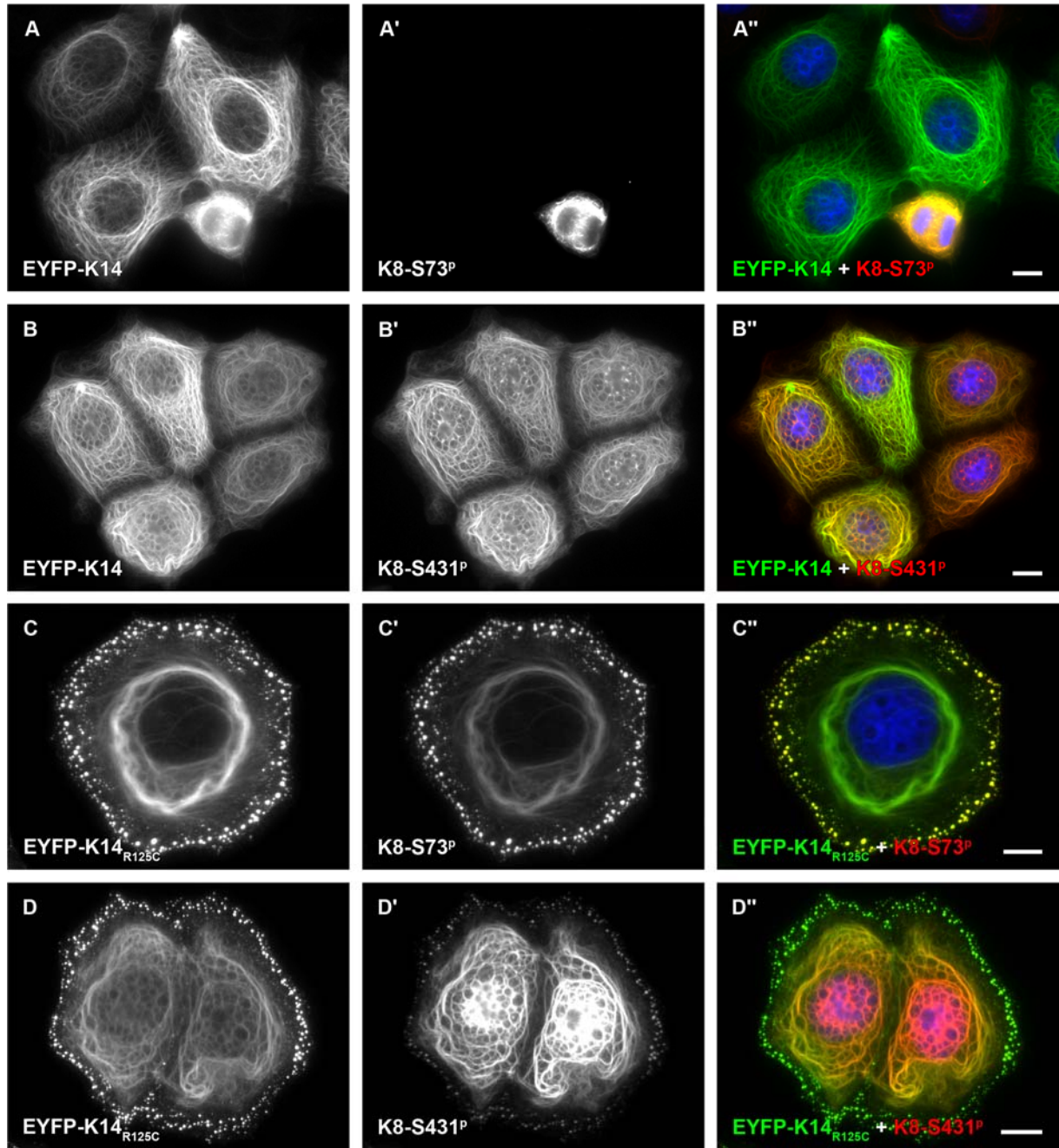
### 3.3.3 Erhöhte Phosphorylierung von K8-S73 in MT5K14-26 Zellen

Die Reorganisation bzw. der Abbau des Keratinnetzwerks spielt auch bei zahlreichen Erkrankungen eine wichtige Rolle. Ein Beispiel für eine solche Erkrankung ist *Epidermolysis bullosa simplex* (EBS) (Coulombe und Fuchs, 1993; Fuchs, 1996; Lane und McLean, 2004; Rugg und Leigh, 2004). Diese Hautkrankheit wird durch eine dominant-negative Keratinmutation verursacht. Im Großteil der Fälle handelt es sich dabei um eine Mutation in der Coil 1 A Region der Keratin 14 Rod Domäne im Codon 125. Die häufigste Mutationsform an dieser Stelle ist ein Austausch von Arginin (R) zu Cystein (C). Diese Mutation hat einen dominant-negativen Einfluss auf das Keratinnetzwerk der Zellen, so dass bereits geringe Belastungen der Haut zur Bildung von Blasen führen. MCF-7 Zellen, die mit dem mutierten Keratin transfiziert wurden, sind nicht in der Lage, ein normales Keratinfilamentnetzwerk auszubilden. Vielmehr weisen sie Granula in der Zellperipherie auf und es verbleiben lediglich im Zellzentrum einige dicht gepackte Keratinfilamente (Werner *et al.*, 2004).

Um zu untersuchen, ob auch bei dieser Reorganisation des Keratinnetzwerks Phosphorylierungen der Keratine eine Rolle spielen könnten, wurden MCF-7 Zellen, die stabil mit dem mutierten Keratin 14<sub>R125C</sub> transfiziert wurden (MT5K14-26), mit Wildtyp-Keratin 14 transfizierten MCF-7 Zellen (MT5K14-25) verglichen (Abb. 3.23). In den MT5K14-25 Zellen konnte lediglich während der Mitose und nicht in der Interphase eine Phosphorylierung an K8-S73 detektiert werden (Abb. 3.23 A'). Im Gegensatz dazu ist K8-S431 in MT5K14-25 Zellen sowohl in der Interphase als auch in der Mitose phosphoryliert (Abb. 3.23 B'). Anders verhielt es sich in MT5K14-26 Zellen. Sowohl an K8-S73 als auch an K8-S431 konnten in Interphase-Zellen und in mitotischen Zellen Phosphorylierungen detektiert werden (Abb. 3.23 C', D').

Die Bildung von Keratingranula in Zellen, die das mutierte Keratin 14<sub>R125C</sub> exprimieren, geht daher einher mit einem Anstieg der Phosphorylierung an K8-S73. Hingegen ist K8-S431 unabhängig vom Zustand des Keratinnetzwerks und der exprimierten Keratine jederzeit gleich bleibend stark phosphoryliert.



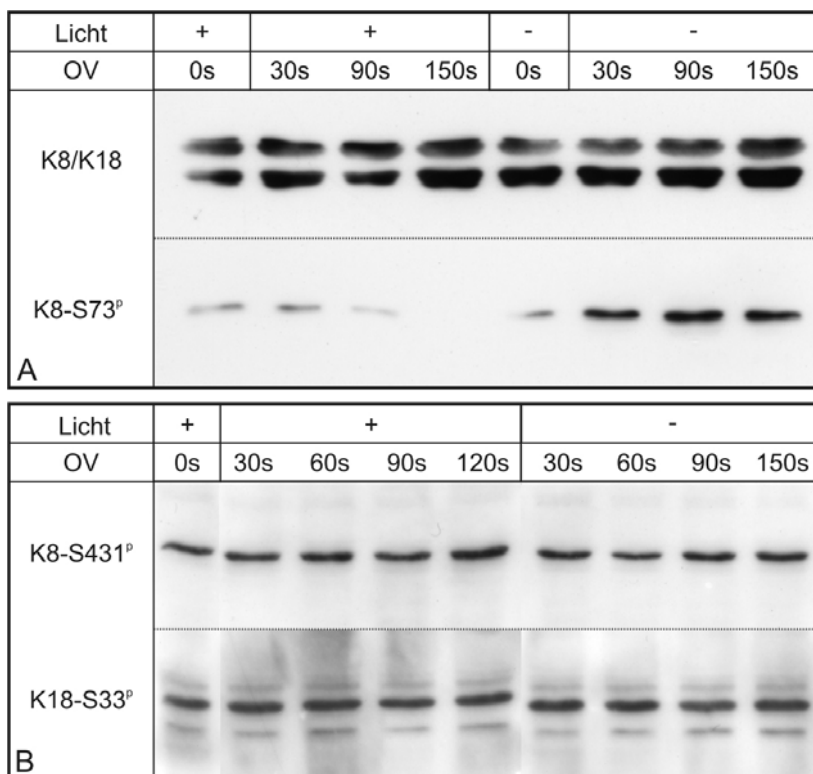


**Abbildung 3.23: Keratin 8 wird spezifisch in mitotischen Keratingranula und in Keratingranula, die mutierte EBS Keratine enthalten, an S73 phosphoryliert.** (A – D) Immunfluoreszenzaufnahmen von Methanol/Aceton-fixierten MCF7 Zellen (MT5K14-25 = EYFP-K14 und MT5K14-26 = EYFP-K14<sub>R125C</sub>). Detektion von K8-S73<sup>P</sup> und K8-S431<sup>P</sup> mit Hilfe von Phosphoepitop-spezifischen Antikörpern in Kombination mit Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern (A'-D'). In den MCF-7 Zellen, die Wildtyp-Keratin 14 exprimieren, kann nur in mitotischen Zellen K8-S73<sup>P</sup> detektiert werden. In Interphasezellen ist K8-S73 nicht phosphoryliert (A, A'). K8-S431 hingegen wird auch in Interphasezellen phosphoryliert (B'). In MT5K14-26 Zellen, die das mutierte EBS-Keratin 14 exprimieren, ist K8-S73<sup>P</sup> in den Keratingranula und in den Keratingranula detektierbar (C, C'). Zusätzlich ist in den MT5K14-26 Zellen auch K8-S431<sup>P</sup> detektierbar (D, D'). K8-S73 wird somit nur in mitotischen Zellen und in Zellen, die Keratin-Mutanten exprimieren, phosphoryliert. K8-S431 hingegen wird immer phosphoryliert, unabhängig von der Expression mutierter Keratine. Größenbalken: 10 µm.



### 3.3.4 OV-induzierte Phosphorylierung von K8-S73

Die beschriebenen Beobachtungen lassen darauf schließen, dass eine verstärkte Phosphorylierung der Keratine zu einer Reorganisation des Keratinnetzwerks und zur Granulabildung führt. Die Phosphorylierung der Keratine scheint somit wichtig für den Auf- und Abbau des Keratinnetzwerks zu sein. Dieser Abbau erfolgt sehr schnell in mitotischen Zellen und in Zellen, die mit OV inkubiert wurden. Um zu ermitteln, ob sich dieses Zeitfenster mit der Geschwindigkeit, in der die Keratine durch OV phosphoryliert werden, deckt, und um zu untersuchen, ob die Änderungen der Phosphorylierung quantitativ nachweisbar sind, wurden Zytoskelettextrakte aus AK13-1 Zellen hergestellt und analysiert. Zuvor wurden die Zellen in unterschiedlichen Lichtverhältnissen und für unterschiedliche Zeiten mit OV (20 mM) inkubiert. Die gewonnenen Zytoskelettextrakte wurden mit Hilfe einer SDS-PAGE (10%) aufgetrennt, geblottet und mit Antikörpern gegen K8/18 und Phosphoepitop-spezifischen Antikörpern gegen K18-S33, K8-S73 und K8-S431 markiert (Abb. 3.24).



**Abbildung 3.24: OV-Behandlung führt zu einem schnellen Anstieg der K8-S73-Phosphorylierung im Dunkeln.** Immunblots von Zytoskelettextrakten aus AK13-1 Zellen. Die Zellen wurden mit und ohne 20 mM OV im Dunkeln und im Hellen inkubiert und anschließend lysiert. Die gewonnenen Zytoskelettextrakte wurden mit Hilfe einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit Phosphoepitop-spezifischen Antikörpern gegen K8-S73, K8-S431, K18-S33 bzw. mit Antikörpern gegen K8/K18 markiert. **(B)** Die Menge an phosphoryliertem K8-S431 und K18-S33 bleibt unabhängig von OV und den

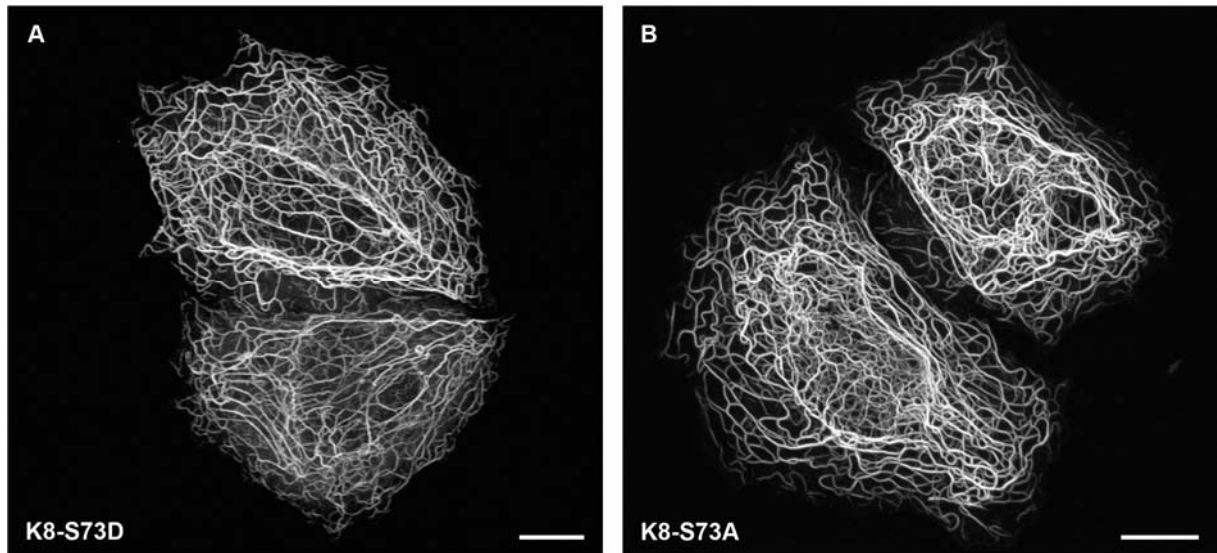
Lichtverhältnissen immer gleich hoch. **(A)** Im Gegensatz dazu ist K8-S73 im Licht und im Dunkeln nur geringfügig phosphoryliert. Die Inkubation mit OV ändert hieran nichts solange die Zellen mit Licht präinkubiert wurden. Wurden die Zellen jedoch im Dunkeln kultiviert und mit OV inkubiert, konnte bereits nach 30 s eine starke Erhöhung der Phosphorylierung an K8-S73 detektiert werden (A).

Zellen, die im Dunkeln mit OV inkubiert wurden, zeigten als Reaktion auf die OV-Inkubation bereits nach 30 Sekunden einen schnellen und sehr starken Anstieg der K8-S73 Phosphorylierung (Abb. 3.24 A). Durch Präexposition der Zellen mit Raumlicht konnte dieser Anstieg verhindert werden (Abb. 3.24 A). Es ist bekannt, dass eine solche Präexposition mit Licht stabilisierend auf die Keratinfilamente wirkt und die Granulabildung durch OV verhindert (Strnad *et al.*, 2003). Für die übrigen Keratin-Phosphoepitope konnte als Reaktion auf die OV-Behandlung keine Veränderung der Phosphorylierung festgestellt werden (Abb. 3.24 B). Allerdings bestätigte diese biochemische Analyse die Beobachtungen aus Kapitel 3.3.3, dass sowohl K8-S431, als auch K18-S33 gleichmäßig phosphoryliert sind und dies unabhängig davon, ob sie mit OV behandelt wurden oder nicht. Es ist daher wahrscheinlich, dass diese Phosphorylierungsstellen keinen Einfluss auf die induzierte Reorganisation des Keratinnetzwerks haben.

#### **3.3.5 Intakte Netzwerkbildung von K8-S73-Mutanten in SW13-Zellen**

Um zu untersuchen, inwieweit die Phosphorylierung an K8-S73 zum Erhalt oder zur Reorganisation des Keratinnetzwerks beiträgt, wurden Zellen mit K8-S73D und K18-WT-GFP Konstrukten bzw. mit K8-S73A und K18-WT-GFP transfiziert. K8-S73D wurde gezielt mutiert und enthält anstelle des Serin an der Stelle 73 ein Aspartat. Dadurch wird eine konstitutive Phosphorylierung der S73 Stelle simuliert. K8-S73A hingegen enthält statt dem Serin an Stelle 73 ein Alanin und ist daher an dieser Stelle nicht mehr phosphorylierbar. Um zu verhindern, dass endogene Keratine die Bildung der Keratinfilamente beeinflussen, wurden SW-13 Zellen für diese Versuche verwendet.

24–48 Stunden nach Transfektion der verschiedenen K8-Mutante und K18-YFP wurden die Zellen mit Methanol/Aceton fixiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Wie in Abbildung 3.25 zu sehen ist, bildeten sowohl K8-S73A-synthetisierende als auch K8-S73D-exprimierende Zellen intakte Keratinnetzwerke ohne erkennbare Störungen (Abb. 3.25). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es in den Zellen, die mit dem konstitutiv phosphorylierten K8-S73D transfiziert wurden, zu einer Erhöhung des nicht-filamentösen Keratins im löslichen Pool kommt (siehe erhöhten Hintergrund in Abb. 3.25 A). Diese Ergebnisse bekräftigen frühere Versuche mit NIH-3T3 Zellen (Ku *et al.*, 2002) und zeigen außerdem, dass die Aktivierung bzw. Inaktivierung einer einzelnen Phosphorylierungsstelle (K8-S73) offensichtlich nicht ausreicht, um eine Reorganisation des Keratinnetzwerks zu induzieren.



**Abbildung 3.25: K8-S73 Mutationen haben keinen Einfluss auf die Organisation des Zytoskelett.** (A, B) Konfokale Laser-Scanning-Fluoreszenzaufnahmen von Methanol/Aceton-fixierten SW13-Zellen, die zusätzlich zu HK18-YFP entweder mit K8-S73A oder K8-S73D transfiziert wurden. Unabhängig von den transfizierten K8-S73 Mutanten bildete sich ein intaktes Keratinnetzwerk in den transfizierten Zellen (A, B). SW13-Zellen, die mit K8-S73D transfiziert wurden, zeigen zudem noch eine leicht erhöhte diffuse Fluoreszenz (A). Dies kann ein Hinweis auf einen erhöhten Anteil an löslichem Keratin sein. Größenbalken: 10 µm.

### 3.3.6 Aktivierung von p38 und ERK durch OV-Inkubation

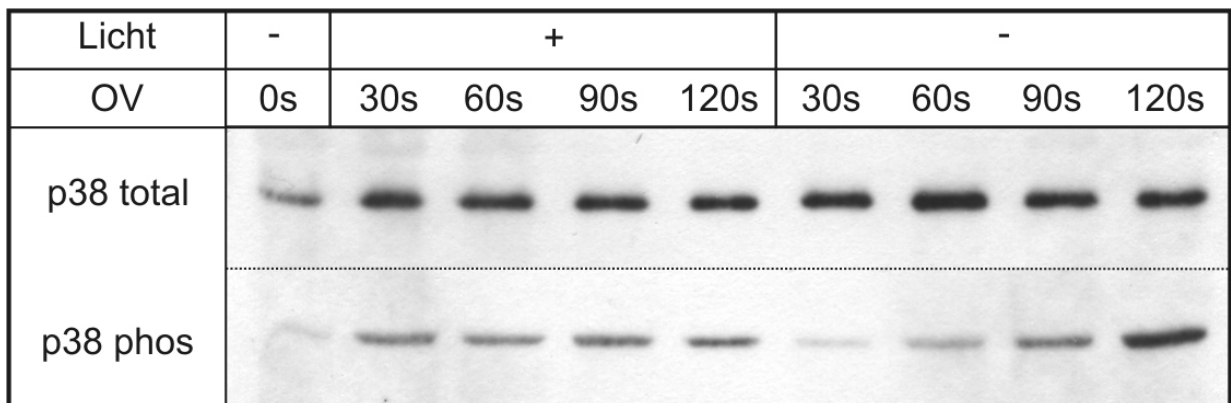
Orthovanadat ist ein unspezifischer Inhibitor von Phosphatasen. Unter anderem ist bekannt, dass durch OV ATPasen (Pezza *et al.*, 2002), alkalische Phosphatasen (Whisnant und Gilman, 2002) und vor allem Tyrosin-Phosphatasen (Gordon, J. A., 1991; Hecht und Zick, 1992) inhibiert werden. Wie bereits gezeigt, beeinflusst OV die Keratinorganisation (siehe Kapitel 3.1.2) und den Grad der Phosphorylierung der Keratine (siehe Kapitel 3.3.4). Über welche Signalwege erfolgt aber nun die Regulation der Keratinphosphorylierung? Erstklassige Kandidaten für eine solche Regulatorfunktion sind die MAPK (engl. *mitogen activated protein kinases*). Die MAPK ERK, JNK und p38 dienen als Adaptermoleküle, über die viele Signalkaskaden ablaufen (Ono und Han, 2000; Chang und Karin, 2001). Es ist bekannt, dass die p38 MAPK spezifisch K8-S73 phosphoryliert (Feng *et al.*, 1999; Ku *et al.*, 2002a; Toivola *et al.*, 2002). Sollten MAPK durch OV beeinflusst werden und dadurch zur Reorganisation des Keratinnetzwerks beitragen, müsste die Aktivierung der MAPK mit Hilfe von Phosphopitop-spezifischen Antikörpern gegen die MAPK in OV behandelten Zellen nachweisbar sein.

Aus OV-behandelten Zellen wurden daher Proteinextrakte hergestellt, die anschließend über eine SDS-PAGE (10%) aufgetrennt wurden. Nach dem Blotting wurden die entsprechenden Nitrocellulose-Membranen mit Phosphopitop-spezifischen Antikörpern gegen MAPK inkubiert (Abb. 3.26 und 3.27).

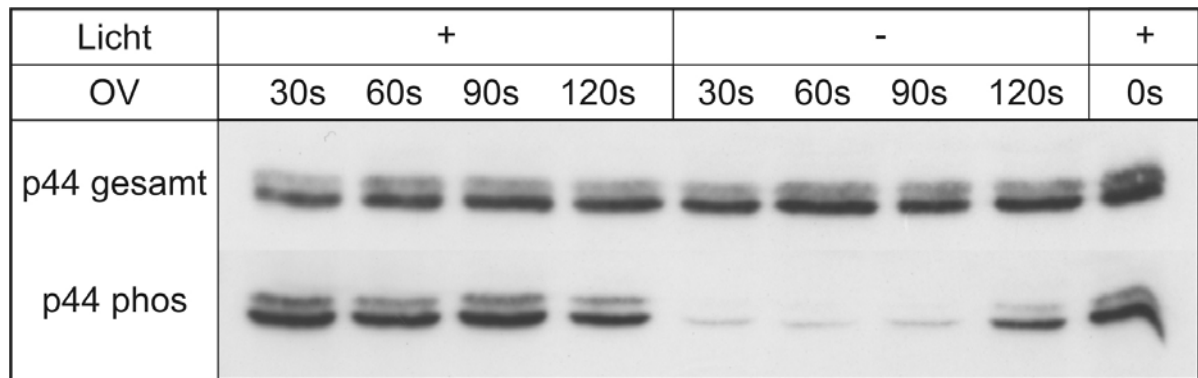
Wurden die Zellen vor dem Lysieren mit Raumlicht bestrahlt und dadurch der Abbau des

Keratinnetzwerks durch OV verhindert, war sowohl die Menge an phosphoryliertem p38 als auch die Menge an phosphoryliertem ERK, im Vergleich zu Zellen, die im Dunkeln lysiert wurden, deutlich erhöht (Abb. 3.26 und 3.27). Die Menge der phosphorylierten MAPK nahm allerdings in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit OV nicht weiter zu, sondern blieb auf einem gleichmäßigen Niveau. Wurden die Zellen jedoch im Dunkeln mit OV inkubiert, d.h. unter Vorraussetzungen, bei denen Keratingranula entstehen, konnte innerhalb von 120 Sekunden ein starker Anstieg der Phosphorylierung von p38 und ERK beobachtet werden. Dieser Anstieg führte zu einer Erhöhung der Phosphorylierung von p38, die das Niveau der im Licht lysierten Zellen übertraf (Abb. Abb. 3.26 und 3.27). Für die JNK MAPK konnte hingegen kein Anstieg der Phosphorylierung detektiert werden.

Neben einer Erhöhung der Phosphorylierung von K8-S73 führt die Inkubation mit OV (im Dunkeln) auch zu einer Erhöhung der Phosphorylierung von p38 und ERK. Im Licht hingegen bleibt die Phosphorylierung dieser MAPK in Gegenwart von OV auf einem unveränderten Niveau.



**Abbildung 3.26: Die Inkubation von AK13-1 Zellen mit OV führt zur Aktivierung von p38.** Immunblots von Gesamtzelllysaten aus AK13-1 Zellen. Die Zellen wurden vor der Lyse entweder mit OV (20 mM) oder unbehandelt im Raumlicht bzw. im Dunkeln präinkubiert. Die Gesamtzelllysate wurden über eine 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit Antikörpern gegen Gesamt-p38 (p38 total) bzw. gegen phosphoryliertes p38 (p38 phos) markiert. Mit Hilfe von HRP-gekoppelten Sekundäntikörpern und dem *Enhanced Chemilumineszenz System* (ECL) wurden die gebundenen Antikörper auf den Nitrozellulosemembranen detektiert. Die Menge an Gesamt-p38 verändert sich nicht durch Inkubation mit OV und ist unabhängig von den Lichtverhältnissen, in denen die Zellen präinkubiert wurden. Zellen, die im Dunkeln mit OV inkubiert wurden wiesen hingegen einen schnellen und starken Anstieg von p38<sup>p</sup> auf. Im Dunkeln sind die Zellen somit sensitiv für eine p38 Aktivierung durch OV.

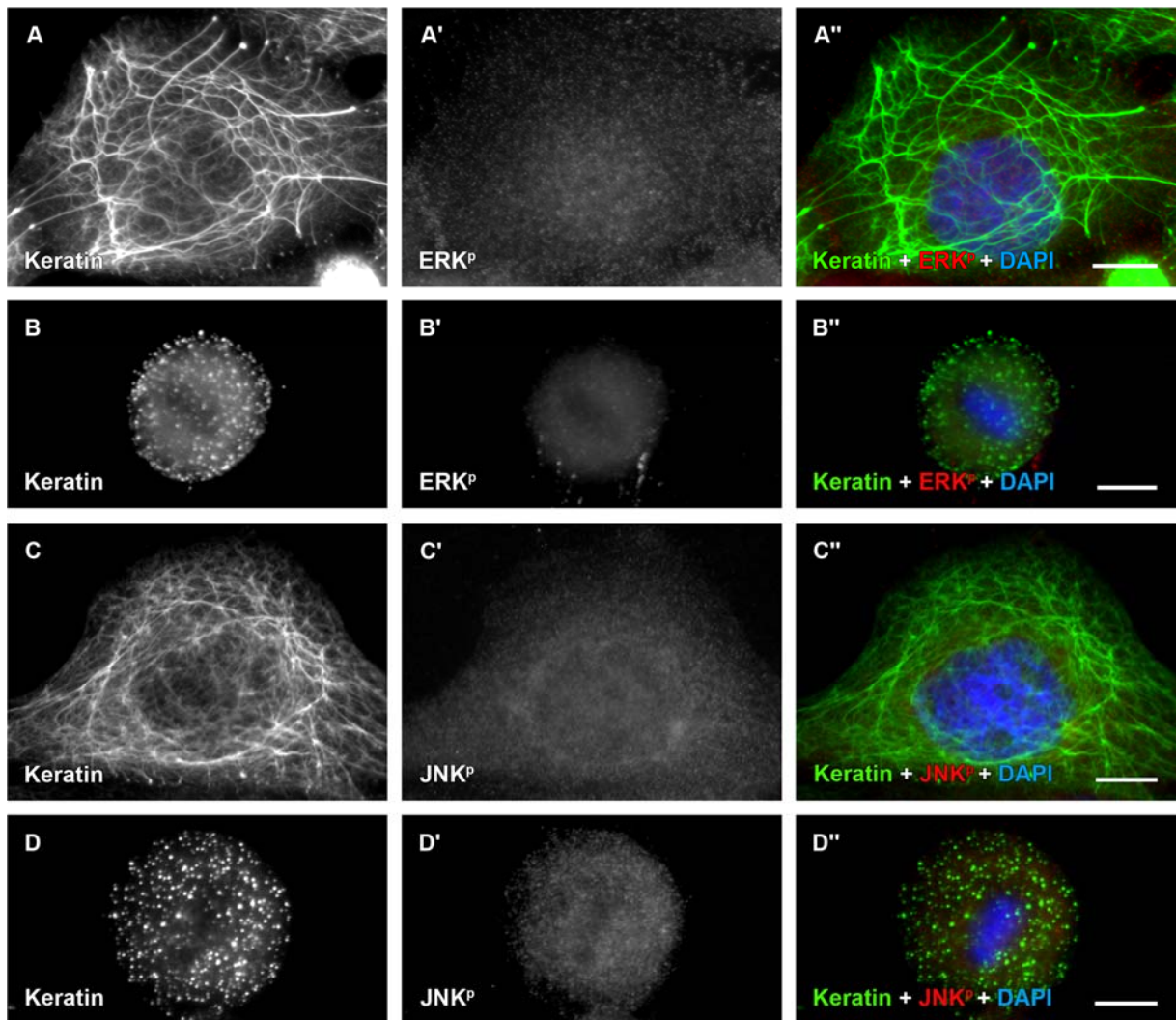


**Abbildung 3.27: Die Behandlung von AK13-1 Zellen mit OV führt zur Aktivierung von ERK (p44).** Immunblots von Gesamtzelllysaten aus AK13-1 Zellen. Die Zellen wurden vor der Lyse entweder mit OV (20 mM) inkubiert oder unbehandelt im Raumlicht bzw. im Dunkeln präinkubiert. Die Gesamtzelllysate wurden dann über eine 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit Antikörpern gegen Gesamt-p44 (p44 gesamt) bzw. gegen phosphoryliertes p44 (p44 phos) markiert. Mit Hilfe von HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern und dem *Enhanced Chemilumineszenz System* (ECL) wurden die gebundenen Antikörper auf den Blots detektiert. Zellen, die mit Raumlicht präinkubiert wurden, zeigen einen erhöhten Anteil an p44<sup>P</sup>, der jedoch unabhängig von OV gleichmäßig hoch ist. Zellen, die im Dunkeln präinkubiert wurden, weisen hingegen nur einen geringen Anteil an p44<sup>P</sup> auf. Durch Inkubation mit OV steigt der Anteil an p44<sup>P</sup> stark an.

### 3.3.7 *In Vivo* Phosphorylierung von unterschiedlichen MAPK

Sowohl p38 als auch ERK werden durch Inkubation der Zellen mit OV phosphoryliert und dadurch aktiviert. Beide könnten somit Teil der Signalkaskade sein, welche für die Regulation des Keratinnetzwerks verantwortlich ist. Wie bereits erwähnt ist OV jedoch ein unspezifischer Inhibitor von Phosphatasen. Neben der Signalkaskade, die für die Regulation des Keratinabbaus und der Granulabildung verantwortlich ist, werden sehr wahrscheinlich noch andere Signalkaskaden durch die OV Inkubation gestört, die keinen Einfluss auf die Organisation des Keratinnetzwerks haben. Die Aktivierung von p38 und ERK muss daher nicht zwangsläufig mit einem Abbau des Keratinnetzwerks zusammenhängen. Um zu untersuchen, ob die aktivierten MAPK ERK und p38 Einfluss auf die Regulation des Keratinnetzwerks haben, wurden AK13-1 Zellen mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert und mit Phosphoepitop-spezifischen Antikörpern gegen MAPK markiert.

In Interphasezellen konnte weder für ERK<sup>P</sup>, für JNK<sup>P</sup> noch für p38<sup>P</sup> eine Lokalisation an den Keratinfilamenten detektiert werden. Vielmehr liegen die MAPK diffus im Zytoplasma vor (Abb. 3.28 A', C'; Abb. 3.30 A'). Auch in mitotischen Zellen verändert sich nichts an der Verteilung von phosphoryliertem JNK oder ERK. Beide MAPK sind weiterhin diffus im Zytoplasma der Zellen verteilt (Abb. 3.28 B', D'). Im Gegensatz dazu ist p38<sup>P</sup> in mitotischen Zellen jedoch punktuell verteilt und kolokalisiert mit den Keratingranula (Abb. 3.29 A''-C''). Bereits in der Prophase, wenn das Keratinnetzwerk zerfällt, ist p38<sup>P</sup> mit den Keratingranula kolokalisiert (Abb. 3.29 A''). Es wurden auch Zellen detektiert, die sich in einem frühen Stadium des Keratinfilamentauf- bzw. abbaus befanden und dicke Filamentbündel oder

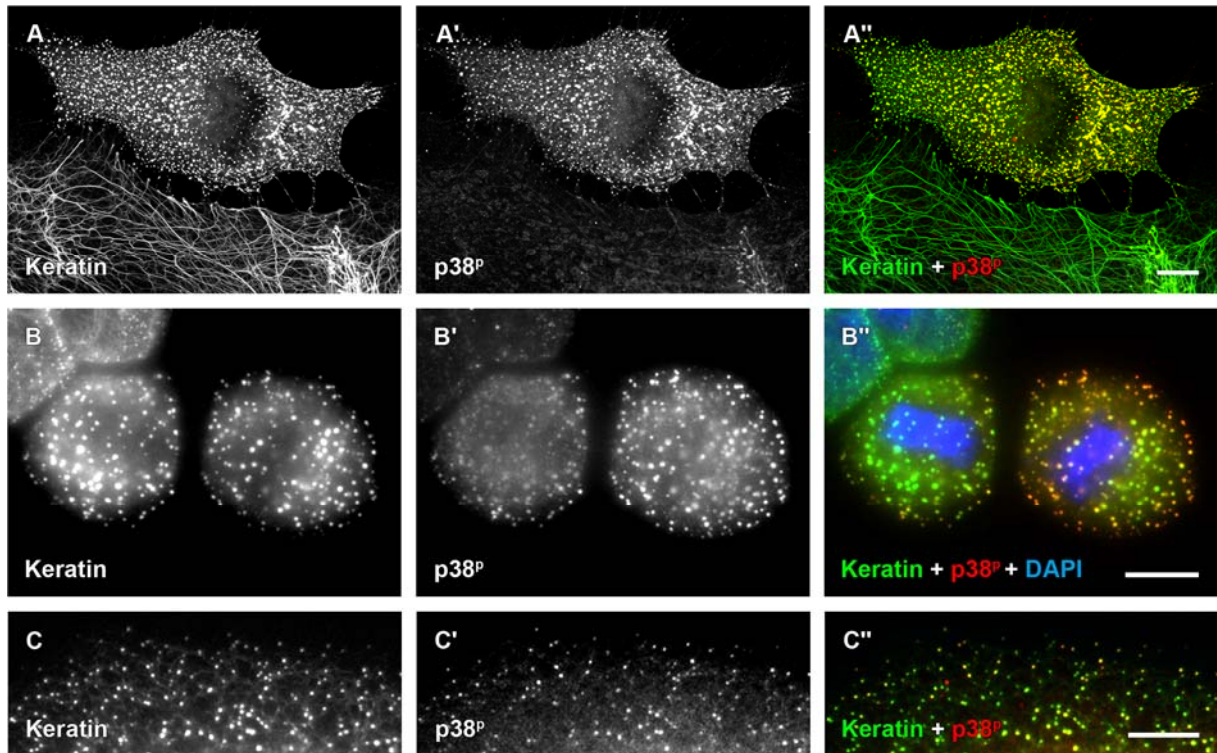


**Abbildung 3.28: *In Vivo* Phosphorylierung von JNK- und ERK - MAPK.** Immunfluoreszenzaufnahmen von Formaldehyd-fixierten AK13-1 Zellen. (A-D) Detektion von stabil exprimiertem HK13-EGFP. Detektion von ERK<sup>P</sup> (A', B') bzw. JNK<sup>P</sup> (C', D') mit Phosphoepitop-spezifischen Antikörpern. Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen (A''-D''); Keratin = grün, Phospho-MAPK = rot, DAPI = blau). In mitotischen Zellen kann im Vergleich zu Interphase-Zellen keine Erhöhung der Phosphorylierung von JNK bzw. ERK detektiert werden. Weder JNK<sup>P</sup> noch ERK<sup>P</sup> kolokalisieren mit Keratinfilamenten oder mitotischen Keratingranula. Größenbalken: 10 µm.

bereits kleine Keratingranula aufwiesen, welche noch mit dünnen Keratinfilamenten verbunden waren. Auch hier konnte eine Kolokalisation der Keratine mit p38<sup>P</sup> detektiert werden (Abb. 3.29 C''). In späteren Stadien der Mitose (Metaphase) wird diese Kolokalisierung noch deutlicher (Abb. 3.29 B'').

In Interphasezellen, die vor der Fixierung mit OV behandelt wurden, kam es ebenfalls zu einer Veränderung in der Verteilung des phosphorylierten p38. Bereits kurz nach Zugabe von OV (5 min) und mit dem Entstehen der ersten Keratingranula ist p38<sup>P</sup> nicht länger diffus im Zytoplasma lokalisiert, sondern bildet vielmehr ein granuläres Muster, welches mit den entstandenen Keratingranula kolokalisiert (Abb. 3.30 B-B'', C-C''). Die Verteilung von p38<sup>P</sup> in Zellen, die mit OV inkubiert wurden, ähnelt somit stark der Verteilung von p38<sup>P</sup> in mitotischen Zellen.





**Abbildung 3.29: In Vivo Phosphorylierung der p38-MAPK.** (A, B) Fluoreszenzaufnahmen von Methanol/Aceton-fixierten AK13-1 Zellen in verschiedenen Stadien der Mitose. (C) ist ein vergrößerter Ausschnitt der Peripherie einer postmitotischen Zelle. Detektion von stabil-exprimiertem HK13-EGFP (A-C) und von p38<sup>p</sup> (A'-C') mit Hilfe von Phosphoepitop-spezifischen Antikörpern in Kombination mit Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern. (A''-C''). Überlagerung der eingefärbten Fluoreszenzaufnahmen zur besseren Visualisierung (Keratin = grün, p38<sup>p</sup> = rot, DAPI = blau). In mitotischen Zellen kann, im Vergleich zu Interphase-Zellen, eine deutliche Erhöhung der Phosphorylierung von p38 detektiert werden (A', B', C'). Die Verteilung des phosphorylierten p38 entspricht hierbei dem Verteilungsmuster der Keratingranula im Zytoplasma der Zellen. Größenbalken: 10 µm.

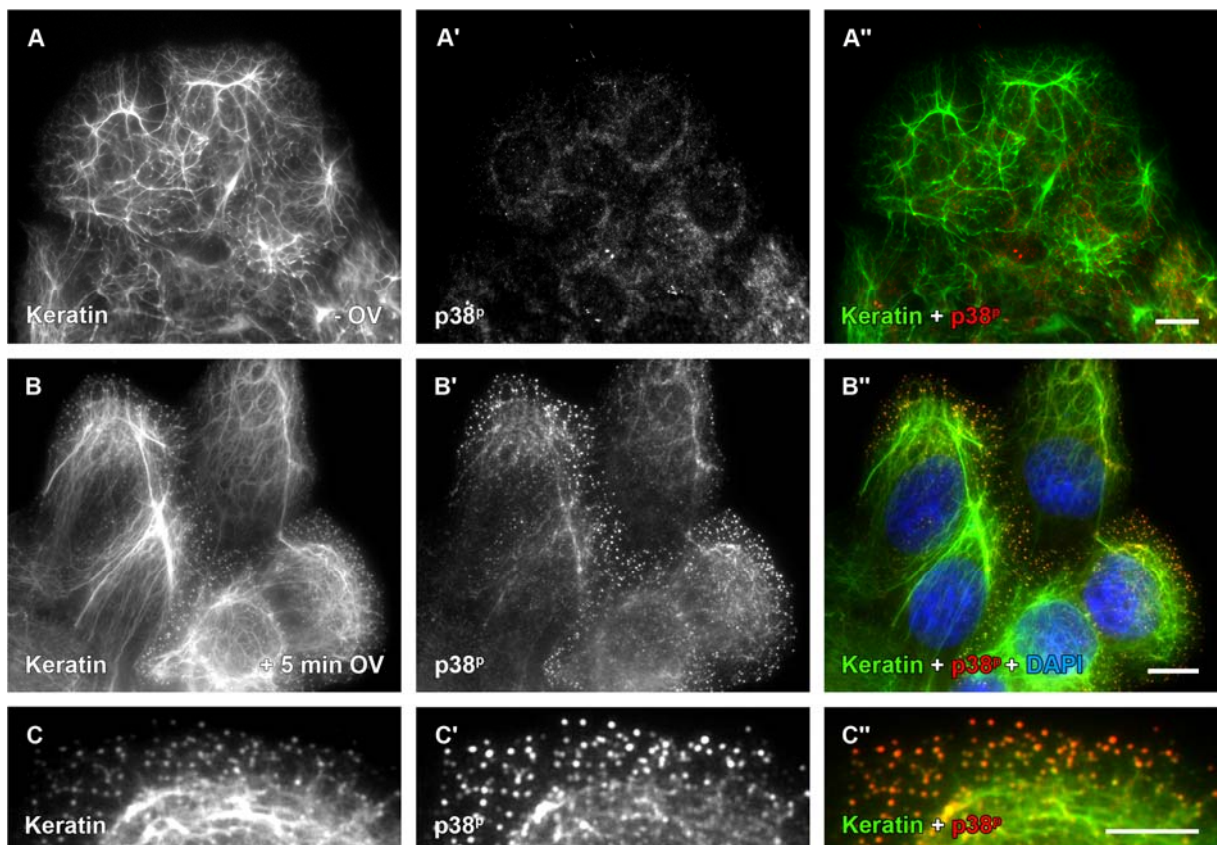
### 3.3.8 p38<sup>p</sup> Kolokalisierung mit EBS-Keratin-Mutanten

Wie bereits in Kapitel 3.3.3 beschrieben, werden Keratingranula in MT5K14-26 Zellen als Folge einer dominant-negativen Mutation im Keratin 14 gebildet. Um zu untersuchen, ob bei der Bildung dieser Granula, ähnlich wie bei der Bildung der Keratingranula in mitotischen Zellen bzw. in Zellen, die mit OV behandelt wurden, eine Rekrutierung von p38 durch Keratine erfolgt, wurden die Zellen fixiert und mit p38<sup>p</sup> Antikörpern markiert. Als Kontrolle dienten die mit dem Wildtyp-Keratin 14 stabil transfizierten MT5K14-25 Zellen, die im Gegensatz zu den MT5K14-26 Zellen keinerlei Störungen des Keratinnetzwerks aufweisen (Abb. 3.31 A).

Wie erwartet, konnte in den MT5K14-25 Kontrollzellen nur eine diffuse, das ganze Zytoplasma umfassende, Verteilung von p38<sup>p</sup> detektiert werden (Abb. 3.31 A'). Es konnte keine Kolokalisation von p38<sup>p</sup> mit Keratingranula festgestellt werden (Abb. 3.31 A''). Im Gegensatz hierzu konnte in MT5K14-26 Zellen eine starke Kolokalisierung von p38 mit den Keratingranula detektiert werden (Abb. 3.31 B'').

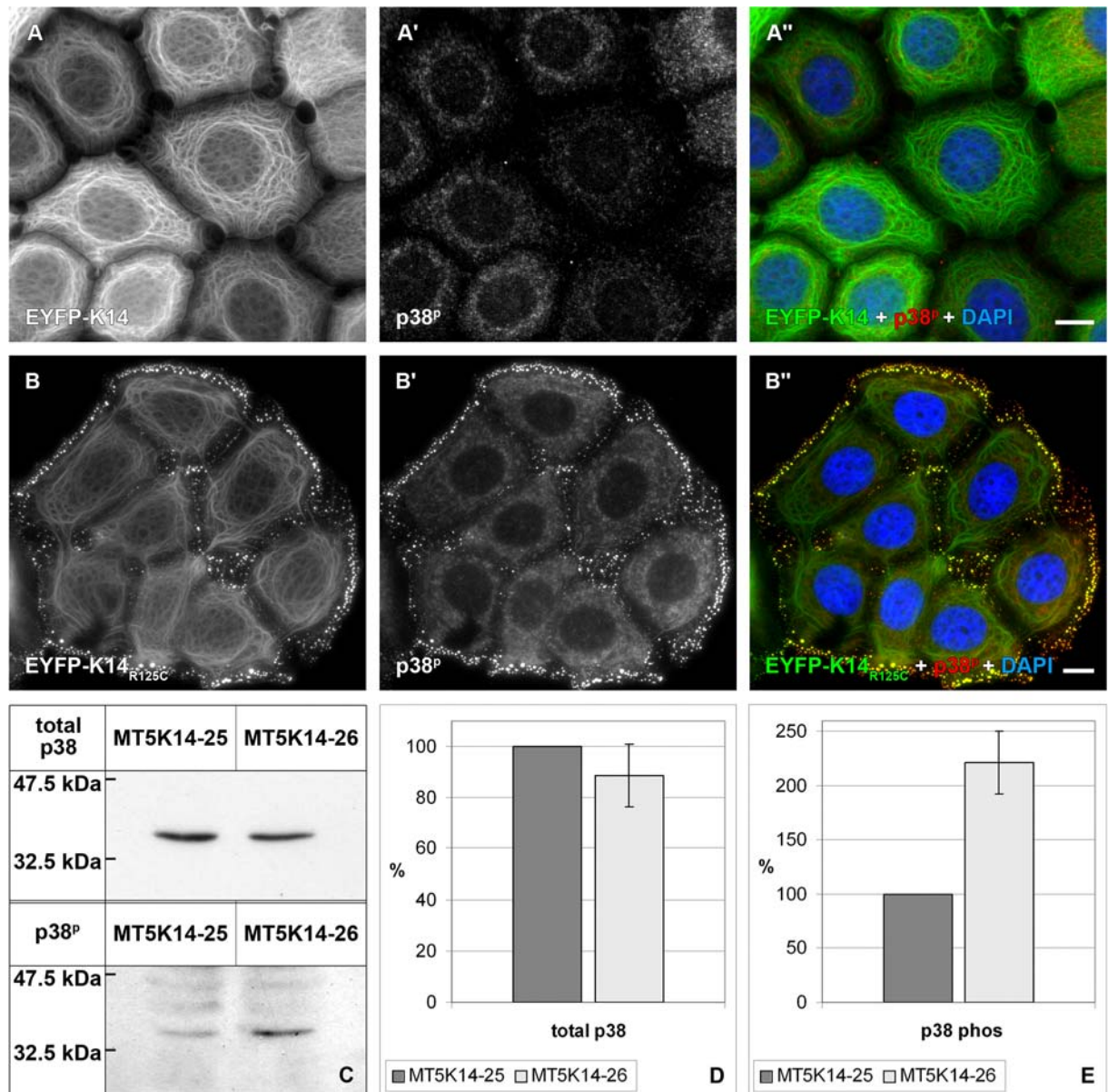
### 3. Ergebnisse

Um zu ermitteln, wie groß der Unterschied zwischen p38 bzw. aktiviertem p38 in den beiden Zelllinien ist, wurden Zytoskelettextrakte der Zellen hergestellt. Diese Extrakte wurden dann über eine SDS-PAGE (10%) aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen geblottet und mit spezifischen Antikörpern gegen p38 und p38<sup>P</sup> markiert. Anschließend wurden die Nitrozellulosemembranen eingescannt und die integrierte optische Dichte (IOD) der einzelnen Banden, mit Hilfe eines Computerprogramms (Gel-Pro Analyzer, BioRad), bestimmt. Die Messungen ergaben, dass sich die Gesamtmenge an p38 in MT5K14-25 und MT5K14-26 Zellen nicht unterscheidet (Abb. 3.31 C, D). Das mutierte Keratin 14<sub>R125C</sub> bzw. das reorganisierte Keratinnetzwerk hat somit keinen Einfluss auf die Menge an exprimiertem p38. Der Anteil an phosphoryliertem p38 ist jedoch in MT5K14-26 Zellen im Vergleich zu MT5K14-25 Zellen um mehr als das Doppelte (220%) erhöht (Abb. 3.31 C, D).

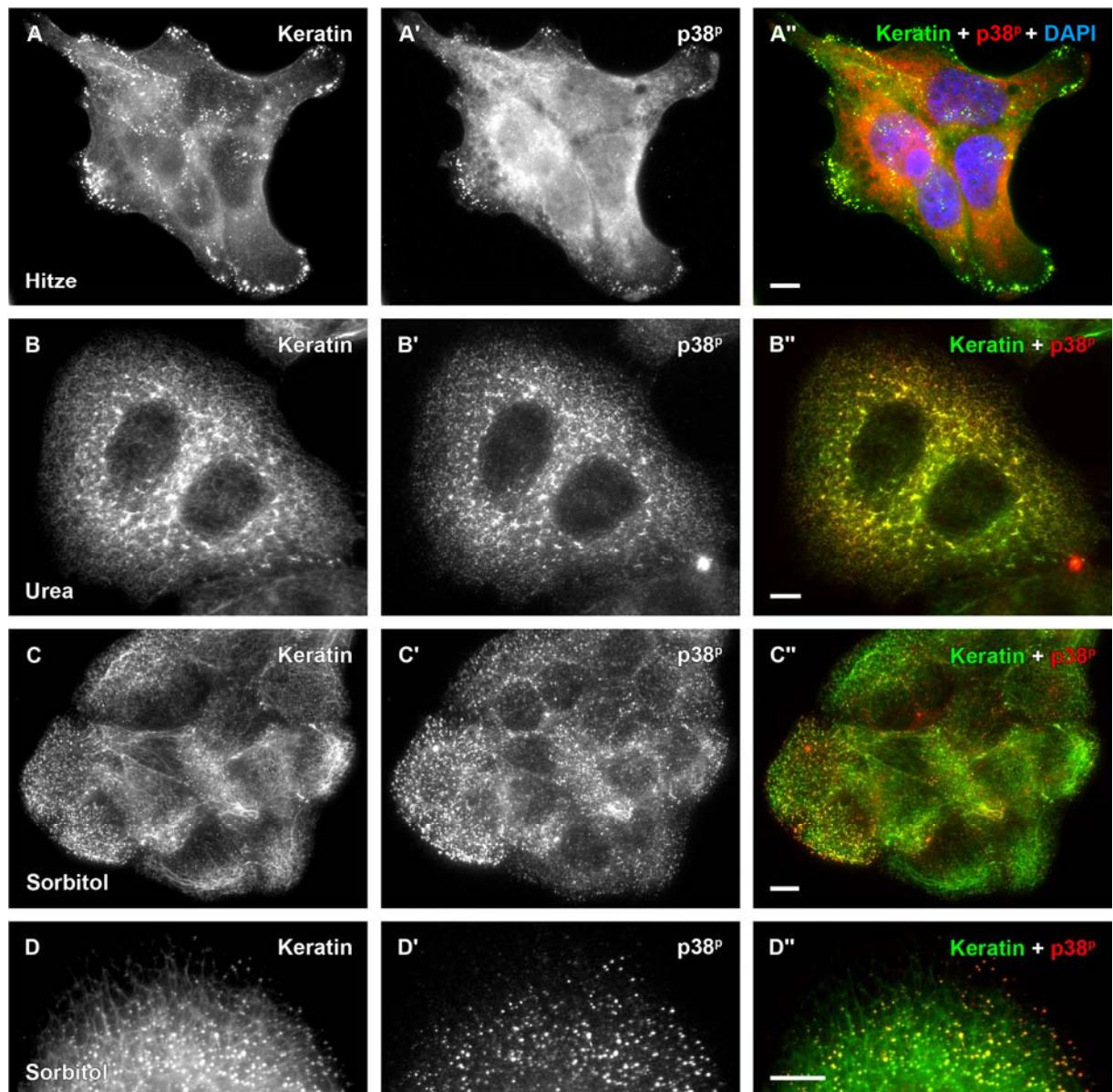


**Abbildung 3.30: p38<sup>P</sup> kolokalisiert mit OV-induzierten Keratingranula.** Fluoreszenzaufnahmen von Methanol/Aceton-fixierten AK13-1 Zellen. (A-C) Detektion der Verteilung von stabil exprimiertem HK13-EGFP. (A'-C') Detektion von p38<sup>P</sup> in unbehandelten Zellen und in Zellen, die mit 20 mM OV inkubiert wurden (C vergrößerter Ausschnitt aus B). Die Detektion von p38<sup>P</sup> erfolgte mit Hilfe von Phosphoepitop-spezifischen Antikörpern in Kombination mit Cy3-gekoppelten Sekundäntikörpern. (A''-C''). Überlagerung der eingefärbten Fluoreszenzaufnahmen zur besseren Visualisierung (Keratin = grün, p38<sup>P</sup> = rot, DAPI = blau). In unbehandelten Interphasezellen ist p38<sup>P</sup> diffus im Zytoplasma verteilt (A'). In Zellen, die mit OV behandelt wurden, kolokalisiert p38<sup>P</sup> mit den induzierten Keratingranula (B'', C''). Größenbalken: 10 µm.





**Abbildung 3.31: Aktiviertes p38<sup>P</sup> kolokalisiert mit mutierten Keratinen und ist stark erhöht in Zellen, die Keratin-Mutanten exprimieren.** (A-B) Immunfluoreszenzaufnahmen von Methanol/Aceton fixierten MCF-7 Zellen, die stabil EYFP-K14-Chimären (A; Zelllinie MT5K14-25) bzw. die EBS-Mutante EYFP-K14<sub>R125C</sub> (B; Zelllinie MT5K14-26) exprimieren. Die Detektion von p38<sup>P</sup> erfolgte mit Hilfe von Phosphoepitop-spezifischen Antikörpern in Kombination mit Cy3-gekoppelten Sekundäntikörpern. (A'', B'') Überlagerung der eingefärbten Fluoreszenzaufnahmen zur besseren Visualisierung der räumlichen Verteilung der verschiedenen Polypeptide (Keratin = grün, p38<sup>P</sup> = rot, DAPI = blau). p38<sup>P</sup> kolokalisiert mit den durch das mutierte Keratin entstandenen Keratingranula der MT5K14-26 Zellen. In MT5K14-25 Zellen, die das Wildtyp-Keratin 14 exprimieren, ist p38<sup>P</sup> diffus im Zytoplasma verteilt und kolokalisiert nicht mit den Keratinfilamenten. (C-E) Detektion von Gesamt-p38 und p38<sup>P</sup> in Gesamtzelllysaten aus MT5K14-25 und MT5K14-26 Zellen mit Hilfe von Immunblots (C). Die Gesamtzelllysate wurden über eine 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Mit Hilfe von Antikörpern gegen Gesamt-p38 (C; total p38) bzw. gegen phosphoryliertes p38 (C; p38<sup>P</sup>) wurden die geblotteten Zelllysate markiert. Die Blots wurden eingescannt und die integrierte optische Dichte (IOD) der p38- und p38<sup>P</sup>-Banden am Computer bestimmt (D, E). Die Histogramme in C und D sind Zusammenfassungen dieser quantitativen Bestimmung der Immunblots (n=4). Die mit MT5K14-25 Zellen bestimmten Werte wurden als 100% definiert. Die Menge an Gesamt-p38 unterscheidet sich in den MT5K14-25 Zellen nicht von der Menge in MT5K14-26 Zellen (90 ± 6,8%; P = 0,343). Der Anteil an phosphoryliertem p38 hingegen ist in MT5K14-26 Zellen um mehr als das Doppelte erhöht (220 ± 29,9%; P ≤ 0,001). Die Mutation der Keratine hat also keinen Einfluss auf die Menge an exprimierten p38. Sie führt jedoch zu einem Anstieg der Phosphorylierung der p38 MAPK. Größenbalken: 10 µm.



**Abbildung 3.32: p38<sup>p</sup> kolokalisiert mit Keratingranula in Stresssituationen.** Fluoreszenzaufnahmen von Methanol/Aceton-fixierten AK13-1 Zellen. Detektion von stabil exprimiertem HK13-EGFP und von p38<sup>p</sup> in Zellen, die zuvor unterschiedlichen Arten von Stress ausgesetzt wurden. Die Zellen wurden 5 min bei 60°C inkubiert (**A–A''**), für 7 min mit 150 mM Harnstoff behandelt (**B–B''**) oder für 10 min 200 mM Sorbitol ausgesetzt (**C–C''**; höhere Vergrößerung **D–D''**). Die Detektion von p38<sup>p</sup> erfolgte mit Hilfe von Phosphoepitop-spezifischen Antikörpern in Kombination mit Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern. (**A''–D''**) Überlagerung der eingefärbten Fluoreszenzaufnahmen (Keratin = grün, p38<sup>p</sup> = rot, DAPI = blau). In allen Fällen erfolgte durch den Stress eine Reorganisation des Keratinnetzwerks. Durch die Erhöhung der Temperatur und durch die Inkubation mit Sorbitol und Harnstoff entstanden Keratingranula (**A, C, D**) bzw. Keratinverklumpungen (**B**), die in jedem Fall mit dem aktivierten p38<sup>p</sup> kolokalisieren (**A''–D''**). Größenbalken: 10 µm.

### 3.3.9 p38<sup>P</sup>-Kokolisierung mit Keratinen in physiologischen

#### Stresssituationen

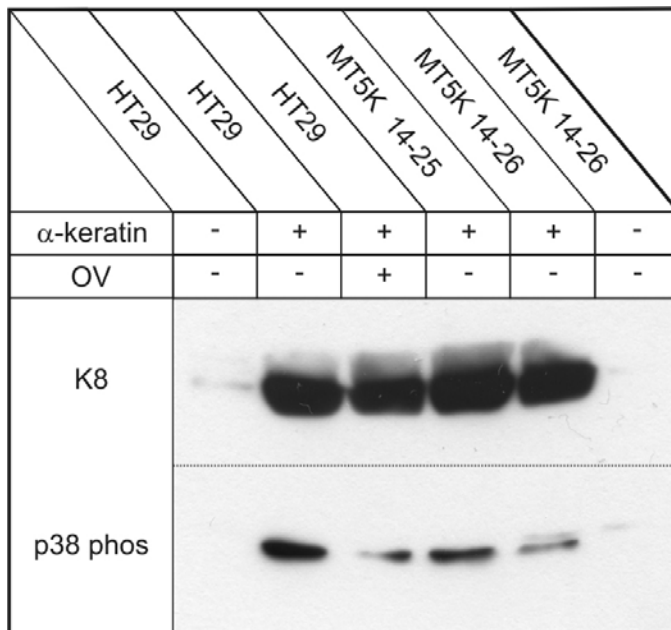
Um zu ermitteln, ob die Phosphorylierung der p38 MAPK auch in anderen Situationen auftritt, in denen es zu einer Reorganisation des Keratinnetzwerks bzw. zum Abbau von Keratinfilamenten kommt, wurden AK13-1 Zellen verschiedenen Formen von Stress ausgesetzt. Die Zellen wurden Hitzestress (60°C, 5 min), hyperosmotischem Stress (Sorbitol, 200 mM, 10 min) und hypoosmotischem Stress (Harnstoff, 150 mM, 7 min) ausgesetzt, mit Methanol/Aceton fixiert und anschließend mit Phosphoepitop-spezifischen p38 Antikörpern markiert. Durch den applizierten Hitzestress entstanden Granula in den AK13-1 Zellen, die besonders in der Zellperipherie detektiert werden konnten (Abb. 3.32 A). Auch die Inkubation der Zellen mit Sorbitol führte zur Bildung von Keratingranula, die sich allerdings über das gesamte Zytoplasma verteilten (Abb. 3.32 C). Wurden die Zellen mit Harnstoff behandelt, kam es bereits nach kurzer Zeit (5-7 min) zur Bildung von verklumpten Keratinaggregaten, die ebenfalls im gesamten Zytoplasma detektiert werden konnten (Abb. 3.32 B). In allen Situationen konnte eine Kokolisierung von p38<sup>P</sup> mit den veränderten Keratinen beobachtet werden (Abb. 3.32 A''-D'').

#### 3.3.10 Co-Immunpräzipitation von Keratinen mit p38

In der Mitose, nach Induktion durch OV und in zahlreichen Stresssituationen wird das Keratinnetzwerk abgebaut und es entstehen Keratingranula, die mit der p38<sup>P</sup> MAPK kokolisieren (siehe Kapitel 3.3.7 und 3.3.9). Das phosphorylierte p38 kokolisierte dabei stets mit den entstandenen Keratingranula. Um zu ermitteln, ob p38<sup>P</sup> direkt mit den Keratinen interagiert, wurden Co-Immunpräzipitations-Experimente durchgeführt.

Um die schwer löslichen Keratine in Lösung zu bringen, wurde sowohl NP-40 als auch Empigen BB (Lowthert *et al.*, 1995) als Detergenz verwendet. Die Zelllysate wurden dann mit keratinspezifischen Antikörpern (s. Kapitel 2.1.6, Tabelle 2.9) inkubiert. Anschließend wurden die Antikörper an Sepharose A Beads gebunden und zusammen mit den adhären den Proteinkomplexen über Zentrifugationsschritte isoliert. Die extrahierten Polypeptide wurden über eine nicht-reduzierende SDS-PAGE (10%) aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit Hilfe von p38-spezifischen Antikörpern markiert. Zusätzlich zu den Lysaten aus MT5K14-25 und MT5K14-26 Zellen wurden unbehandelte HT-29 Zellen und HT-29 Zellen, die vor der Zelllyse mit OV inkubiert worden waren, untersucht. HT-29 Zellen wurden für diese Versuche verwendet, da bereits in vorangegangenen Versuchen gezeigt werden konnte, dass sie sich gut zur Herstellung von Co-Immun-

präzipitations-Lysaten eignen (Liao *et al.*, 1997). Bei allen Zellen konnte zusammen mit dem Keratin auch p38<sup>P</sup> co-immunpräzipitiert werden (Abb. 3.33). Allerdings zeigte sich, dass in Situationen, bei denen es zu einer erhöhten Kolo-kalisierung von p38 mit Keratinen kommt, keine verstärkte Co-Präzipitation von p38<sup>P</sup> erzielt werden konnte. Vielmehr lag die Menge an präzipitiertem p38<sup>P</sup> deutlich unter der Menge unbehandelter Kontrollzellen bzw. MT5K14-25 Zellen (Abb. 3.33). Dieses Ergebnis kann allerdings Folge der schlechten Löslichkeit der filamentösen Keratine sein oder auf der Lösung schwacher Bindungen unter den gewählten Detergenzbedingungen beruhen.



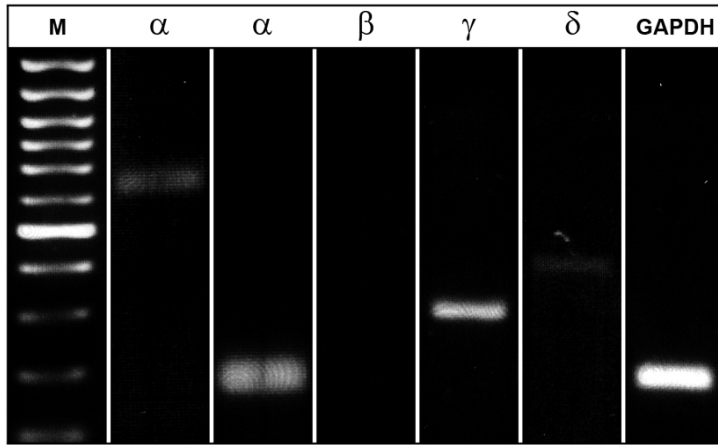
**Abbildung 3.33: Die Behandlung mit OV und die Expression von EBS-Keratinmutanten führten nicht zu einer erhöhten Co-Immünpräzipitation von p38<sup>P</sup>.** Immunpräzipitate wurden mit Hilfe des L2A1-Antikörpers aus HT29, MT5K14-25 und MT5K14-26 Zellen hergestellt. Dieser Antikörper ist gegen Keratin 8/18 gerichtet und wurde für die Präzipitation der Proteine an Sepharose A Beads gekoppelt. Die Präzipitate wurden über eine 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf Nitrozellulose geblottet. p38<sup>P</sup> wurde mit Hilfe von spezifischen Antikörpern, in Kombination mit HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern, detektiert. Die Präinkubation der HT29 Zellen mit 20 mM OV (4 min) führte nicht zu einem Anstieg des co-präzipitierten p38<sup>P</sup>. Des Weiteren co-präzipitierte p38<sup>P</sup> nicht präferentiell mit dem mutierten Keratin der MT5K14-26 Zellen.

### 3.3.11 Herstellen von Vektorsystemen für Knock-down Versuche

Die Expression von Proteinen kann mit Hilfe von shRNA herunterreguliert werden. In dieser Arbeit sollten Oligonukleotidsequenzen für p38 spezifische shRNA mit Hilfe des pTER-Vektors in Zielzellen eingebracht werden. Um transfizierte Zellen fluoreszenzmikroskopisch zu detektieren, wurden modifizierte pTER-Vektoren verwendet, die neben der Oligonukleotidsequenz zusätzliche DNA-Sequenzen enthalten, die für Fluoreszenzproteine kodieren. Diese Fluoreszenzproteine werden durch einen eigenen Promotor (CMV) gesteuert und nach der Transfektion zusammen mit den Oligonukleotiden koexprimiert. Da viele der verwendeten Zelllinien bereits EGFP Proteine exprimieren, wurde der von E. Bockamp (Mainz) zur Verfügung gestellte EGFP-pTER Vektor umkloniert, um eine Überlagerung der Fluoreszenzen zu vermeiden. Hierfür wurde die für EGFP kodierende Sequenz durch eine Restriktion mit NheI und XbaI entfernt und durch ein entsprechendes für mRFP kodierendes Fragment ersetzt. Die mRFP Sequenz wurde mittels PCR mit den in Kapitel 2.1.8



beschriebenen Primern aus dem Vektor mRFP-Aktin (siehe Kapitel 3.2.1) amplifiziert. Dabei wurden mit Hilfe der beschriebenen Primer NheI- und XbaI-Restriktionsstellen an die mRFP-Sequenz angehängt und das mRFP-Fragment über diese Restriktionsstellen in den pTER Vektor inseriert.



**Abbildung 3.34: Nachweis der p38 alpha, gamma und delta mRNA in AK13-1 Zellen.** Agarose-Gelelektrophorese von RT-PCR-Produkten die mit Hilfe spezifischer Primern gegen die verschiedenen p38-Isoformen aus AK13-1 Zellextrakten hergestellt wurden. Als Kontrolle der RNA-Extraktion wurden Primer gegen GAPDH verwendet. Die Primer sind so gewählt, dass eine Amplifikation von genomischer DNA ausgeschlossen ist. Für die alpha-Isoform wurden zwei unterschiedliche Primerpaare verwendet.

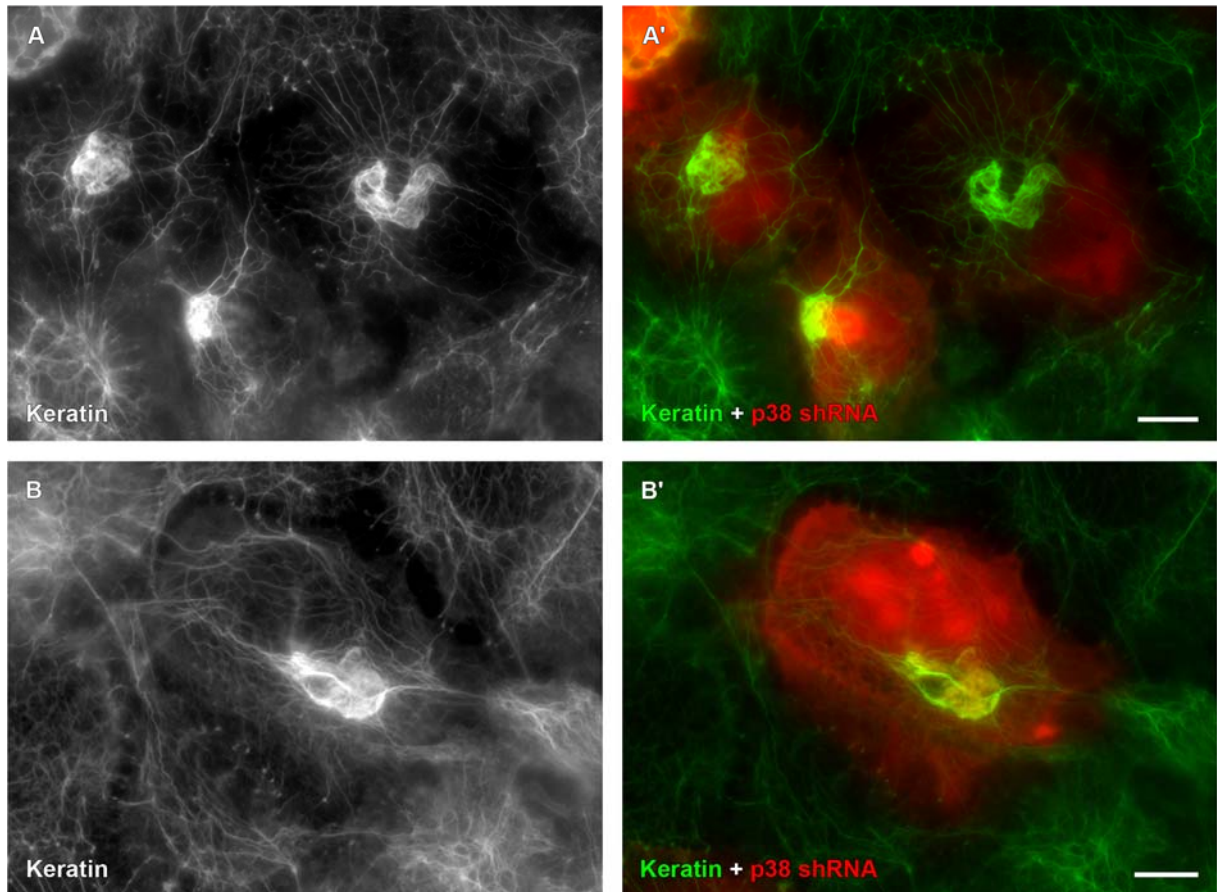
Zur Größenbestimmung der cDNA-Fragmente wurde der 100bp-Plus-Marker (M) in einer separaten Tasche mit aufgetrennt. Es konnte für alpha, gamma und delta p38 MAPK-kodierende mRNA detektiert werden.

### 3.3.12 p38-shRNA induzierter Kollaps des Keratinnetzwerks

Es lassen sich vier verschiedene p38 MAPK Isoformen unterscheiden. p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  und p38 $\delta$ . Um zu ermitteln, welche dieser Isoformen eine Rolle beim Abbau des Keratinnetzwerks und bei der Bildung von Keratingranula spielen, wurde zunächst mittels RT-PCR bestimmt, welche der Isoformen in den AK13-1 Zellen exprimiert werden.

Zunächst wurde RNA aus AK13-1 Zellen gewonnen. Diese wurde mit Hilfe der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde die cDNA mittels isoformspezifischer Primer (s. Kapitel 2.1.8; Tabelle 2.12) durch eine PCR amplifiziert und über ein Agarosegel aufgetrennt. Die p38 Isoformen alpha, gamma und delta konnten so nachgewiesen werden, wohingegen p38 beta nicht detektiert werden konnte (Abb. 3.34).

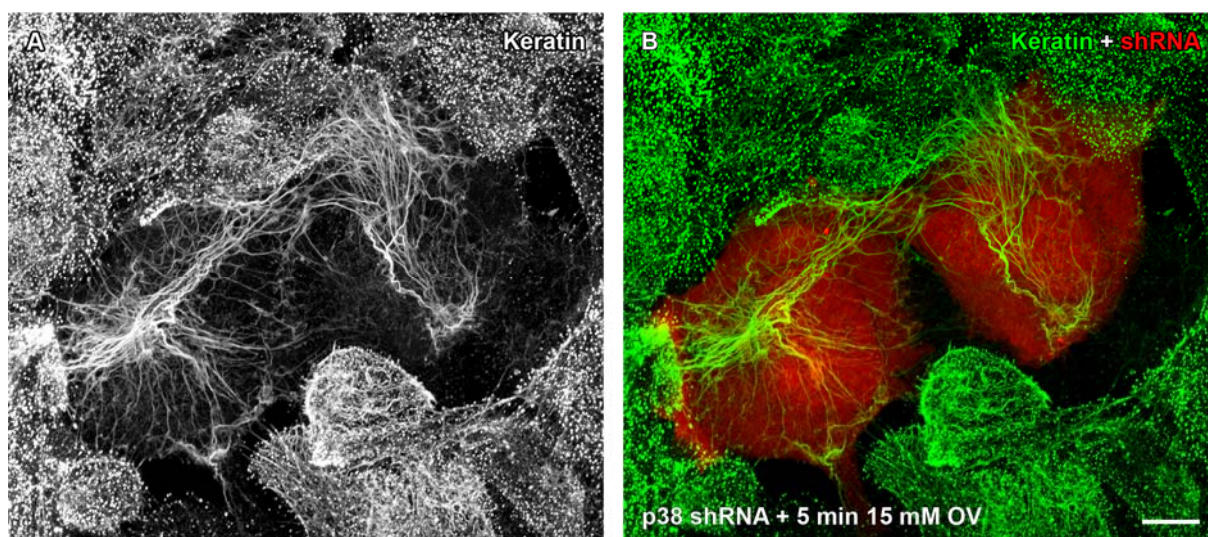
Für die in den AK13-1 Zellen detektierten p38 Isoformen wurden nun pTER-mRFP-Derivate hergestellt, die für p38 alpha, delta und gamma/delta Isoformen-spezifische shRNA kodieren. Zellen, die mit den klonierten shRNA-Vektoren transfiziert wurden, zeigten eine signifikante Reorganisation des Keratinnetzwerks. Die Keratinfilamente konzentrierten sich im juxt nukleären Bereich der Zellen. Dabei waren weiterhin, wenn auch stark kompaktiert, filamentöse Strukturen sichtbar (Abb. 3.35). Lediglich einige Filamente, die mit Desmosomen assoziiert waren blieben bis in die Zellperipherie ausgebreitet. Mit Hilfe von Lebendzellaufnahmen transfizierter Zellen (EB-GFP) konnte außerdem gezeigt werden, dass der Knock-Down von p38 keinen Einfluss auf die Entstehung von Mikrotubuli hat (Film 19).



**Abbildung 3.35: p38 Knock-Down in AK13-1 Zellen führt zur Reorganisation der Keratinfilamente.** Fluoreszenzaufnahmen von Formaldehyd-fixierten AK13-1 Zellen. (A, B) Detektion von stabil exprimiertem HK13-EGFP. (A',B') Detektion von Zellen die p38  $\delta/\gamma$ -spezifische shRNA zusammen mit dem kotranskribierten, monomeren rot fluoreszierendem Protein (mRFP) exprimieren. Die Expression der shRNA und der dadurch hervorgerufene Knock-Down von p38 führt zu einer Kompaktierung der Keratinfilamente im juxt nukleären Bereich der Zellen (A, D). Größenbalken: 10  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.13 Inhibierung der OV-induzierten Granulabildung nach p38 Knock-Down

Um zu ermitteln, inwiefern p38<sup>p</sup> für den Abbau der Keratinfilamente notwendig ist, wurde die p38 Expression der Zielzellen (AK13-1) mit Hilfe von shRNA herunterreguliert und die Zellen anschließend mit OV inkubiert. Zellen, die mit dem shRNA-Vektor transfiziert wurden, sind aufgrund des co-exprimierten fluoreszierenden Markerproteins leicht von nicht-transfizierten Zellen zu unterscheiden. Bereits nach 5 min Inkubation mit 20 mM OV bildeten sich in den nicht-transfizierten Kontrollzellen Keratingranula. Das Keratinnetzwerk wurde vollständig abgebaut und reorganisiert (Abb. 3.36). In den transfizierten, p38-depletierten Zellen hingegen bildeten sich keine Granula. Die durch die p38-Depletion erzeugte Konzentration der Keratinfilamente im juxt nukleären Bereich persistierte (Abb. 3.36) und die, mit Desmosomen assoziierten Keratinfilamente blieben weiterhin intakt.



**Abbildung 3.36: Das Herunterregulieren der p38-Aktivität durch shRNA verhindert die OV-induzierte Bildung von Keratingranula.** (A, B) Konfokale Laser-Scanning-Fluoreszenzaufnahmen Methanol/Aceton-fixierter AK13-1 Zellen. 24 Stunden vor der Behandlung mit OV (15 mM, 5 min) wurden die Zellen mit p38 $\alpha$ -shRNA transfiziert, um die Expression von p38 herunterzuregulieren. (A) Detektion von stabil exprimiertem HK13-EGFP. (B) Überlagerung der eingefärbten Fluoreszenzaufnahmen (grün = Keratin, rot = mit der shRNA koexprimiertes mRFP). In Zellen, die nicht mit der p38 shRNA transfiziert wurden, bildete sich durch die Inkubation mit OV Keratingranula. In den transfizierten Zellen (rot) kommt es zur Kompaktierung der Keratinfibrillen aufgrund der p38-shRNA. Es bilden sich jedoch keine Keratingranula (A, B). Die Bildung der Keratingranula scheint daher abhängig von der Expression von p38 zu sein. Größenbalken: 10  $\mu$ m.

### 3.3.14 Verhinderung der OV-induzierten Keratingranulabildung durch pharmakologische p38-Inaktivierung

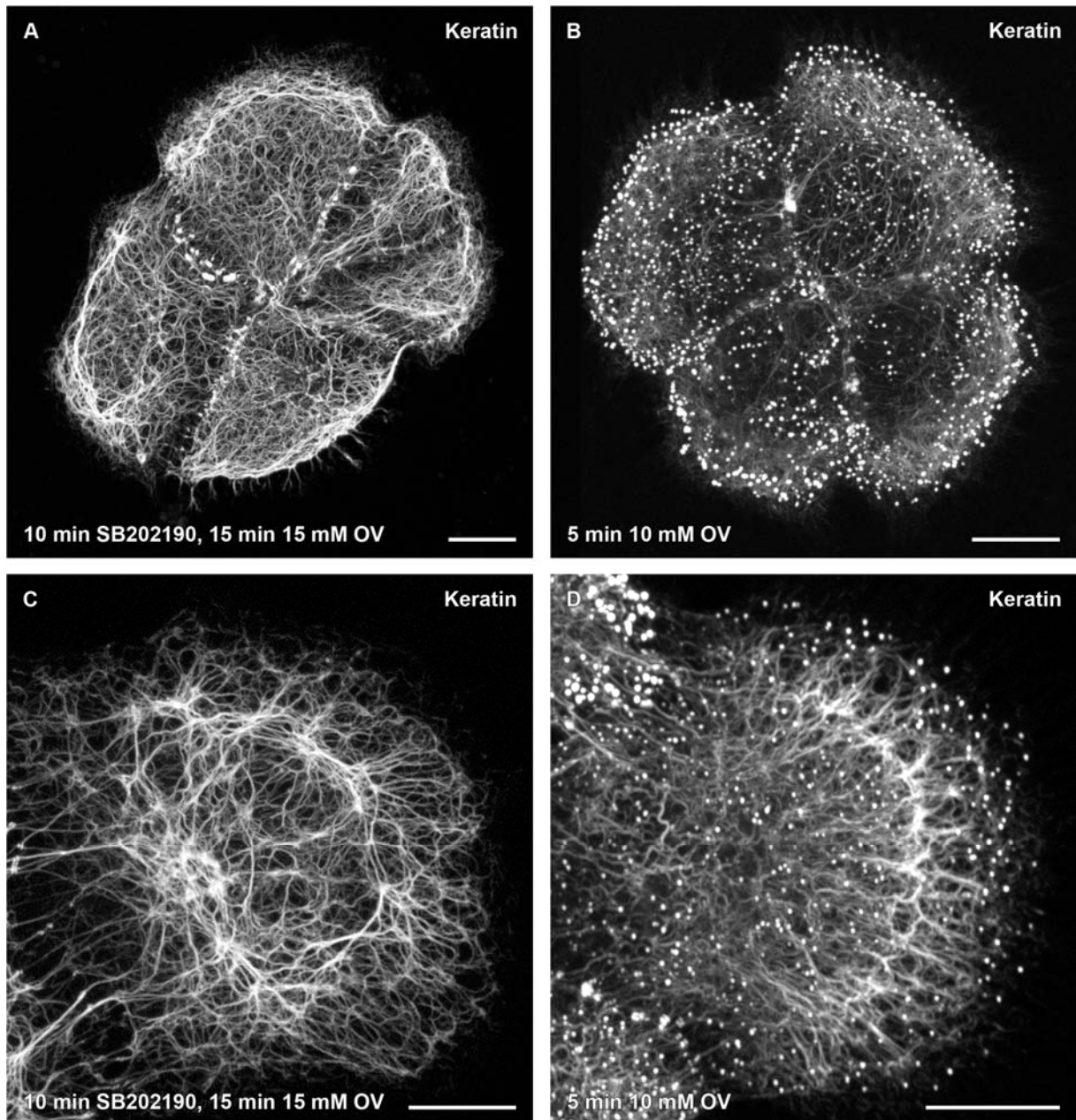
Für einen shRNA-induzierten Knock-Down müssen die Zielzellen zunächst transfiziert werden. Der Vorgang der Transfektion, die Expression ausreichender Mengen von shRNA und das Herunterregulieren der Zielproteine nehmen dabei einige Stunden in Anspruch. Hinzu kommt die Halbwertszeit der bereits exprimierten Zielproteine. Diese Nachteile der Inaktivierung von p38 durch shRNA erschweren die Untersuchung früher Effekte, die ein solcher Knock-Down von p38 haben könnte. Um frühe Effekte der p38-Inaktivierung untersuchen zu können, sollte daher die Inaktivierung von p38 pharmakologisch erreicht werden. Hierfür wurde der Inhibitor SB202190 verwendet, der selektiv die p38 alpha und beta MAPK inhibiert (Davies *et al.*, 2000).

AK13-1 Zellen wurden mit 50  $\mu$ M SB202190 für 10 min präinkubiert und danach zusammen mit unbehandelten Kontrollzellen für 15 bzw. 5 min mit 10 mM OV behandelt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Veränderungen des Keratinsystems dokumentiert. In Zellen, die nur mit SB202190 behandelt wurden, konnten keine signifikanten Änderungen in der Keratinorganisation beobachtet werden. Lediglich im peripheren Bereich der Zellen fehlt das Keratinnetzwerk (siehe Abb. 3.39 A, A'). In Kontrollzellen bildeten sich erwartungsgemäß schon nach 5 min Keratingranula (Abb. 3.37 B, D). Zellen, die zuvor mit SB202190



präinkubiert wurden, bildeten hingegen keinerlei Granula. Selbst nach einer 15 minütigen Inkubation mit einer erhöhten Konzentration von OV (15mM) konnten keine Veränderungen in der Keratinorganisation detektiert werden (Abb. 3.37 A, C).

Die durch Inkubation mit SB202190 erzeugte Inaktivierung von p38 verhindert somit, ähnlich wie der knock-down von p38 in den mit shRNA transfizierten Zellen, die Induktion der Keratingranula durch OV.



**Abbildung 3.37: Das pharmakologische Herunterregulieren der p38 Aktivität mit Hilfe von SB202190 verhindert die Bildung von Keratingranula durch OV.** Konfokale Laser-Scanning-Fluoreszenzaufnahmen Methanol/Aceton-fixierter AK13-1 Zellen. (A-D) Detektion des stabil exprimierten HK13-EGFP. Vor der Behandlung mit OV wurde ein Teil der Zellen (A, C) mit dem spezifischen p38-Inhibitor SB202190 (50  $\mu$ M) präinkubiert. Diese Zellen bildeten auch nach längerer Inkubation mit OV (A, C; 15 mM, 15 min) keine Keratingranula. Im Gegensatz dazu wurden in unbehandelten Zellen bereits nach kurzer Inkubation mit OV (B, D; 10 mM, 5 min) Keratingranula sichtbar. Größenbalken: 10  $\mu$ m.



### **3.3.15 Herstellung von fluoreszenzmarkiertem dominant aktivem MKK3 und MKK6**

Um zu überprüfen, ob die gezielte Aktivierung von p38 einen Einfluss auf die Organisation des Keratinnetzwerks hat, wurden fluoreszenzmarkierte Konstrukte dominant-aktiver *Upstream*-Aktivatoren der p38 MAPK hergestellt.

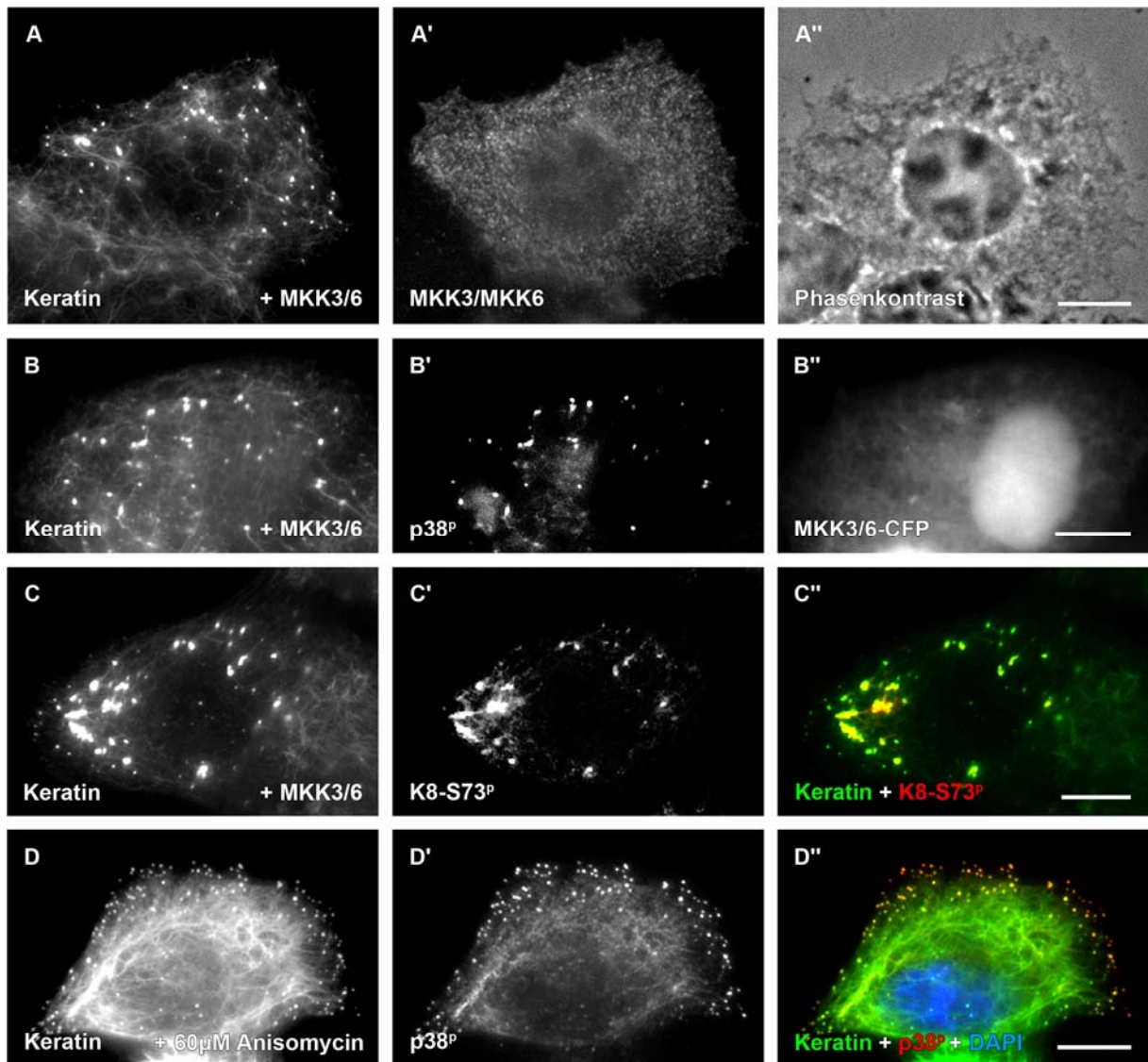
Flag-markierte cDNA, die für dominant-aktives MKK3 (in pRc/RSV) und dominant-aktives MKK6 (in pCDNA3) kodieren, wurde von Dr. Davies (University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA; (Raingeaud *et al.*, 1996)) zur Verfügung gestellt. Zur einfacheren Handhabung und um eine Verwendung in der Lebendzellmikroskopie zu gestatten, wurde das MKK3 kodierende Fragment in fluoreszenzmarkierte pTER Vektoren (van de Wetering *et al.*, 2003) kloniert. Die verwendeten pTER-Vektoren kodieren für ECFP (pTER-ECFP) bzw. für mRFP (pTER-mRFP).

Die Klonierung von dominant aktivem MKK3 in die fluoreszenzmarkierten pTER-Vektoren erfolgte über HindIII- und SpeI-Restriktionsstellen. Die Sequenz, die für dominant-aktives MKK6 kodiert, wurde mit dem Enzym XbaI aus dem Ursprungsvektor geschnitten. Mit Hilfe der T4-Polymerase wurden dann die überstehenden Enden des DNA-Strangs aufgefüllt. Anschließend wurde das DNA-Fragment mit dem Enzym HindIII verdaut. Der Zielvektor wurde mit dem Enzym SpeI aufgeschnitten, die Enden wurden ebenfalls mit der T4-Polymerase aufgefüllt und anschließend mit dem Enzym HindIII geschnitten. Danach konnte die MKK6-Sequenz über eine Ligation in die fluoreszenzmarkierten pTER-Vektoren eingefügt werden. Zellen, die mit einem der Konstrukte transfiziert werden, lassen sich leicht über die koexprimierte Fluoreszenz detektieren.

### **3.3.16 Keratinphosphorylierung und Keratingranulabildung durch MKK3- und MKK6-vermittelte p38-Aktivierung**

Der Knock-down von p38 führte zu einer Reorganisation des Keratinnetzwerks, aber nicht zu einem Abbau der Keratinfilamente oder gar zur Bildung von Keratingranula. Vielmehr konnte durch den p38-knock-down die Entstehung von OV-induzierten Keratingranula verhindert werden. p38 scheint also Teil der Signalkaskade zu sein, welche durch OV-Induktion zum Keratinfilamentabbau führt. Eine gezielte Aktivierung der p38 MAPK sollte daher ebenfalls einen Einfluss auf die Organisation der Keratinfilamente haben.

Um dies zu untersuchen, wurden AK13-1 Zellen mit Plasmiden transfiziert, die für konstitutiv aktives MKK3 und MKK6 kodieren. Die Zellen wurden nach 24 Stunden fixiert und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Der Erfolg der Transfektion konnte mittels des Flag-Tags



**Abbildung 3.38: Aktivierung von p38 führt zur Phosphorylierung der Keratine und zur Bildung von Keratingranula in AK13-1 Zellen.** Immunfluoreszenzaufnahmen von Formaldehyd-fixierten (A, B) und Methanol/Aceton-fixierten (C, D) AK13-1 Zellen. (A-D) Detektion des stabil exprimierten HK13-EGFP in AK13-1 Zellen. 24 Stunden nach Transfektion mit konstitutiv aktivem MKK3/MKK6 (A-C) bzw. 5 min nach Inkubation mit dem p38-Aktivator Anisomycin (D, 60  $\mu$ M) wurden die Zellen fixiert und mit Hilfe von Antikörpern markiert. Transfizierte Zellen wurden mit Hilfe des MKK3/MKK6-assoziierten Flag-Tag Epitops (A') bzw. mit Hilfe des koexprimierten Cyanfluoreszierenden Proteins (CFP; B'') detektiert. Die Detektion von p38<sup>P</sup> (B', D') bzw. K8-S73<sup>P</sup> (C') erfolgte mit Hilfe von Phosphoepitop-spezifischen Antikörpern in Kombination mit Cy3 bzw. TexasRed-gekoppelten Sekundärantikörpern. In den transfizierten Zellen werden Keratingranula gebildet (A, B, C). Die Zellen sind außerdem positiv für p38<sup>P</sup> und K8-S73<sup>P</sup>. Auch in Zellen, die mit Anisomycin behandelt wurden, kommt es zur Bildung von Keratingranula (D, Überlagerung in D''). Größenbalken: 10  $\mu$ m.

immunzytologisch überprüft werden (Abb. 3.38 A'). Außerdem wurden MKK3- und MKK6-Plasmide hergestellt, die zusätzlich CFP als Markerprotein exprimierten (s. Kapitel 3.3.15). Zellen, die nur mit MKK3, mit MKK6 oder mit beiden Konstrukten gleichzeitig transfiziert wurden, zeigten nach 24 Stunden über das gesamte Zytoplasma verteilte Keratingranula (Abb. 3.38 A-C). Eine Markierung der Zellen mit Phosphoepitop-spezifischen Antikörpern zeigte außerdem, dass diese Keratingranula positiv für p38<sup>P</sup> (Abb. 3.38 B') und K8-S73<sup>P</sup> (Abb. 3.38

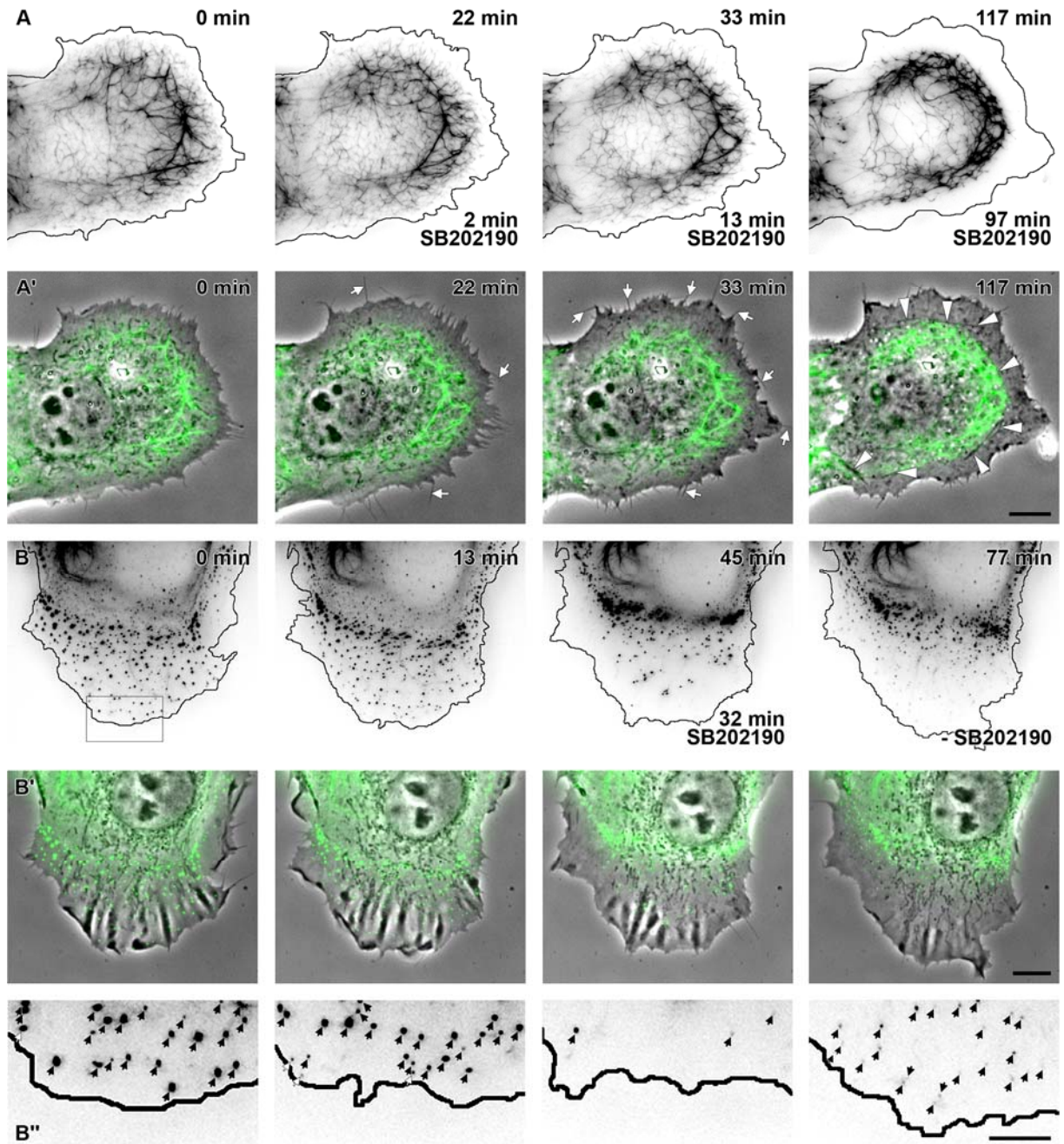
C') sind. MKK3 und MKK6 hingegen sind nicht mit den Keratingranula kolokalisiert, sondern diffus im Zytoplasma verteilt (Abb. 3.38 A'). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass 24 Stunden nach der Transfektion ein Großteil der Zellen verschwunden war und zahlreiche Zellen Zeichen von Apoptose aufwiesen. Dies ist vermutlich auf die Apoptose-induzierenden Eigenschaften von aktiviertem p38 zurückzuführen (Grethe *et al.*, 2004; Andrysik *et al.*, 2006).

### **3.3.17 Anisomycin-induzierte Keratingranulabildung**

Um frühe Auswirkungen einer p38-Aktivierung zu beobachten, bietet sich auch hier wieder eine schneller wirkende pharmakologische Aktivierung von p38 an. Eine solche schnellere, wenn auch unspezifischere Methode der p38 Aktivierung, ist die Inkubation der Zellen mit Anisomycin. Anisomycin ist ein Antibiotikum, das aus *Streptomyces griseolus* gewonnen wird und aktivierend auf p38 wirkt (Cano *et al.*, 1996; Rosser *et al.*, 2004). Bereits 3 Minuten nach Inkubation mit 60  $\mu$ M Anisomycin bildeten sich in AK13-1 Zellen die ersten Keratingranula in der Zellperipherie (Abb. 3.38 D). Wie auch bei den mit MKK3 und MKK6 transfizierten Zellen kolokalisiert p38<sup>P</sup> mit diesen neu entstandenen Keratingranula (Abb. 3.38 D''). Sowohl die genetisch als auch die pharmakologisch induzierte Aktivierung von p38 führt demnach zu einer Reorganisation des Keratinnetzwerks und zur Bildung von Keratingranula.

### **3.3.18 p38-Aktivitäts-Abhängigkeit der Keratinbewegung, der Keratinfilamentneubildung und des Keratingranula Abbau**

Die Untersuchungen an fixierten Zellen deuteten darauf hin, dass die langfristige Depletion von p38 (>24 Stunden) zu einer Reorganisation des Keratinnetzwerks führt (siehe Abb. 3.35). Die kurzfristige Inaktivierung von p38 durch Inhibitoren wie SB202190 hingegen induzierte weniger starke Effekte. Um zu untersuchen, ob die Depletion von p38 Auswirkungen auf die Dynamik des Keratinnetzwerks hat, wurden Zellen mit SB202190 inkubiert und mit Hilfe von Fluoreszenz-Zeitrafferaufnahmen untersucht. Es wurden Zeitrafferaufnahmen von AK13-1 Zellen vor, während und nach Inkubation mit SB202190 angefertigt. Die Auswertung dieser Aufnahmen zeigte, dass die Zugabe von SB202190 (100  $\mu$ M) zu einer Konzentrierung des Keratinnetzwerks um den Nukleus führt (Abb. 3.39 A, A'). Die Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen der Keratine mit den entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen zeigte, dass im Bereich der Zellperipherie keine KFP mehr gebildet werden (Abb. 3.39 A'). Die Zellen waren aber weiterhin ausgebreitet und in der Zellperipherie konnte weiterhin *Ruffling* beobachtet werden (Film 21). Die bestehende *Ruffling*-Aktivität der Plasmamembran lässt



**Abbildung 3.39: Die Inaktivierung von p38 verhindert die Bildung der KFP in AK13-1 Zellen und den Abbau der Keratingranula in MT5K14-26 Zellen.** Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen von stabil exprimiertem HK13-EGFP in AK13-1 Zellen (A) und stabil exprimiertem EYFP-K14<sub>R125C</sub> in MT5K14-26 Zellen (B, B''). Die Position der Plasmamembran (Linien in A, B, B'') wurde mit Hilfe von Phasenkontrastaufnahmen eingefügt (A', B'). Die Überlagerungen mit den entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen (A', B') dienen der besseren Lokalisierung der Keratine. Für die Gesamtsequenzen siehe Film 20 bzw. Film 21. (A, A') Die Inkubation der Zellen mit dem p38-Inhibitor SB202190 (100  $\mu$ M) führte zu einem Rückzug der Keratinfilamente aus der Zellperipherie. Die Bildung von Filopodien in diesen Bereichen wurde nicht gestört (Pfeile). Gleichzeitig bildeten sich Stressfasern in direkter Nähe der äußeren KF (Pfeilköpfe). Die Bildung von KFP in der Zellperipherie wurde gestoppt (siehe Film 21). (B, B', B'') In MT5K14-26 Zellen führte die Inkubation mit SB202190 (100  $\mu$ M) zu einem Stopp der Granulabildung in der Peripherie (B, vergrößerter Ausschnitt in B'') und zu einer Stabilisierung der bestehenden Granula (siehe Film 20). Nach Auswaschen des Inhibitors entstehen neue Granula in der Zellperipherie. Größenbalken: 10  $\mu$ m in A, A'', B, B''; 5  $\mu$ m in B''.

außerdem den Schluss zu, dass weder durch den SB202190 Inhibitor noch durch die Inaktivierung von p38 die Bildung von Aktinfilamenten gestört wurde. Dies wird außerdem durch die Beobachtung gestützt, dass im peripheren Bereich des konzentrierten Keratinnetzwerks Stressfasern gebildet werden (Abb. 3.39 A'; Pfeilköpfe).

Um diese Beobachtungen zu stützen, wurden die gleichen Versuche mit MT5K14-26 Zellen, die das mutierte Keratin K14<sub>R125C</sub> exprimieren, wiederholt. Ein Vorteil dieser Zellen ist die hervorragende Detektierbarkeit und der schnelle Turn-Over der Keratingranula. Sofort nach Zugabe von SB202190 (100 µM) kam es auch hier zum Stillstand der Keratingranulabildung in der Zellperipherie (Abb. 3.39 B-B''; Film 20). Die Zugabe des Inhibitors beeinflusste nicht das *Ruffling* des peripheren Zytoplasmas und hatte somit keine Auswirkung auf die Aktinfilamente (Film 20). Nach dem Auswaschen des Inhibitors bildeten sich neue Keratingranula in der Zellperipherie. Der Effekt ist somit reversibel. Ein weiterer Effekt der p38-Inhibition ist die Stabilisierung der gebildeten Keratingranula. Obwohl keine neuen Keratingranula mehr in der Peripherie der MT5K14-26 Zellen gebildet wurden, fanden sich auch nach längerer Inkubationszeit mit dem Inhibitor noch Granula (Abb. 3.39 B), die in unbehandelten Zellen bereits abgebaut worden wären (HWZ ca. 15 min; Werner *et al.*, 2004) (Film 21 und 22). p38 spielt somit nicht nur bei der Neubildung der Keratinvorläufer eine wichtige Rolle, sondern beeinflusst auch ihren Abbau.



## 4. Diskussion

### 4.1 Entstehung und Motilität der KFP

#### Ein neues Modell für den Keratin-Turn-Over

Im ersten Teil der Arbeit wurden die Entstehung und Motilität von Keratinfilamenten in Interphasezellen untersucht. Durch die stabile Expression von fluoreszenzmarkierten Keratinen und mit Hilfe von Fluoreszenz-Zeitrafferaufnahmen lebender Zellen war es erstmals möglich, direkt die Entstehung und die Dynamik von Keratinfilamenten bzw. Keratinfilamentvorläufern (KFP) zu beobachten und zu dokumentieren. Zudem konnte durch die Analyse der gewonnenen Daten ein neues Modell des Keratin-Turn-Over in epithelialen und nicht-epithelialen Zellen entwickelt werden. Danach entstehen die Keratinfilamente aus kurzen KFP, die in der Peripherie der Zellen gebildet werden. KFP entwickeln sich aus Keratinpartikeln, die unmittelbar unterhalb der Plasmamembran generiert werden und sich in Richtung des Zellzentrums bewegen. Zuerst sind sie als kugelförmige Partikel zu erkennen, die im Zuge der weiteren Einwärtsbewegung elongieren und auf diese Weise die kurzen KFP bilden. Diese nehmen weiterhin an Länge zu und fusionieren miteinander an ihren Enden. Auf diese Weise entwickeln sich bis zum Erreichen des peripheren Keratinnetzwerks längere Filamentstücke, die über ihre Enden in das periphere Netzwerk inserieren (siehe Abb. 3.4; 3.5; 3.7).

Im Gegensatz zu diesem Modell wurde vor einiger Zeit postuliert, dass der Keratin-Turn-Over in erster Linie über einen lateralen Austausch von Untereinheiten entlang der gesamten Filamentlänge und ohne topologische Präferenzen stattfindet (Miller *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1993; Yoon *et al.*, 2001; Helfand *et al.*, 2003b). Gestützt wurde diese Ansicht weiterhin durch Untersuchungen an nicht-epithelialen Zellen, die ektopisch Keratinfilamente exprimieren (Kreis *et al.*, 1983), und durch Beobachtungen des Vimentin Systems der Zellen (Vikstrom *et al.*, 1989; Ngai *et al.*, 1990; Sarria *et al.*, 1990; Coleman und Lazarides, 1992; Vikstrom *et al.*, 1992). Ein Großteil dieser Ergebnisse geht jedoch lediglich auf indirekte Beobachtungen der IF-Dynamik zurück. So wurden beispielsweise fluoreszenzmarkierte IF-Proteine bzw. für markierte IF-Proteine kodierende mRNA- und cDNA-Sequenzen durch Mikroinjektion und Transfektion in Zellen eingebracht. Anschließend wurde die Integration dieser markierten IF-Proteine in bereits bestehende Filamente untersucht. Dabei zeigte sich, dass die markierten IF-Proteinen in das bestehende Netzwerk der Zellen integriert wurden. Diese Integration beschränkte sich jedoch nicht auf bestimmte Bereiche des Zytoplasma, sondern fand vielmehr

entlang der gesamten IF statt. Ein Nachteil dieser Versuche ist die große Menge an markiertem IF-Protein, das in die Zellen transferiert wurde. Es ist durchaus denkbar, dass diese „Überflutung“ der Zellen mit IF-Proteinen zu verfälschten Ergebnissen bei der Untersuchung der IF-Dynamik führt. In dieser Arbeit wurden daher für die Untersuchungen der Keratin-Dynamik hauptsächlich stabil transfizierte Zelllinien verwendet. Im Gegensatz zu transient transfizierten Zellen, wird in diesen Zelllinien eine wesentlich geringere Menge an fluoreszenzmarkiertem IF-Proteinen hergestellt (<20%; Windoffer *et al.*, 2004). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass diese geringe Expression der fluoreszenzmarkierten Keratine keinen Einfluss auf das bestehende Netzwerk der Zellen hat (Windoffer und Leube, 1999). Ein konzeptioneller Nachteil des lateralen Austauschmodells ist die mangelnde Aussagekraft bezüglich der Neubildung von Filamenten. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass lediglich Interphase-Zellen untersucht wurden, die bereits ein ausgeprägtes Netzwerk vorzuweisen hatten. Dieses Netzwerk befindet sich in einer Art Gleichgewichtszustand, in dem die Neubildung der Keratinfilamente in der Zellperipherie nur schwer zu detektieren ist. Dennoch ist es schwer nachvollziehbar, weshalb das Modell des lateralen Austauschs keine Erklärung für die Neubildung der Filamente anbietet, da eine solche Neubildung beispielsweise auch nach der Mitose von Zellen beobachtet werden kann (Windoffer und Leube, 2001). Zu Beginn der Zellteilung wird in diesen Zellen das gesamte Keratinnetzwerk zu Keratingranula abgebaut. Es befindet sich somit nicht mehr in einem Gleichgewichtszustand, der ausschließlich dem Erhalt des bestehenden Netzwerks dient, sondern muss vielmehr vollständig neu generiert werden. Nach Abschluss der Mitose findet die Neubildung des Keratinnetzwerks aus den peripheren Keratingranula statt (Windoffer und Leube, 2001). Dieser Aufbau eines neuen Netzwerks erfolgt somit, ähnlich wie es in dieser Arbeit für die Neubildung von Keratinfilamenten aus KFP beschrieben wurde, exklusiv aus der Zellperipherie und stützt das hier vorgestellte Modell des Keratin-Turn-Over.

Auch in anderen Situationen, in denen das Gleichgewicht des Keratinfilamentnetzwerkes gestört ist, finden sich Hinweise darauf, dass der Entstehungsort der Keratinfilamente in der Zellperipherie lokalisiert ist. So konnte gezeigt werden, dass in Epithelzellen, in denen das Keratinnetzwerk durch Inkubation mit dem Phosphatase-Inhibitor OV zerstört wurde (siehe Abb. 3.2), sowie in Zellen, die dominant-negative Keratinmutanten exprimieren (Werner *et al.*, 2004), eine Neubildung von Keratinpartikeln nur in der Zellperipherie stattfindet.

Aber auch in Zellen, die ein intaktes Keratinnetzwerk aufweisen, konnte der Keratin-Turn-Over in Form von Filamentneubildungen detektiert werden. Mit Hilfe von FRAP-Analysen konnte in unbehandelten Interphase-Zellen gezeigt werden, dass die Keratin-Fluoreszenz

zuerst in der Zellperipherie regeneriert wurde. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass in diesem Zellbereich die Neubildung des Keratinnetzwerks aus löslichen Untereinheiten stattfindet. Des Weiteren konnte in zunächst Keratinfilament-freien Bereichen der Zellen, wie beispielsweise in neu gebildeten Lamellipodien, ebenfalls eine Neubildung von Keratinfilamenten ausgehend von der Zellperipherie beobachtet werden (siehe Abb. 3.6). Fasst man diese Ergebnisse zusammen, so kann man postulieren, dass das Modell des lateralen Austauschs der Keratine lediglich für den Erhalt bereits vollständig ausgebildeter Keratinfilamente gültig ist, nicht für die Neubildung von Filamenten. Diese Neubildung geht vielmehr von der Zellperipherie aus und wird durch den hier erstmals beschriebenen Turn-Over vermittelt. Der laterale Austausch von Keratinuntereinheiten könnte möglicherweise beim Erhalt der „reifen“, zentralen Keratinfilamente eine Rolle spielen und durch den Austausch „verbrauchter“ Keratine die Halbwertszeit dieser Keratinfilamente erhöhen.

##### Entstehung der Keratinfilamentvorläufer

Aus welchen Strukturen die frühesten, unmittelbar unterhalb der Zellmembran detektierten Keratinpartikel bestehen, lässt sich nicht mit den in dieser Arbeit verwendeten fluoreszenzmikroskopischen Techniken klären. Die Auflösung der gezeigten Aufnahmen erreicht lediglich eine Pixelgröße von 100 x 100 nm. Damit ist sie nicht ausreichend, um zu klären, ob die *in vitro* beobachteten *unit length filaments* (ULF), die nur 60 nm groß sind, auch *in vivo* vorkommen und inwieweit sie an dem Aufbau der Keratinfilamente beteiligt sind. Ein diesbezüglicher Vorschlag, der sich aus *in vitro* Studien ableitet, sieht die ULFs als Grundeinheiten der Keratinfilamente, die durch eine longitudinale Fusion zu Poly-ULFs und schließlich zu Keratinfilamenten heranreifen (Herrmann *et al.*, 2002; Strelkov *et al.*, 2003).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Entstehung der KFP selektiv in der Zellperipherie stattfindet. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass sich in diesem distinkten Bereich spezifische Nukleationsfaktoren befinden müssen, die für die Entstehung der KFP essentiell sind. Um welche Faktoren es sich hierbei handelt, ist bisher ungeklärt. Es ist allerdings unwahrscheinlich, dass Desmosomen diese Funktion übernehmen, da auch in Zellen, in denen Desmosomen deletiert wurden und in nicht-epithelialen, endogen IF-freien Zellen (SW13; siehe Abb.3.4; 3.5) weiterhin eine Neubildung von KFP detektiert werden konnte (Windoffer *et al.*, 2004).

Ein potentieller Kandidat für die Rolle des Initiationsfaktors könnte hingegen Plektin sein. Es ist bekannt, dass Plektin im Zellkortex angereichert vorliegt (Eger *et al.*, 1997; Strnad *et al.*, 2002) und mit Keratingranula kolokalisiert, aus denen neue Keratinfilamente hervorgehen (Strnad *et al.*, 2002).



Des Weiteren könnten, wie von Weber und Bement (2002) vorgeschlagen, dynamische Polymerisationsplattformen in der Zellperipherie existieren, die unter anderem F-Aktin enthalten und für die Nukleation der Keratinfilamente verantwortlich sind. Näheres zu einer möglichen Beteiligung von Aktin an der Entstehung der Keratinfilamente wird weiter unten in dieser Arbeit diskutiert.

##### Wachstum und Elongation der KFP

Neben der Identifizierung der Zellperipherie als Entstehungsort der Keratinfilamente konnte in dieser Arbeit auch erstmals das Wachstum und die Entwicklung der KFP in Interphasezellen dokumentiert werden. Das Wachstum der Keratinpartikel konnte dabei in zwei Phasen, die beide simultan zu der einwärts gerichteten Bewegung der Partikel stattfinden, unterteilt werden (siehe Abb. 3.4).

Während der ersten, initialen Phase des KFP-Wachstums vergrößert sich der Umfang der zunächst punktförmig erscheinenden Keratinpartikel. Dadurch entsteht ein kugelförmiger Keratinpartikel, der im Laufe der Einwärtsbewegung zusehends an Umfang zunimmt (siehe Abb. 3.4 B). In der darauf folgenden zweiten Phase wird dieses Größenwachstum eingestellt und durch eine kontinuierliche und gleichmäßige Elongation der Keratinpartikel ersetzt. Sie erfolgt höchst wahrscheinlich durch das Anlagern von Keratinuntereinheiten an den Enden der KFP. Mit Hilfe dieser Enden ist es den KFP außerdem möglich, mit anderen KFP zu fusionieren und dadurch größere Filamentstücke zu bilden. Die KFP erreichen durch diese Wachstumsprozesse bis zu ihrem Einbau in das periphere Netzwerk ein Vielfaches ihrer ursprünglichen Größe (siehe Abb. 3.4; 3.5; 3.7).

Sowohl die Initiation der ersten Phase wie auch der Übergang zwischen den beiden Wachstumsphasen wird offensichtlich durch bisher unbekannte Mechanismen reguliert. So entstehen beispielsweise in der Peripherie mitotischer Zellen keine KFP, was darauf schließen lässt, dass die KFP-Bildung für den Zeitraum der Zellteilung inhibiert wird (Windoffer und Leube, 1999; Windoffer und Leube, 2001). Hingegen wurden in Zellen, deren Keratinnetzwerk durch die Inkubation mit OV (Strnad *et al.*, 2002) oder durch die Expression dominant-negativer Mutanten zerstört wurde (Werner *et al.*, 2004), weiterhin Keratinpartikel-Neubildung in der Zellperipherie detektiert. In der Entwicklung dieser Partikel fehlte allerdings der Übergang zur zweiten Phase des KFP-Wachstums. Dadurch kommt es in den entsprechend behandelten Zellen zur Entstehung stark vergrößerter, kugelförmiger Keratinpartikel bzw. Keratingranula (siehe Abb. 3.2), aus denen wiederum keine Keratinfilamente hervorgehen. Welche Faktoren diese Regulation des KFP Wachstums vermitteln, ist bisher noch ungeklärt. Da es sich bei den entstehenden Keratingranula jedoch um stark phos-

phorylierte Strukturen handelt, ist nicht auszuschließen, dass Kinasen an ihrer Entstehung beteiligt sind (siehe unten).

##### Integration der KFP in das bestehende Keratinnetzwerk

Da Keratinfilamente unpolare Strukturen sind, die weder einen distinkten Anfang, noch ein distinktes Ende aufweisen, war bisher unklar, wie neu gebildete Keratinfilamente in das Netzwerk integriert werden können, ohne die Kontinuität und dadurch möglicherweise die Stabilität des gesamten Netzwerks zu stören. Aus dem gleichen Grund war es bisher auch nur schwer vorstellbar, wie die Entstehung neuer Keratinfilamente auf distinkte Bereiche der Zelle beschränkt sein könnte. Mit Hilfe von Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen wurde in dieser Arbeit erstmals anhand der KFP gezeigt, wie eine solche Integration in das intakte Keratinnetzwerk lebender Zellen erfolgt.

Die Enden der KFP sind nicht nur für das Anlagern von Keratinuntereinheiten und damit für das Wachstum der KFP essentiell. Wie bereits erwähnt, spielen sie auch eine wichtige Rolle bei der Fusion der KFP zu größeren Filamentstücken. Erreichen diese Filamentvorläufer den Bereich des peripheren Keratinnetzwerks, lagern sie sich parallel an bestehende Keratinfilamente an. Mit Hilfe ihrer Enden sind sie dann in der Lage, mit den vorhandenen Keratinfilamenten zu fusionieren ohne dabei die Integrität der Filamente zu stören. Der genaue Mechanismus dieses Fusionsprozesses und die Ursache für die Beschränkung der Fusionskompetenz auf die Enden der KFP sind bisher noch ungeklärt. Nach der Integration der KFP in das periphere Keratinnetzwerk werden die neu entstandenen Keratinfilamente weiter in Richtung des Zellzentrums transportiert. Dabei findet offensichtlich eine „Reifung“ der Keratinfilamente statt. Je weiter die Keratinfilamente in Richtung des Zellzentrums transportiert werden, desto stärker gewinnen sie an Umfang (siehe Abb. 3.5). Wie es zu dieser Verdickung der zentralen Keratinfilamente kommt, ist noch ungewiss. Möglicherweise entstehen die dicken Keratinfilamente durch die Fusion einzelner Keratinfilamente oder durch die laterale Anlagerung von löslichen Keratinuntereinheiten.

Die KFP sind jedoch nicht nur in der Lage, in bereits bestehende Keratinnetzwerke zu integrieren. Im Anschluss an die Mitose entstehen aus den peripheren Keratingranula KFP-ähnliche Strukturen. Aus diesen Vorläufern entsteht durch Fusion der einzelnen Komponenten und durch ihren kontinuierlichen einwärts gerichteten Transport ein neues Keratinnetzwerk (Windoffer und Leube, 2001).

Der Aufbau eines solchen Keratinnetzwerks kann beispielsweise durch die Expression dominant-negativer Keratinmutanten (Werner *et al.*, 2004) oder durch eine Inkubation mit OV (siehe Abb. 3.2) verhindert werden. Es kommt dadurch zu einer Störung der „KFP-Ent-

wicklung“ und zur Bildung von Keratingranula. Obwohl diese Keratingranula in der Lage sind miteinander zu fusionieren, entstehen in diesen Zellen keine Filamente und somit auch kein Keratinnetzwerk. Vielmehr werden die Keratingranula nach dem Erreichen einer distinkten Zone in der Zellperipherie, welche möglicherweise der Integrationszone der KFP entspricht, schnell abgebaut (siehe Abb. 3.2). Dies zeigt, dass die Generierung intakter KFP essentiell ist für die Bildung und den Erhalt eines intakten Keratinfilamentnetzwerks.

## **4.2 Einfluss von Aktinfilamenten und MT auf die Dynamik des Keratinnetzwerks**

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Beteiligung von Aktinfilamenten und Mikrotubuli an der Dynamik des Keratinnetzwerks untersucht. Bisherige Untersuchungen, die sich mit diesem Thema befassten, kamen zu unterschiedlichsten, teilweise widersprüchlichen Ergebnissen (siehe Kapitel 1.1.4). Mit Hilfe der in dieser Arbeit etablierten SK8/18-2 Zelllinie wurde die Beteiligung der Aktinfilamente und des Mikrotubulussystems an der Dynamik des Keratinnetzwerks ermittelt. Hierfür wurden sowohl die MT als auch die Aktinfilamente gezielt durch Drogen zerstört und die Auswirkungen dieser Zerstörung auf die Dynamik der Keratinfilamente untersucht. Zusätzlich lieferten die Untersuchungen im ersten Teil dieser Arbeit wertvolle Hinweise auf die Beteiligung der Aktinfilamente und MT an der Organisation des Keratinnetzwerks.

So konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Entstehung der KFP auf einen distinkten Bereich der Zellperipherie beschränkt ist, in dem auch Aktin stark angereichert vorliegt. Bemerkenswert ist, dass Aktin essentiell für die Bildung von Lamellipodien ist. Bereits sehr früh in der Entstehung der Lamellipodien werden in diesen Strukturen KFP generiert, die sich mit einer Geschwindigkeit einwärts bewegen, die in etwa der Geschwindigkeit des Aktinfilamentaufbaus (*Treadmilling*) entspricht (Theriot, 1997; Carlier, 1998; Vaezi *et al.*, 2002; Pollard und Borisy, 2003; Marcy *et al.*, 2004).

Aber auch für die Beteiligung von Mikrotubuli an Transportvorgängen und an der Dynamik der KFP fanden sich Hinweise. Mit Hilfe von Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen axonartiger Zellausläufer konnte eine zusätzliche Art des KFP Transports detektiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die in den axonartigen Ausläufern detektierten KFP nicht kontinuierlich und langsam, sondern vielmehr, wie es für einen MT abhängigen Transport typisch ist, saltatorisch und schnell transportiert werden. Dieser Transport ist höchst wahrscheinlich übereinstimmend mit dem Transport, der bereits für die kleinen Keratinpartikel in epithelialen Zellen beschrieben wurde (Liovic *et al.*, 2003).

##### Mikrotubulus-abhängiger Transport der KFP

Ausgehend von diesen Beobachtungen wurden durch weitere Versuche zahlreiche Hinweise, die für einen MT-abhängigen Transport der KFP sprechen, gefunden. So konnte gezeigt werden, dass die Transportgeschwindigkeit der KFP in den axonartigen Ausläufern der SK8/18-2 Zellen mit 9,7 und 16,9  $\mu\text{m}/\text{min}$  in der gleichen Größenordnung liegt, die für MT-assoziierte Motorprotein-abhängige Transportvorgänge (Hirokawa, 1998) und für andere schnell transportierte IF-Partikel (Wang und Brown, 2001; Helfand *et al.*, 2004) beschrieben wurde. Auch die Diskontinuität des KFP-Transportes, der durch lange stationäre Phasen unterbrochen wurde (siehe Film 10; Abb. 3.13), spricht für eine Beteiligung von MT-assoziierten Motorproteinen. Diese wohlbekannteste Charakteristik von MT-abhängigen Transporten wurde zudem bereits für den MT-vermittelten Transport von Vimentin-, Peripherin- und Neurofilament-Partikeln beschrieben (Wang *et al.*, 2000; Wang und Brown, 2001; Yabe *et al.*, 2001; Helfand *et al.*, 2004).

Hinzu kommt, dass die beobachteten Transportvorgänge bidirektional sowohl in Richtung des Zellkerns, als auch in entgegengesetzter Richtung stattfanden (siehe Abb. 3.8). Hierbei dominierte jedoch klar der Transport in Richtung des Zellzentrums. Dieses Transportmuster konnte auch bei MT-abhängigen Transporten anderer IF-Proteine beobachtet werden (Martys *et al.*, 1999; Roy *et al.*, 2000; Shah *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Helfand *et al.*, 2002; Helfand *et al.*, 2003a; Helfand *et al.*, 2003b; Helfand *et al.*, 2004). Die Inkubation der Zellen mit dem Aktinfilament-Inhibitor Latrunculin B hatte hingegen keinen Einfluss auf die Motilität dieser schnell transportierten KFP. Im Gegenteil, durch das Zerstören der Aktinfilamente konnten diese schnellen, diskontinuierlichen KFP-Transportvorgänge in der gesamten Zellperipherie besser detektiert werden (siehe Film 15, Abb. 3.13). Die Inkubation mit der MT-zerstörenden Droge Nocodazol führte hingegen zu einem sofortigen Stopp der beschriebenen Transportvorgänge (Abb. 3.16 A; Film 17).

Eine weitere Auswirkung der Nocodazol-Inkubation der Zellen zeigte sich anhand von Zeitrafferaufnahmen behandelter Zellen. Durch das Zerstören der MT kommt es nicht nur zu einem Stopp der MT-abhängigen Transportvorgänge, auch die Oszillation des Keratinnetzwerks wird deutlich verlangsamt (Windoffer und Leube, 1999). Möglicherweise hat das MT-System somit auch eine Bedeutung für die Stabilität des gesamten Keratinnetzwerks. So könnte beispielsweise durch eine antagonistische Wirkung von Dynein und Kinesin-Motoren eine Grundspannung des Keratinnetzwerks erreicht werden, in dem die Keratinfilamente durch zahlreiche Interaktionen mit diesen Motoren „aufgespannt“ werden. Dementsprechend führte die Inkubation der Zellen mit Nocodazol auch zu einem Kollaps des

Netzwerks um den Nukleus (siehe Film 16; Abb. 3.10 und 3.11). Die MT haben somit nicht nur Einfluss auf den Transport der KFP, sondern auch auf die Stabilität und Motilität des gesamten Keratinnetzwerks.

##### Aktin-abhängiger Transport der KFP

Die Versuche in dieser Arbeit lieferten weiterhin zahlreiche Beweise für die Beteiligung von Aktin am Transport der KFP. Dieser Aktin-abhängige Transport lässt sich deutlich von den MT-vermittelten Transportvorgängen abgrenzen. So konnte gezeigt werden, dass der Aktin-abhängige Transport um zwei Größenordnungen langsamer ist als der MT-vermittelte Transport (Abb. 3.18). Er findet kontinuierlich, ohne Unterbrechung durch stationäre Phasen statt und ist strikt unidirektional in Richtung des Zellzentrums gerichtet. Des Weiteren ist dieser KFP-Transport nicht durch Inkubation mit Nocodazol und somit durch einen Abbau der MT beeinflussbar (Abb. 3.15; Film 16). Die Inkubation der Zellen mit Latrunculin B hingegen führt zu einem Stopp der kontinuierlichen KFP-Bewegung in der Zellperipherie (Abb. 3.13; Film 14 und 15). Zeitrafferaufnahmen von Lamellipodien lebender Zellen zeigten, dass in diesen aktinreichen Strukturen ein Transport der KFP entlang von Aktinstressfasern stattfindet (Abb. 3.11; Film 13). Die Geschwindigkeit dieses Transportes weist jedoch daraufhin, dass es sich wahrscheinlich nicht um Motorprotein vermittelte Transportvorgänge handelt, wenngleich in anderen Studien Assoziationen zwischen Neurofilamenten und Myosin Va detektiert werden konnten (Rao *et al.*, 2002), die für einen Aktin-vermittelten Transport sprechen würden. Wahrscheinlicher ist die Möglichkeit, dass der Aktin-abhängige Transport der KFP mit dem „Aktin-Treadmilling“ bzw. mit dem Aufbau der Aktinfilamente gekoppelt ist. Dafür spricht unter anderem, dass die Transportgeschwindigkeit der KFP in etwa der Geschwindigkeit des Aktin-Treadmilling entspricht (Theriot, 1997; Carlier, 1998; Vaezi *et al.*, 2002; Pollard und Borisy, 2003; Marcy *et al.*, 2004). Diese Vermutung wird durch *in vitro* Beobachtungen bestärkt. Diese zeigen, dass F-Aktin als Plattform für die Keratinorganisation dienen kann, sich in *Xenopus* Oocyten Extrakten zusammen mit Keratinpartikeln bewegt und dass ein Zerstören des F-Aktin zu einer gestörten Keratinorganisation führt (Weber und Bement, 2002). Auch für Zellen, die Keratin-Mutanten exprimieren (Werner *et al.*, 2004), konnte ein Zusammenhang zwischen Aktinfilamenten und der Motilität der Keratingranula gezeigt werden. Das Zerstören der Aktinfilamente führte auch in diesen Zellen zu einem Stopp der Einwärtsbewegung der Keratinpartikel. Außerdem wurde durch die Latrunculin-Inkubation dieser Zellen, im Gegensatz zu der Inkubation in SK8/18-2 Zellen, die Neubildung der Keratingranula in der Zellperipherie gestoppt.

Fasst man diese Beobachtungen zusammen und bedenkt, dass sowohl Aktinfilamente, als

auch KFP in der Zellperipherie generiert werden und dort gemeinsam lokalisiert sind (Abb. 3.11), liegt der Schluss nahe, dass die Nukleation der Aktinfilamente und der KFP möglicherweise an die gleichen Strukturen gekoppelt sind. Nahe liegende Kandidaten für eine solche gemeinsame Nukleationsplattform könnten die fokalen Kontakte sein (Windoffer *et al.*, 2006). Diese Strukturen finden sich ebenfalls in der Zellperipherie und in Lamellipodien (Wehrle-Haller und Imhof, 2003). Sie dienen unter anderem als Verankerungspunkte für Aktin-Stressfasern (Hotulainen und Lappalainen, 2006). Mit Hilfe von Zeitrafferaufnahmen der Lamellipodien konnte gezeigt werden, dass KFP entlang dieser Stressfasern transportiert werden (Abb. 3.11; Film 13).

#### Beteiligung von Aktinfilamenten und Mikrotubuli an der Organisation des Keratinnetzwerks

Fasst man die Ergebnisse und Beobachtungen der KFP-Entstehung und Keratinnetzwerkorganisation zusammen, so kann man folgendes Modell ableiten:

Im aktinreichen Kortex der Zellen findet die Bildung der KFP statt. Die Entstehung der Keratinpartikel ist dabei abhängig von Faktoren, die möglicherweise an fokalen Kontakten assoziiert sind und ebenfalls an der Nukleation von Aktinfilamenten beteiligt sind. Die KFP werden anschließend in Richtung des Zellzentrums transportiert. Dieser Transport ist abhängig von Aktinfilamenten und erfolgt in Lamellipodien entlang von Aktinstreßfasern. Während des Transportes bleiben die KFP polymerisationskompetent, wodurch sie in der Lage sind, weiterhin an Größe zu zunehmen. Zusätzlich dazu können sie miteinander fusionieren und dadurch längere Filamentstücke bilden. Nach dem Erreichen des peripheren Netzwerks werden die KFP dann durch Fusion mit ihren Enden in das bestehende Netzwerk integriert.

An einem distinkten Punkt dieses Transports werden die KFP von den Aktinfilamenten an die MT übergeben. Ein solcher Mechanismus der Keratinpartikel-Abkoppelung wurde bereits *in vitro* beschrieben (Weber und Bement, 2002) und könnte auch *in vivo* eine Rolle für die Keratinfilamentbildung spielen. Außerdem konnte für Zellen, die EBS-Keratin-Mutanten exprimieren, gezeigt werden, dass diese Keratinpartikel generieren, die wiederum bis zu einer distinkten Zone Aktin-abhängig transportiert werden, offensichtlich aber nicht mit den MT assoziieren (Werner *et al.*, 2004). Diese Partikel sind nicht in der Lage KFP zu bilden wodurch es der Zelle auch nicht möglich ist, ein intaktes Keratinnetzwerk aufzubauen. Sie werden nach dem Erreichen einer distinkten Zone schnell abgebaut. Die Beschränkung dieser mit Aktin, aber nicht mit MT assoziierten Keratingranula auf einen distinkten, peripheren Zellbereich könnte einen Hinweis auf eine Übergabe der KFP von den Aktinfilamenten auf die MT sein. Diese Übergabe würde dementsprechend in der Region stattfinden, in der die

Keratingranula aufgelöst werden und der Aktinkortex der Zellperipherie endet. Offensichtlich ist diese Übergabe wichtig für die Integration der KFP in das Keratinnetzwerk, möglicherweise um den MT zu erlauben, das Netzwerk über die gesamte Zelle zu verteilen und wie bereits beschrieben „aufzuspannen“.

#### KFP-ähnliche Strukturen in anderen IF-Systemen

Die in dieser Arbeit beschriebenen KFP entsprechen wahrscheinlich den in anderen Arbeiten als „Squiggles“ beschriebenen Strukturen (Yoon *et al.*, 2001). Auch für andere IF-Proteine wie beispielsweise Peripherin, Vimentin und Neurofilament wurden bereits solche kurzen IF-Stücke beschrieben, die MT-vermittelt in der Zelle transportiert werden (Pahlad *et al.*, 1998; Roy *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Wang und Brown, 2001; Helfand *et al.*, 2003b). Bisher wurde angenommen, dass sich die Keratin-Squiggles/KFP von den Peripherin-, Vimentin- und Neurofilament-Squiggles unterscheiden (Yoon *et al.*, 2001). Dies wurde mit dem wesentlich langsameren und in die entgegengesetzte Richtung erfolgenden, kontinuierlichen Transport der Keratin-Squiggles begründet. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass zusätzlich zu dieser Transportform noch eine weitere MT-abhängige Art des Keratin-Squiggles/KFP-Transportes existiert. Ähnlich wie der Transport der Peripherin-, Vimentin- und Neurofilament-Squiggles erfolgt dieser Transport teilweise bidirektional, ist diskontinuierlich und um Größenordnungen schneller als die zuvor beschriebene Transportform.

### **4.3 p38 als Regulator der Keratinnetzwerkorganisation**

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, durch welche Regulationsmechanismen der Auf- und Abbau der Keratinfilamente und die Organisation des Keratinnetzwerks vermittelt werden. Durch den Nachweis einer engen zeitlichen und räumlichen Korrelation zwischen der Aktivierung der p38 MAPK, ihrer Rekrutierung an die Keratinfilamente, der Keratinphosphorylierung an p38<sup>P</sup>-spezifischen Phosphorylierungsstellen und dem Abbau der Keratinfilamente zu Keratingranula konnte die p38 MAPK als Hauptregulator dieser Vorgänge identifiziert werden. Diese Abfolge von Ereignissen konnte sowohl in physiologischen Situationen der Keratinreorganisation, wie beispielsweise in der Mitose, als auch in Stresssituationen (Hyper-, Hypo- und Hitzestress) und in Zellen, die mutierte Keratine exprimieren (EBS-Mutanten), beobachtet werden.

Des Weiteren konnte durch pharmakologische und gentechnische Ansätze gezielt die Aktivität der p38 MAPK beeinflusst werden. Eine gesteigerte Aktivität führte dabei zur

Induktion von Keratingranula (Abb. 3.38), wohingegen die Inhibierung der p38 Aktivität das Entstehen von OV-induzierten Keratingranula verhindern konnte (Abb. 3.36 und 3.37).

Die Geschwindigkeit und Reversibilität der durch die p38 Aktivität gesteuerten Prozesse zeigen, dass diese Form der Regulation des Keratinnetzwerks auch für schnelle transiente Anpassungen der Zellen *in vivo* in Frage kommt. Solche transienten Modulationen des Keratinnetzwerks der Zellen sind unter anderem als Reaktion auf verschiedenste Formen von Stress notwendig. Tatsächlich konnte in epithelialen Zellen eine solche, innerhalb von wenigen Minuten stattfindende, stressbedingte Aktivierung der p38 MAPK beobachtet werden. Unter anderem konnte p38 durch die Applikation von physiologisch relevanten Formen von Stress, wie beispielsweise mechanischen Druck (Hofmann, M. *et al.*, 2004), osmotischen Schock (Garmyn *et al.*, 2001; Cheng, H. *et al.*, 2002) und UV-Strahlung (Chen und Bowden, 1999), aktiviert werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass in Keratinocyten als Reaktion auf eine Verwundung die Expression von p38 induziert wird (Harper *et al.*, 2005). Des Weiteren wurde festgestellt, dass die Aktivierung der p38 MAPK essentiell für das Auswachsen von Keratinocyten aus menschlichen Hautexplantaten und für die Migration von Keratinocyten ist (Klekotka *et al.*, 2001; Bakin *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2003; Stoll *et al.*, 2003). Auch in anderen Zellen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der p38 MAPK zu einer erhöhten Migrationsaktivität führt. Die Inhibition der p38 MAPK führt im Gegensatz dazu zu einem Stopp dieser Migration (Hedges *et al.*, 1999). In Anbetracht der in dieser Arbeit vorgestellten Daten, die zeigen, dass p38 der Hauptregulator der Keratinnetzwerkorganisation ist, kann man annehmen, dass die Aktivierung der p38 MAPK in den Zellen verletzter Gewebe eine Anpassung des Keratinnetzwerks ermöglicht und es dadurch den Zellen erlaubt, durch verstärkte Migration die Wundheilung zu beschleunigen. Darüber hinaus wurden auch für andere Intermediärfilamente Veränderungen in der Verteilung der entsprechenden IF-Proteine in Abhängigkeit von einer gesteigerten p38 Phosphorylierung berichtet. So führt die Aktivierung der p38 MAPK zu einer gesteigerten Phosphorylierung von Neurofilamenten in Nervenzellen, was zu einer Akkumulation dieser Proteine in den Zellen führt (Ackerley *et al.*, 2004). Auch Vimentin kann durch die aktivierte p38 MAPK phosphoryliert werden. Allerdings erfolgt diese Phosphorylierung indirekt, über einen zwischengeschalteten *Downstream*-Effektor, der *MAPK-activated protein kinase-2* (MAPKAPK-2) (Cheng, T. J. und Lai, 1998). Zusammengenommen existieren eine Vielzahl von Hinweisen, die zeigen, dass die Aktivierung der p38 MAPK eine zentrale Rolle bei der Regulation der epithelialen Plastizität spielt. Diese Funktion der p38 MAPK, die sich vor allem durch ihre kurzfristigen Auswirkungen auf die Zellen auszeichnet, muss jedoch klar von



längerfristigen Auswirkungen einer p38 Aktivierung abgegrenzt werden. Wie bereits in zahlreichen Untersuchungen gezeigt werden konnte, kann eine solche längerfristige Aktivierung der p38 MAPK die Differenzierung der Zellen beeinflussen und zur Induktion der Apoptose beitragen (Eckert, R. L. *et al.*, 2002; Eckert, R. L. *et al.*, 2003; Efimova *et al.*, 2003; Lee, S. K. *et al.*, 2006).

##### Einfluss weiterer MAPK auf die Keratinorganisation

Auch über die Beteiligung anderer MAPK wie beispielsweise der JNK MAPK an der Regulation der Keratindynamik wurde bereits diskutiert. So konnte für JNK eine Assoziation mit Keratin 8 nachgewiesen werden (He *et al.*, 2002). *In vitro* konnte gleichzeitig mit der Phosphorylierung der K8-S73 Phosphorylierungsstelle eine gesteigerte Phosphorylierung der JNK MAPK ermittelt werden (He *et al.*, 2002). Diese Phosphorylierung der JNK MAPK erfolgt, im Gegensatz zu der in dieser Arbeit detektierten schnellen Phosphorylierung der p38 MAPK, allerdings erst nach einigen Stunden. Es ist daher unwahrscheinlich, dass die JNK MAPK an kurzfristigen Keratinnetzwerkreorganisationen, wie sie beispielsweise als Reaktion auf Stress induziert werden, beteiligt ist. Hinzu kommt, dass diese Phosphorylierung der Keratine mit Hilfe einer Stimulation des pro-apoptotischen Cytokinrezeptors Fas/CD95/Apo-1 erfolgte; einem Rezeptor dem starke Apoptose-induzierende Funktionen zugeschrieben werden. (He *et al.*, 2002)

In Zellen, die mutierte Keratine exprimieren (EBS), konnte hingegen eine kurzfristigere Aktivierung der JNK MAPK in Folge von osmotischem Stress nachgewiesen werden (D'Alessandro *et al.*, 2002). Diese Aktivierung der JNK MAPK führte jedoch nicht zu einer direkten Assoziation der Kinase mit den Keratinen oder zu einer Reorganisation des Keratinnetzwerks. Vielmehr kam es zu einer Relokalisierung der JNK in den Nukleus, die wie von den Autoren angenommen wird, zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führt. Gegen eine direkte Beteiligung der JNK MAPK an der Reorganisation des Keratinnetzwerks spricht außerdem, dass in dieser Arbeit keine Assoziation der aktivierten JNK MAPK mit den induzierten Keratingranula festgestellt werden konnte (Abb. 3.28). Auch biochemische Untersuchungen erbrachten keine Hinweise auf eine kurzfristig gesteigerte JNK MAPK Phosphorylierung.

Für die ERK MAPK hingegen konnte in dieser Arbeit ein starker und schneller Anstieg der Phosphorylierung als Reaktion auf die Reorganisation des Keratinnetzwerks durch OV-Behandlung detektiert werden (Abb. 3.27). Diese erhöhte Phosphorylierung erfolgte außerdem in dem gleichen, kurzen Zeitrahmen, in dem auch die Erhöhung der p38 MAPK detektiert werden konnte. Diese Beobachtung könnte für eine Beteiligung der ERK MAPK an

der Reorganisation des Keratinnetzwerks sprechen. Allerdings konnte, wie für die JNK MAPK, auch für die ERK MAPK keine Assoziation mit den Keratinfilamenten bzw. mit den OV-induzierten Keratingranula festgestellt werden (Abb. 3.28). Ein weiterer Punkt, der gegen eine solche Beteiligung der ERK MAPK spricht, ist die Tatsache, dass bisher für diese Kinase nur eine Phosphorylierungsstelle des Keratin 8 bekannt ist (Ku und Omary, 2006). Dabei handelt es sich um K8-S431, eine Phosphorylierungsstelle die, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, durch die Reorganisation des Keratinnetzwerks keine verstärkte Phosphorylierung aufweist.

#### Regulation der Keratindynamik und Keratinorganisation durch Keratinphosphorylierung

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen, unter Einbeziehung zahlreicher anderer Publikationen (Übersicht in (Izawa und Inagaki, 2006; Omary *et al.*, 2006), darauf schließen, dass die Phosphorylierung der hauptsächliche Mechanismus ist, durch den die Organisation des Keratinnetzwerks reguliert wird. Hierbei spielt augenscheinlich die K8-S73 Phosphorylierungsstelle eine wichtige Rolle. Im Gegensatz zu anderen bekannten Phosphorylierungsstellen der Keratine, wie beispielsweise der K8-S431 und der K18-S33 Phosphorylierungsstellen, ist sie nicht konstitutiv phosphoryliert, sondern zeigt vielmehr ein so genanntes *on/off*-Verhalten (Abb. 3.26). In verschiedensten Stresssituation, im Laufe der Mitose, nach OV-Behandlung und während der Apoptose wird sie stark phosphoryliert (Liao *et al.*, 1997; Feng *et al.*, 1999; Ridge *et al.*, 2005), d.h. in Situationen, in denen bekanntermaßen das Keratinnetzwerk starken Reorganisationen unterworfen ist. Das Sequenzmotiv, welches die K8-S73 Stelle umfasst, ist außerdem in den unterschiedlichen Typ II Keratinen sehr stark konserviert (Toivola *et al.*, 2002). In einigen Mitgliedern der Keratin Typ II Familie ist lediglich das Serin gegen ein Threonin ausgetauscht. Auch für dieses Threonin konnte gezeigt werden, dass seine schwache basale Phosphorylierung durch die Inkubation mit Phosphatase-Inhibitoren stark erhöht wird, und dass diese Erhöhung mit einer verstärkten Solubilisierung der Keratine und einer Filamentreorganisation einhergeht (Toivola *et al.*, 2002). Diese Phosphorylierung der Threoninstelle erfolgt unter anderem in K5/6 *in vivo* im Laufe der Mitose (Toivola *et al.*, 2002). Diese starke Konservierung des Sequenzmotivs spricht für eine wichtige und ursprüngliche Funktion der enthaltenen Phosphorylierungsstellen. Eine solche Funktion könnte nach den Ergebnissen dieser Arbeit die Organisation der Keratine zu Keratinfilamenten und der Aufbau eines Keratinnetzwerks sein. Hierfür spricht die Tatsache, dass ein Fehlen der Kopfregion, in der diese Phosphorylierungsstellen lokalisiert sind, den Zusammenbau von verschiedensten IF verhindert (Inagaki *et al.*, 1990; Hatzfeld und Burba, 1994; Gibb *et al.*, 1996; Gohara *et al.*, 2001; Kreplak *et al.*, 2004).

Wie genau die Phosphorylierung der Kopfreion den Aufbau von IF beeinflusst, ist allerdings bisher noch nicht geklärt. Es wird jedoch angenommen, dass durch die Phosphorylierung der Kopfreion der IF und der damit verbundenen Änderung der elektrostatischen Ladung dieser Region eine Konformationsänderung der IF-Proteine induziert wird. Möglicherweise verhindert diese Erhöhung der negativen Ladung der Kopfreion eine Interaktion mit der ebenfalls negativ geladenen zentralen Domäne der IF. Dadurch wiederum könnte es zu einem „Öffnen“ der Filamentstruktur kommen, was beispielsweise den Auf- und Abbau der IF bzw. eine Reorganisation der Keratinfilamente ermöglichen könnte (Kreplak *et al.*, 2004).

Gestützt wird diese Theorie von den in dieser Arbeit beobachteten Phosphorylierungsereignissen. So konnte gezeigt werden, dass eine p38-abhängige Phosphorylierung der Keratine an K8-S73 durch die Expression konstitutiv aktiver MKK3/MKK6 *Upstream-Regulatoren* bzw. durch die Inkubation mit Anisomycin zu einem Abbau der Keratinfilamente und zur Entstehung von Keratingranula führt (Abb. 3.38). Die Inhibition dieser Phosphorylierungsaktivität der p38 MAPK durch gentechnische (shRNA) und pharmakologische (SB202190) Inaktivierung der p38 MAPK hingegen verhinderte den Auf- und Abbau der Keratingranula in EBS-Mutanten Zellen und die Bildung von KFP in der Zellperipherie von Wildtyp-Keratin exprimierenden Zellen (Abb. 3.36, 3.37 und 3.39; Film 20, 21 und 22).

Zusätzlich konnte in Übereinstimmung zu der beschriebenen Theorie, der Abbau des Vimentinnetzwerks zu Beginn der Mitose durch die Expression von Vimentin S55A Mutanten verhindert werden (Chou, Y. H. *et al.*, 1996). Im Gegenzug konnte durch die Expression der konstitutiv aktivierten Neurofilament S55S Mutante, eine Umstrukturierung der IF-Organisation in untersuchten Zellen und in transgenen Mäusen induziert werden (Gibb *et al.*, 1996; Gibb *et al.*, 1998). Die Phosphorylierungsstelle S55 befindet sich in der Kopfreion des Vimentin.

#### Bedeutung der K8-S73 Phosphorylierungsstelle für die Reorganisation der Keratinfilamente

Die Phosphorylierung der Keratine an der Phosphorylierungsstelle K8-S73 scheint offensichtlich eine wichtige Rolle bei der Reorganisation der Keratinfilamente zu spielen. Allerdings konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Phosphorylierung dieser Stelle allein nicht ausreicht, um eine Reorganisation des Keratinnetzwerks zu induzieren (Abb. 3.25). Endogen keratinfreie SW-13 Zellen, die mit WT-K18 + K8-S73D bzw. K8-S73A transfiziert wurden, waren trotzdem in der Lage, ein normales Keratinnetzwerk aufzubauen (siehe auch Ku *et al.*, 2002a). Daher muss angenommen werden, dass multiple Phosphorylierungen für die Induktion von Keratinfilamentreorganisationen notwendig sind.

Ein solcher Mechanismus für die Regulation der Keratinorganisation durch die gleichzeitige Phosphorylierung mehrerer Stellen scheint nahe liegend. Auf diese Weise kann möglicherweise durch die Anzahl und Lokalisierung der beteiligten Phosphorylierungsstellen reguliert werden, inwieweit es nur zu einem Umbau oder zu einem kompletten Abbau der Keratinfilamente kommt. Eine solche Kooperation von verschiedenen Phosphorylierungsstellen konnte für *glial fibrillary acidic protein* (GFAP), dem hauptsächlichen IF der reifen Astrozyten, gezeigt werden (Takemura *et al.*, 2002). Zukünftige Studien müssen zeigen, welche weiteren Phosphorylierungsstellen in der Kopffregion der Keratine existieren und inwiefern die Phosphorylierung dieser Stellen die Organisation des Keratinnetzwerks beeinflusst.

Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Aktivierung von p38 neben den hier beschriebenen direkten Auswirkungen auf die Keratine, auch andere Faktoren in der Zelle beeinflusst, welche wiederum regulatorisch auf die Keratinorganisation wirken können.

So wurde unter anderem für 14-3-3 eine Aktivierung durch den p38-downstream-Effektor *Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2* (MAPKAPK2) beschrieben (Powell *et al.*, 2003). 14-3-3 wiederum ist ein IFAP, dessen Assoziation mit Keratin 8 und 18 bereits vor einiger Zeit nachgewiesen werden konnte (Liao und Omary, 1996; Ku *et al.*, 1998). Ob diese Assoziation der 14-3-3 Proteine die Organisation der Keratinfilamente beeinflusst, ist bisher jedoch nicht geklärt.

#### Rekrutierung der p38 MAPK an Keratinfilamente

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass bereits wenige Sekunden nach der Inkubation der Zellen mit dem Phosphatase-Inhibitor OV, die Phosphorylierung der p38 MAPK stark ansteigt (Abb. 3.26). Dieser Anstieg geht einher mit einer ebenso schnellen Phosphorylierung der Keratine an K8-S73 (Abb. 3.24) und führt zu der beschriebenen Reorganisation der Keratine und zur Entstehung von Keratingranula.

Nach der Induktion der Keratinreorganisation und der Bildung der Keratingranula konnte mit Hilfe der Co-Immunpräzipitationen wider Erwarten keine verstärkte Assoziation der aktivierten p38 MAPK an den Keratinen nachgewiesen werden (Abb. 3.33). Diese Keratingranula sind, wie auch die Keratinfilamente, nur sehr schlecht löslich. Dies führt dazu, dass sie durch eine Co-Immunpräzipitationen nicht mit keratinspezifischen-Antikörpern aus Gesamtzelllysaten isoliert werden können und daher auch nicht die Gesamtmenge an Keratin-assoziierten p38 MAPK bestimmt werden kann.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Menge des im löslichen Pool an Keratinen

assoziierten aktiviertem p38 MAPK nach der Entstehung der Keratingranula stark abgenommen hat (Abb. 3.33). Dies zeigt, dass offensichtlich ein Großteil der p38 MAPK nach ihrer Aktivierung an die Keratinfilamente rekrutiert werden. Durch diese aktivierten p38 MAPK erfolgt dann eine spezifische Phosphorylierung der Keratinfilamente und es kommt zur Bildung der schlecht löslichen Keratingranula. Zusätzlich werden diese Beobachtungen durch vorangegangene Untersuchungen gestützt, in denen gezeigt werden konnte, dass die K8-S73 Phosphorylierungsstelle exklusiv von der p38 MAPK phosphoryliert wird und dass diese Phosphorylierung eine Assoziation mit den p38 MAPK erfordert (Ku *et al.*, 2002a).

#### Das Keratinnetzwerk als Phosphat-Schwamm

In dieser Arbeit wurden die Konsequenzen beschrieben, die eine p38 Rekrutierung auf die Organisation des Keratinfilamentnetzwerks hat. Durch diese Reorganisation des Zytoskelett ist es den Zellen möglich, auf veränderte Umweltbedingungen zu reagieren, beispielsweise um nach einer Verwundung die Migration bzw. Proliferationsgeschwindigkeit zu erhöhen. Ein vor Kurzem postuliertes Modell sieht die Aufgabe der Keratine jedoch vielmehr in einer nicht-mechanischen Protektion der Zellen (Ku und Omary, 2006). Das Keratinnetzwerk soll diesem Modell zufolge als Phosphat-Schwamm wirken, der durch stressaktivierte Kinasen hyperphosphoryliert wird (Ku und Omary, 2006). Diese Hyperphosphorylierung der Keratine dient dazu, eine Aktivierung von pro-apoptischen Signalwegen durch eben diese stressaktivierten Proteinkinasen zu verhindern. Ein ähnliches Modell wurde bereits vor einiger Zeit für Neurofilamente postuliert (Nguyen *et al.*, 2001). Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen dieses Modell jedoch in Frage, indem sie zeigen, dass aktivierte p38 MAPK nicht nur funktionslos an Keratinfilamente gebunden sind, sondern dass sie vielmehr zu einer beträchtlichen Umstrukturierung des Keratinnetzwerks führen. Diese Reorganisation des Keratinnetzwerks führt zu physiologisch relevanten Anpassungen der Zellform und -flexibilität, die es der Zelle ermöglichen, spezielle Funktionen wahrzunehmen, sich zu teilen und sich veränderten Umweltbedingungen anzupassen.

## 5. Zusammenfassung

Das zytoplasmatische Zytoskelett besteht aus drei Filamentsystemen, die aus Aktin, Tubulin und Intermediärfilamentproteinen aufgebaut sind und dreidimensionale Netzwerke ausbilden. Das Intermediärfilamentsystem, dem vor allem mechanische Stabilisierungsfunktionen zugesprochen werden, unterscheidet sich von den anderen durch seine Fähigkeit, spontan aus seinen Polypeptiduntereinheiten ohne weitere Kofaktoren zu polymerisieren und durch seinen unpolaren Aufbau. Es ist bis heute unbekannt, wie Intermediärfilamentnetzwerke *in vivo* moduliert werden und wie ihre Anordnung in den Kontext des Gesamtzytoskeletts koordiniert wird. Am Beispiel der epithelialen Intermediärfilamentproteine, den Keratinen, sollte daher untersucht werden, wie und wo neue Intermediärfilamente entstehen, welche Bedeutung den anderen Filamentsystemen bei dem Netzwerkaufbau und –Turn-Over zukommen und wie die Netzwerkbildung gesteuert wird.

Zur Beantwortung dieser Fragestellungen wurden Zellklone hergestellt, die fluoreszierende Keratine synthetisieren. In der Zelllinie SK8/18-2, deren gesamtes Netzwerk aus derartigen Chimären aufgebaut ist, konnten anhand von mikroskopischen Zeitrafferaufnahmen der Fluoreszenzmuster Keratinfilamentvorläufer (KFP) identifiziert und deren Dynamik direkt in lebenden Zellen verfolgt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die KFP in einem Plasmamembran-nahen Bereich entstehen, in dem sie zuerst als punktförmige Partikel detektiert werden. Nach einer initialen, sphäroidalen Wachstumsphase elongieren die Partikel zu kleinen Filamentstückchen. Diese können miteinander fusionieren und werden über ihre Enden in das periphere Netzwerk integriert. Der Wachstumsprozess ist gekoppelt an eine kontinuierliche, langsame Bewegung in Richtung auf das Zellzentrum. Diese Motilität sistiert vollständig nach pharmakologisch induziertem Abbau der Aktinfilamente. In Zeitrafferaufnahmen kann jedoch in derartig behandelten Zellen ein wesentlich schnellerer Transport, der in verschiedene Richtungen verläuft und durch lange Ruhephasen unterbrochen wird, beobachtet werden. Dieser Modus, der gelegentlich auch in unbehandelten Zellen gefunden wurde, ist abhängig von intakten Mikrotubuli. Erst durch Zerstörung der Aktinfilamente und der Mikrotubuli erlischt die Motilität der KFPs vollständig.

Bei der Suche nach Regulatoren der Keratinnetzwerkbildung wurde die p38 MAPK als zentraler Faktor identifiziert. Erstmals konnte eine direkte räumliche und zeitliche Korrelation zwischen einer spezifischen Enzymaktivität durch Nachweis der phosphorylierten p38 MAPK, der daraus folgenden Phosphorylierung eines Keratins, hier Serin 73 des Keratin 8, und der daraus resultierenden Veränderung des Netzwerkaufbaus, d. h. der Ausbildung von Keratingranula, nachgewiesen werden. Diese koordinierten Veränderungen wurden in unterschiedlichen Stresssituationen in verschiedenen Zellsystemen und in Zellen mit mutierten Keratinen beobachtet. Genetische (shRNA) und pharmakologische Manipulationen der p38 MAPK-Aktivität deuten auf einen engen kausalen Zusammenhang hin.

## 6. Literaturverzeichnis

- Ackerley, S., Grierson, A.J., Banner, S., Perkinson, M.S., Brownlees, J., Byers, H.L., Ward, M., Thornhill, P., Hussain, K., Waby, J.S., Anderton, B.H., Cooper, J.D., Dingwall, C., Leigh, P.N., Shaw, C.E., Miller, C.C., 2004. p38alpha stress-activated protein kinase phosphorylates neurofilaments and is associated with neurofilament pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Cell. Neurosci.* 26, 354-364.
- Albers, K., Fuchs, E., 1989. Expression of mutant keratin cDNAs in epithelial cells reveals possible mechanisms for initiation and assembly of intermediate filaments. *J. Cell Biol.* 108, 1477-1493.
- 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. *S. Afr. Med. J.* 50, 2124-2128.
- Amann, K.J., Pollard, T.D., 2001. Direct real-time observation of actin filament branching mediated by Arp2/3 complex using total internal reflection fluorescence microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 15009-15013.
- Andra, K., Lassmann, H., Bittner, R., Shorny, S., Fassler, R., Propst, F., Wiche, G., 1997. Targeted inactivation of plectin reveals essential function in maintaining the integrity of skin, muscle, and heart cytoarchitecture. *Genes Dev.* 11, 3143-3156.
- Andrysik, Z., Machala, M., Chramostova, K., Hofmanova, J., Kozubik, A., Vondracek, J., 2006. Activation of ERK1/2 and p38 kinases by polycyclic aromatic hydrocarbons in rat liver epithelial cells is associated with induction of apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 211, 198-208.
- Anton-Lamprecht, I., 1994. Ultrastructural identification of basic abnormalities as clues to genetic disorders of the epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 103, 6S-12S.
- Bakin, A.V., Rinehart, C., Tomlinson, A.K., Arteaga, C.L., 2002. p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGFbeta-mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration. *J. Cell Sci.* 115, 3193-3206.
- Bauman, P.A., Dalton, W.S., Anderson, J.M., Cress, A.E., 1994. Expression of cytokeratin confers multiple drug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 5311-5314.
- Bologna, M., Allen, R., Dulbecco, R., 1986. Organization of cytokeratin bundles by desmosomes in rat mammary cells. *J. Cell Biol.* 102, 560-567.
- 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.
- Cano, E., Doza, Y.N., Ben-Levy, R., Cohen, P., Mahadevan, L.C., 1996. Identification of anisomycin-activated kinases p45 and p55 in murine cells as MAPKAP kinase-2. *Oncogene* 12, 805-812.
- Carrier, M.F., 1998. Control of actin dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 45-51.
- Caulin, C., Ware, C.F., Magin, T.M., Oshima, R.G., 2000. Keratin-dependent, epithelial resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J. Cell Biol.* 149, 17-22.
- 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., Karin, M., 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37-40.
- Chen, W., Bowden, G.T., 1999. Activation of p38 MAP kinase and ERK are required for ultraviolet-B induced c-fos gene expression in human keratinocytes. *Oncogene* 18, 7469-7476.
- Cheng, H., Kartenbeck, J., Kabsch, K., Mao, X., Marques, M., Alonso, A., 2002. Stress kinase p38 mediates EGFR transactivation by hyperosmolar concentrations of sorbitol. *J. Cell. Physiol.* 192, 234-243.
- Cheng, T.J., Lai, Y.K., 1998. Identification of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2 as a vimentin kinase activated by okadaic acid in 9L rat brain tumor cells. *J. Cell. Biochem.* 71, 169-181.
- Chou, C.F., Smith, A.J., Omary, M.B., 1992. Characterization and dynamics of O-linked glycosylation of human cytokeratin 8 and 18. *J. Biol. Chem.* 267, 3901-3906.
- Chou, Y.H., Opal, P., Quinlan, R.A., Goldman, R.D., 1996. The relative roles of specific N- and C-terminal phosphorylation sites in the disassembly of intermediate filament in mitotic BHK-21 cells. *J. Cell Sci.* 109 ( Pt 4), 817-826.
- Coleman, T.R., Lazarides, E., 1992. Continuous growth of vimentin filaments in mouse fibroblasts. *J. Cell Sci.* 103 ( Pt 3), 689-698.
- Coulombe, P.A., Fuchs, E., 1990. Elucidating the early stages of keratin filament assembly. *J. Cell Biol.* 111, 153-169.
- Coulombe, P.A., Hutton, M.E., Letai, A., Hebert, A., Paller, A.S., Fuchs, E., 1991. Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: genetic and functional analyses. *Cell* 66, 1301-1311.



- Coulombe, P.A., Fuchs, E., 1993. Epidermolysis bullosa simplex. *Semin. Dermatol.* 12, 173-190.
- 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., 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.
- D'Alessandro, M., Russell, D., Morley, S.M., Davies, A.M., Lane, E.B., 2002. Keratin mutations of epidermolysis bullosa simplex alter the kinetics of stress response to osmotic shock. *J. Cell Sci.* 115, 4341-4351.
- Dale, B.A., Resing, K.A., Lonsdale-Eccles, J.D., 1985. Filaggrin: a keratin filament associated protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 455, 330-342.
- Davies, S.P., Reddy, H., Caivano, M., Cohen, P., 2000. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.* 351, 95-105.
- dos Remedios, C.G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I.V., Tsubakihara, M., Berry, D.A., Nosworthy, N.J., 2003. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol. Rev.* 83, 433-473.
- Downing, K.H., Nogales, E., 1998. Tubulin and microtubule structure. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 16-22.
- 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.
- Eckert, R.L., Efimova, T., Dashti, S.R., Balasubramanian, S., Deucher, A., Crish, J.F., Sturniolo, M., Bone, F., 2002. Keratinocyte survival, differentiation, and death: many roads lead to mitogen-activated protein kinase. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 7, 36-40.
- Eckert, R.L., Efimova, T., Balasubramanian, S., Crish, J.F., Bone, F., Dashti, S., 2003. p38 Mitogen-activated protein kinases on the body surface--a function for p38 delta. *J. Invest. Dermatol.* 120, 823-828.
- Efimova, T., Broome, A.M., Eckert, R.L., 2003. A regulatory role for p38 delta MAPK in keratinocyte differentiation. Evidence for p38 delta-ERK1/2 complex formation. *J. Biol. Chem.* 278, 34277-34285.
- Eger, A., Stockinger, A., Wiche, G., Foisner, R., 1997. Polarisation-dependent association of plectin with desmoplakin and the lateral submembrane skeleton in MDCK cells. *J. Cell Sci.* 110 ( Pt 11), 1307-1316.

- 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.
- Fausther, M., Villeneuve, L., Cadrin, M., 2004. Heat shock protein 70 expression, keratin phosphorylation and Mallory body formation in hepatocytes from griseofulvin-intoxicated mice. *Comp Hepatol* 3, 5.
- Feng, L., Zhou, X., Liao, J., Omary, M.B., 1999. Pervanadate-mediated tyrosine phosphorylation of keratins 8 and 19 via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J. Cell Sci.* 112, 2081-2090.
- 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. *J. Cell Biol.* 132, 1115-1132.
- Fuchs, E., 1993. Epidermal differentiation and keratin gene expression. *J. Cell Sci. Suppl.* 17, 197-208.
- 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, E., Yang, Y., 1999. Crossroads on cytoskeletal highways. *Cell* 98, 547-550.
- Fuchs, E., Karakesisoglou, I., 2001. Bridging cytoskeletal intersections. *Genes Dev.* 15, 1-14.
- Garmyn, M., Mammone, T., Pupe, A., Gan, D., Declercq, L., Maes, D., 2001. Human keratinocytes respond to osmotic stress by p38 map kinase regulated induction of HSP70 and HSP27. *J. Invest. Dermatol.* 117, 1290-1295.
- Georgatos, S.D., Blobel, G., 1987. Lamin B constitutes an intermediate filament attachment site at the nuclear envelope. *J. Cell Biol.* 105, 117-125.
- Georgatos, S.D., Maison, C., 1996. Integration of intermediate filaments into cellular organelles. *Int. Rev. Cytol.* 164, 91-138.
- Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H., Parks, W.P., 1973. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 51, 1417-1423.
- 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.

- Gibb, B.J., Brion, J.P., Brownlees, J., Anderton, B.H., Miller, C.C., 1998. Neuropathological abnormalities in transgenic mice harbouring a phosphorylation mutant neurofilament transgene. *J. Neurochem.* 70, 492-500.
- 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.
- 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 Lett.* 489, 182-186.
- Goldman, R.D., 1971. The role of three cytoplasmic fibers in BHK-21 cell motility. I. Microtubules and the effects of colchicine. *J. Cell Biol.* 51, 752-762.
- Goodson, H.V., Valetti, C., Kreis, T.E., 1997. Motors and membrane traffic. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 18-28.
- Gordon, J.A., 1991. Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. *Methods Enzymol.* 201, 477-482.
- Gordon, W.E., 3rd, Bushnell, A., Burridge, K., 1978. Characterization of the intermediate (10 nm) filaments of cultured cells using an autoimmune rabbit antiserum. *Cell* 13, 249-261.
- Green, K.J., Gaudry, C.A., 2000. Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 208-216.
- Grethe, S., Ares, M.P., Andersson, T., Porn-Ares, M.I., 2004. p38 MAPK mediates TNF-induced apoptosis in endothelial cells via phosphorylation and downregulation of Bcl-x(L). *Exp. Cell Res.* 298, 632-642.
- Harper, E.G., Alvares, S.M., Carter, W.G., 2005. Wounding activates p38 map kinase and activation transcription factor 3 in leading keratinocytes. *J. Cell Sci.* 118, 3471-3485.
- Hatzfeld, M., Weber, K., 1990. The coiled coil of in vitro assembled keratin filaments is a heterodimer of type I and II keratins: use of site-specific mutagenesis and recombinant protein expression. *J. Cell Biol.* 110, 1199-1210.
- 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.
- He, T., Stepulak, A., Holmstrom, T.H., Omary, M.B., Eriksson, J.E., 2002. The intermediate filament protein keratin 8 is a novel cytoplasmic substrate for c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.* 277, 10767-10774.
- Hecht, D., Zick, Y., 1992. Selective inhibition of protein tyrosine phosphatase activities by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and vanadate in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188, 773-779.

- Hedberg, K.K., Chen, L.B., 1986. Absence of intermediate filaments in a human adrenal cortex carcinoma-derived cell line. *Exp. Cell Res.* 163, 509-517.
- Hedges, J.C., Dechert, M.A., Yamboliev, I.A., Martin, J.L., Hickey, E., Weber, L.A., Gerthoffer, W.T., 1999. A role for p38(MAPK)/HSP27 pathway in smooth muscle cell migration. *J. Biol. Chem.* 274, 24211-24219.
- 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., Chang, L., Goldman, R.D., 2003a. The dynamic and motile properties of intermediate filaments. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19, 445-467.
- Helfand, B.T., Loomis, P., Yoon, M., Goldman, R.D., 2003b. Rapid transport of neural intermediate filament protein. *J. Cell Sci.* 116, 2345-2359.
- 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., Aebi, U., 1998. Structure, assembly, and dynamics of intermediate filaments. *Subcell. Biochem.* 31, 319-362.
- Herrmann, H., Aebi, U., 1999. Intermediate filament assembly: temperature sensitivity and polymorphism. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 1416-1431.
- 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., Aebi, U., 2004. Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 749-789.
- Hesse, M., Magin, T.M., Weber, K., 2001. Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18. *J. Cell Sci.* 114, 2569-2575.
- 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.
- Hirokawa, N., 1998. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* 279, 519-526.

- Hofmann, I., Mertens, C., Brettel, M., Nimmrich, V., Schnolzer, M., Herrmann, H., 2000. Interaction of plakophilins with desmoplakin and intermediate filament proteins: an in vitro analysis. *J. Cell Sci.* 113 ( Pt 13), 2471-2483.
- Hofmann, M., Zaper, J., Bernd, A., Bereiter-Hahn, J., Kaufmann, R., Kippenberger, S., 2004. Mechanical pressure-induced phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase in epithelial cells via Src and protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316, 673-679.
- Hollenbeck, P.J., Saxton, W.M., 2005. The axonal transport of mitochondria. *J. Cell Sci.* 118, 5411-5419.
- Hotulainen, P., Lappalainen, P., 2006. Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J. Cell Biol.* 173, 383-394.
- Houseweart, M.K., Cleveland, D.W., 1999. Cytoskeletal linkers: new MAPs for old destinations. *Curr. Biol.* 9, R864-866.
- Hynes, R.O., Destree, A.T., 1978. 10 nm filaments in normal and transformed cells. *Cell* 13, 151-163.
- 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. *J. Biol. Chem.* 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.
- Iwaya, K., Mukai, K., 2005. Accumulation of ubiquitin-conjugated cytokeratin fragments in tumor cells. *Semin. Cancer Biol.* 15, 309-318.
- 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. *J. Biol. Chem.* 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.
- Janig, E., Stumptner, C., Fuchsbichler, A., Denk, H., Zatloukal, K., 2005. Interaction of stress proteins with misfolded keratins. *Eur. J. Cell Biol.* 84, 329-339.
- Janmey, P.A., Shah, J.V., Janssen, K.P., Schliwa, M., 1998. Viscoelasticity of intermediate filament networks. *Subcell. Biochem.* 31, 381-397.

- Kamal, A., Goldstein, L.S., 2000. Connecting vesicle transport to the cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 503-508.
- Kamal, A., Goldstein, L.S., 2002. Principles of cargo attachment to cytoplasmic motor proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 63-68.
- Karakesisoglou, I., Yang, Y., Fuchs, E., 2000. An epidermal plakin that integrates actin and microtubule networks at cellular junctions. *J. Cell Biol.* 149, 195-208.
- 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.
- Kelly, D.E., 1966. Fine structure of desmosomes, hemidesmosomes, and an adepidermal globular layer in developing newt epidermis. *J. Cell Biol.* 28, 51-72.
- Kim, S., Wong, P., Coulombe, P.A., 2006. A keratin cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial cell growth. *Nature* 441, 362-365.
- 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.
- Klekotka, P.A., Santoro, S.A., Zutter, M.M., 2001. alpha 2 integrin subunit cytoplasmic domain-dependent cellular migration requires p38 MAPK. *J. Biol. Chem.* 276, 9503-9511.
- Knapp, L.W., O'Guin, W.M., Sawyer, R.H., 1983. Rearrangement of the keratin cytoskeleton after combined treatment with microtubule and microfilament inhibitors. *J. Cell Biol.* 97, 1788-1794.
- Komarova, Y., Lansbergen, G., Galjart, N., Grosveld, F., Borisy, G.G., Akhmanova, A., 2005. EB1 and EB3 control CLIP dissociation from the ends of growing microtubules. *Mol. Biol. Cell* 16, 5334-5345.
- Kottke, M.D., Delva, E., Kowalczyk, A.P., 2006. The desmosome: cell science lessons from human diseases. *J. Cell Sci.* 119, 797-806.
- Kouklis, P.D., Hutton, E., Fuchs, E., 1994. Making a connection: direct binding between keratin intermediate filaments and desmosomal proteins. *J. Cell Biol.* 127, 1049-1060.
- Kowalczyk, A.P., Stappenbeck, T.S., Parry, D.A., Palka, H.L., Virata, M.L., Bornslaeger, E.A., Nilles, L.A., Green, K.J., 1994. Structure and function of desmosomal transmembrane core and plaque molecules. *Biophys. Chem.* 50, 97-112.
- Kreis, T.E., Geiger, B., Schmid, E., Jorcano, J.L., Franke, W.W., 1983. De novo synthesis and specific assembly of keratin filaments in nonepithelial cells after microinjection of mRNA for epidermal keratin. *Cell* 32, 1125-1137.

- Kreplak, L., Aebi, U., Herrmann, H., 2004. Molecular mechanisms underlying the assembly of intermediate filaments. *Exp. Cell Res.* 301, 77-83.
- 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., Omary, M.B., 1997. Phosphorylation of human keratin 8 in vivo at conserved head domain serine 23 and at epidermal growth factor-stimulated tail domain serine 431. *J. Biol. Chem.* 272, 7556-7564.
- Ku, N.O., Liao, J., Omary, M.B., 1998. Phosphorylation of human keratin 18 serine 33 regulates binding to 14-3-3 proteins. *EMBO J.* 17, 1892-1906.
- 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., Azhar, S., Omary, M.B., 2002a. Keratin 8 phosphorylation by p38 kinase regulates cellular keratin filament reorganization: modulation by a keratin 1-like disease causing mutation. *J. Biol. Chem.* 277, 10775-10782.
- Ku, N.O., Michie, S., Resurreccion, E.Z., Broome, R.L., Omary, M.B., 2002b. Keratin binding to 14-3-3 proteins modulates keratin filaments and hepatocyte mitotic progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 4373-4378.
- Ku, N.O., Omary, M.B., 2006. A disease- and phosphorylation-related nonmechanical function for keratin 8. *J. Cell Biol.* 174, 115-125.
- Kumemura, H., Harada, M., Omary, M.B., Sakisaka, S., Suganuma, T., Namba, M., Sata, M., 2004. Aggregation and loss of cytokeratin filament networks inhibit golgi organization in liver-derived epithelial cell lines. *Cell Motil. Cytoskeleton* 57, 37-52.
- Lane, E.B., McLean, W.H., 2004. Keratins and skin disorders. *J. Pathol.* 204, 355-366.
- 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. *J. Biol. Chem.* 268, 12164-12176.
- Lee, S.K., Jang, H.J., Lee, H.J., Lee, J., Jeon, B.H., Jun, C.D., Kim, E.C., 2006. p38 and ERK MAP kinase mediates iron chelator-induced apoptosis and -suppressed differentiation of immortalized and malignant human oral keratinocytes. *Life Sci.* 79, 1419-1427.
- 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. *J. Natl. Cancer Inst.* 51, 691-697.
- Leube, R.E., Kartenbeck, J. 1996. Molekulare Komponenten der Intermediärfilamente und ihrer Verankerungsstrukturen in Epithelzellen: Differenzierungsmarker in der Gewebe- und Tumordiagnostik. In *Onkologie Grundlagen Diagnostik Therapie Entwicklungen*. Jens W. Zeller, Harald zur Hausen

- Leung, C.L., Green, K.J., Liem, R.K., 2002. Plakins: a family of versatile cytolinker proteins. *Trends Cell Biol.* 12, 37-45.
- 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.
- Lin, C.M., Hamel, E., 1981. Effects of inhibitors of tubulin polymerization on GTP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 256, 9242-9245.
- Liovic, M., Mogensen, M.M., Prescott, A.R., Lane, E.B., 2003. Observation of keratin particles showing fast bidirectional movement colocalized with microtubules. *J. Cell Sci.* 116, 1417-1427.
- Liu, X., Vansant, G., Udovichenko, I.P., Wolfrum, U., Williams, D.S., 1997. Myosin VIIa, the product of the Usher 1B syndrome gene, is concentrated in the connecting cilia of photoreceptor cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* 37, 240-252.
- Louvard, D., 1996. [Polarity of epithelial cells. Role of the actin microfilament system]. *Nephrologie* 17, 351-357.
- Lowthert, L.A., Ku, N.O., Liao, J., Coulombe, P.A., Omary, M.B., 1995. Empigen BB: a useful detergent for solubilization and biochemical analysis of keratins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206, 370-379.
- Luduena, R.F., Roach, M.C., 1991. Tubulin sulfhydryl groups as probes and targets for antimetabolic 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.
- Marcy, Y., Prost, J., Carlier, M.F., Sykes, C., 2004. Forces generated during actin-based propulsion: a direct measurement by micromanipulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 5992-5997.
- Martys, J.L., Ho, C.L., Liem, R.K., Gundersen, G.G., 1999. Intermediate filaments in motion: observations of intermediate filaments in cells using green fluorescent protein-vimentin. *Mol. Biol. Cell* 10, 1289-1295.
- McIntosh, J.R., Hering, G.E., 1991. Spindle fiber action and chromosome movement. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7, 403-426.
- 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.
- Moll, R., 1993. [Cytokeratins as markers of differentiation. Expression profiles in epithelia and epithelial tumors]. *Veroff. Pathol.* 142, 1-197.
- Moll, R., 1998. Cytokeratins as markers of differentiation in the diagnosis of epithelial tumors. *Subcell. Biochem.* 31, 205-262.
- Moss, D.K., Lane, J.D., 2006. Microtubules: forgotten players in the apoptotic execution phase. *Trends Cell Biol.* 16, 330-338.
- Musch, A., 2004. Microtubule organization and function in epithelial cells. *Traffic* 5, 1-9.
- Ngai, J., Coleman, T.R., Lazarides, E., 1990. Localization of newly synthesized vimentin subunits reveals a novel mechanism of intermediate filament assembly. *Cell* 60, 415-427.
- Nguyen, M.D., Lariviere, R.C., Julien, J.P., 2001. Deregulation of Cdk5 in a mouse model of ALS: toxicity alleviated by perikaryal neurofilament inclusions. *Neuron* 30, 135-147.
- 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., 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., Tao, G.Z., Toivola, D.M., Liao, J., 2006. 'Heads and tails' of intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights. *Trends Biochem. Sci.*
- Ono, K., Han, J., 2000. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell. Signal.* 12, 1-13.
- Osborn, M., Franke, W.W., Weber, K., 1977. Visualization of a system of filaments 7-10 nm thick in cultured cells of an epithelioid line (Pt K2) by immunofluorescence microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 2490-2494.
- Osborn, M., Franke, W., Weber, K., 1980. Direct demonstration of the presence of two immunologically distinct intermediate-sized filament systems in the same cell by double immunofluorescence microscopy. Vimentin and cytokeratin fibers in cultured epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 125, 37-46.
- 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.

- Paramio, J.M., Casanova, M.L., Segrelles, C., Mittnacht, 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., Segrelles, C., Ruiz, S., Jorcano, J.L., 2001. Inhibition of protein kinase B (PKB) and PKCzeta mediates keratin K10-induced cell cycle arrest. *Mol. Cell. Biol.* 21, 7449-7459.
- Parry, D.A., Steinert, P.M., 1999. Intermediate filaments: molecular architecture, assembly, dynamics and polymorphism. *Q. Rev. Biophys.* 32, 99-187.
- Petit, V., Thiery, J.P., 2000. Focal adhesions: structure and dynamics. *Biol. Cell.* 92, 477-494.
- Pezza, R.J., Villarreal, M.A., Montich, G.G., Argarana, C.E., 2002. Vanadate inhibits the ATPase activity and DNA binding capability of bacterial MutS. A structural model for the vanadate-MutS interaction at the Walker A motif. *Nucleic Acids Res* 30, 4700-4708.
- Pollard, T.D., Blanchoin, L., Mullins, R.D., 2001. Actin dynamics. *J. Cell Sci.* 114, 3-4.
- Pollard, T.D., Borisy, G.G., 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-465.
- Powell, D.W., Rane, M.J., Joughin, B.A., Kalmukova, R., Hong, J.H., Tidor, B., Dean, W.L., Pierce, W.M., Klein, J.B., Yaffe, M.B., McLeish, K.R., 2003. Proteomic identification of 14-3-3zeta as a mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 substrate: role in dimer formation and ligand binding. *Mol. Cell. Biol.* 23, 5376-5387.
- 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.
- Premaratne, C., Klingberg, S., Glass, I., Wright, K., Murrell, D., 2002. Epidermolysis bullosa simplex Dowling-Meara due to an arginine to cysteine substitution in exon 1 of keratin 14. *Australas. J. Dermatol.* 43, 28-34.
- Quinlan, R.A., Schiller, D.L., Hatzfeld, M., Achtstatter, T., Moll, R., Jorcano, J.L., Magin, T.M., Franke, W.W., 1985. Patterns of expression and organization of cytokeratin intermediate filaments. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 455, 282-306.
- Raingaud, 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.
- Rao, M.V., Engle, L.J., Mohan, P.S., Yuan, A., Qiu, D., Cataldo, A., Hassinger, L., Jacobsen, S., Lee, V.M., Andreadis, A., Julien, J.P., Bridgman, P.C., Nixon, R.A., 2002. Myosin Va binding to neurofilaments is essential for correct myosin Va distribution and transport and neurofilament density. *J. Cell Biol.* 159, 279-290.
- Rezniczek, G.A., de Pereda, J.M., Reipert, S., Wiche, G., 1998. Linking integrin alpha6beta4-based cell adhesion to the intermediate filament cytoskeleton: direct interaction

- between the beta4 subunit and plectin at multiple molecular sites. *J. Cell Biol.* 141, 209-225.
- Ridge, K.M., Linz, L., Flitney, F.W., Kuczmariski, 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.
- Rogers, M.A., Winter, H., Langbein, L., Bleiler, R., Schweizer, J., 2004. The human type I keratin gene family: characterization of new hair follicle specific members and evaluation of the chromosome 17q21.2 gene domain. *Differentiation* 72, 527-540.
- Rogers, M.A., Edler, L., Winter, H., Langbein, L., Beckmann, I., Schweizer, J., 2005. Characterization of new members of the human type II keratin gene family and a general evaluation of the keratin gene domain on chromosome 12q13.13. *J. Invest. Dermatol.* 124, 536-544.
- Rosenbaum, J., 2000. Cytoskeleton: functions for tubulin modifications at last. *Curr. Biol.* 10, R801-803.
- Rosser, E.M., Morton, S., Ashton, K.S., Cohen, P., Hulme, A.N., 2004. Synthetic anisomycin analogues activating the JNK/SAPK1 and p38/SAPK2 pathways. *Org. Biomol. Chem.* 2, 142-149.
- 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.
- Rugg, E.L., Leigh, I.M., 2004. The keratins and their disorders. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 131C, 4-11.
- Sarria, A.J., Nordeen, S.K., Evans, R.M., 1990. Regulated expression of vimentin cDNA in cells in the presence and absence of a preexisting vimentin filament network. *J. Cell Biol.* 111, 553-565.
- Schaapveld, R.Q., Borradori, L., Geerts, D., van Leusden, M.R., Kuikman, I., Nievers, M.G., Niessen, C.M., Steenbergen, R.D., Snijders, P.J., Sonnenberg, A., 1998. Hemidesmosome formation is initiated by the beta4 integrin subunit, requires complex formation of beta4 and HD1/plectin, and involves a direct interaction between beta4 and the bullous pemphigoid antigen 180. *J. Cell Biol.* 142, 271-284.
- Schmitt, A., Wolfrum, U., 2001. Identification of novel molecular components of the photoreceptor connecting cilium by immunoscreens. *Exp. Eye Res.* 73, 837-849.
- Schnapp, B.J., Reese, T.S., 1989. Dynein is the motor for retrograde axonal transport of organelles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 1548-1552.
- 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.

- Shah, J.V., Flanagan, L.A., Janmey, P.A., Leterrier, J.F., 2000. Bidirectional translocation of neurofilaments along microtubules mediated in part by dynein/dynactin. *Mol. Biol. Cell* 11, 3495-3508.
- Sharma, G.D., He, J., Bazan, H.E., 2003. p38 and ERK1/2 coordinate cellular migration and proliferation in epithelial wound healing: evidence of cross-talk activation between MAP kinase cascades. *J. Biol. Chem.* 278, 21989-21997.
- Small, J.V., Stradal, T., Vignal, E., Rottner, K., 2002. The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol.* 12, 112-120.
- Smith, E.A., Fuchs, E., 1998. Defining the interactions between intermediate filaments and desmosomes. *J. Cell Biol.* 141, 1229-1241.
- 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. *J. Natl. Cancer Inst.* 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.
- Steinbock, F.A., Wiche, G., 1999. Plectin: a cytolinker by design. *Biol. Chem.* 380, 151-158.
- Steinert, P.M., Idler, W.W., Zimmerman, S.B., 1976. Self-assembly of bovine epidermal keratin filaments in vitro. *J. Mol. Biol.* 108, 547-567.
- Steinert, P.M., 1991. Analysis of the mechanism of assembly of mouse keratin 1/keratin 10 intermediate filaments in vitro suggests that intermediate filaments are built from multiple oligomeric units rather than a unique tetrameric building block. *J. Struct. Biol.* 107, 175-188.
- Steinert, P.M., North, A.C., Parry, D.A., 1994. Structural features of keratin intermediate filaments. *J. Invest. Dermatol.* 103, 19S-24S.
- Stepanova, T., Slemmer, J., Hoogenraad, C.C., Lansbergen, G., Dortland, B., De Zeeuw, C.I., Grosveld, F., van Cappellen, G., Akhmanova, A., Galjart, N., 2003. Visualization of microtubule growth in cultured neurons via the use of EB3-GFP (end-binding protein 3-green fluorescent protein). *J. Neurosci.* 23, 2655-2664.
- Stoll, S.W., Kansra, S., Elder, J.T., 2003. Keratinocyte outgrowth from human skin explant cultures is dependent upon p38 signaling. *Wound Repair Regen.* 11, 346-353.
- Strelkov, S.V., Herrmann, H., Aebi, U., 2003. Molecular architecture of intermediate filaments. *Bioessays* 25, 243-251.
- 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.
- Strnad, P., Windoffer, R., Leube, R.E., 2003. Light-induced resistance of the keratin network to the filament-disrupting tyrosine phosphatase inhibitor orthovanadate. *J. Invest. Dermatol.* 120, 198-203.

- Takemura, M., Gomi, H., Colucci-Guyon, E., Itohara, S., 2002. Protective role of phosphorylation in turnover of glial fibrillary acidic protein in mice. *J. Neurosci.* 22, 6972-6979.
- 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 hypotonic stress in a site- and cell-specific manner. *J. Cell Sci.* 119, 1425-1432.
- Theriot, J.A., 1997. Accelerating on a treadmill: ADF/cofilin promotes rapid actin filament turnover in the dynamic cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 136, 1165-1168.
- 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.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9079-9084.
- Vaezi, A., Bauer, C., Vasioukhin, V., Fuchs, E., 2002. Actin cable dynamics and Rho/Rock orchestrate a polarized cytoskeletal architecture in the early steps of assembling a stratified epithelium. *Dev Cell* 3, 367-381.
- 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.
- Vaughan, K.T., 2005. Microtubule plus ends, motors, and traffic of Golgi membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1744, 316-324.
- 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.
- Wang, L., Ho, C.L., Sun, D., Liem, R.K., Brown, A., 2000. Rapid movement of axonal neurofilaments interrupted by prolonged pauses. *Nat Cell Biol* 2, 137-141.

- Wang, L., Brown, A., 2001. Rapid intermittent movement of axonal neurofilaments observed by fluorescence photobleaching. *Mol. Biol. Cell* 12, 3257-3267.
- 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.
- Wehrle-Haller, B., Imhof, B.A., 2003. Actin, microtubules and focal adhesion dynamics during cell migration. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 39-50.
- 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.
- Whisnant, A.R., Gilman, S.D., 2002. Studies of reversible inhibition, irreversible inhibition, and activation of alkaline phosphatase by capillary electrophoresis. *Anal. Biochem.* 307, 226-234.
- Wiche, G., Herrmann, H., Leichtfried, F., Pytela, R., 1982. Plectin: a high-molecular-weight cytoskeletal polypeptide component that copurifies with intermediate filaments of the vimentin type. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 46 Pt 1, 475-482.
- Wiche, G., 1998. Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. *J. Cell Sci.* 111 (Pt 17), 2477-2486.
- 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., 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., Leube, R.E., 2004. Imaging of keratin dynamics during the cell cycle and in response to phosphatase inhibition. *Methods Cell Biol.* 78, 321-352.
- Windoffer, R., Woll, 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.
- Wodnicka, M., Pierzchalska, M., Bereiter-Hahn, J., Kajstura, J., 1992. Comparative study on effects of cytochalasins B and D on F-actin content in different cell lines and different culture conditions. *Folia Histochem. Cytobiol.* 30, 107-111.
- Wolfrum, U., Schmitt, A., 2000. Rhodopsin transport in the membrane of the connecting cilium of mammalian photoreceptor cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* 46, 95-107.
- Yabe, J.T., Chan, W.K., Chylinski, T.M., Lee, S., Pimenta, A.F., Shea, T.B., 2001. The predominant form in which neurofilament subunits undergo axonal transport varies

during axonal initiation, elongation, and maturation. *Cell Motil. Cytoskeleton* 48, 61-83.

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.

Zackroff, R.V., Goldman, R.D., 1979. In vitro assembly of intermediate filaments from baby hamster kidney (BHK-21) cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 6226-6230.

Zatloukal, K., Stumptner, C., Lehner, M., Denk, H., Baribault, H., Eshkind, L.G., Franke, W.W., 2000. Cytokeratin 8 protects from hepatotoxicity, and its ratio to cytokeratin 18 determines the ability of hepatocytes to form Mallory bodies. *Am. J. Pathol.* 156, 1263-1274.

## 7. Anhang

### 7.1 Filmlegenden

**Film 1.: Motilität des Keratinnetzwerks von AK13-1 Zellen.** Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen (Aufnahmeabstand 20 s) von AK13-1 Zellen, die stabil fluoreszenzmarkiertes Keratin 13 exprimieren (HK13-EGFP). Die Keratinfilamente bewegen sich kontinuierlich in Richtung des Zellzentrums. In der Zellperipherie sind feine Vorläufer der Keratinfilamente zu erkennen. Für weitere Details siehe Abbildung 3.1.

**Film 2: Abbau des Keratinfilamentnetzwerkes in der Mitose.** Laser-Scanning-Zeitrafferaufnahme (Aufnahmeabstand 30 s) von AK13-1 Zellen die stabil fluoreszenzmarkiertes Keratin 13 exprimieren (HK13-EGFP). Die Zelle rundet sich zu Beginn der Mitose ab, dabei werden die Keratinfilamente zu Keratingranula abgebaut.

**Film 3: OV-induzierter Abbau des Keratinnetzwerks – Übersicht.** Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahme (Aufnahmeabstand 30 s) von AK13-1 Zellen (invertierte Darstellung), die mit 10mM OV inkubiert wurden.

**Film 4: OV-induzierter Abbau des Keratinnetzwerks – Detail.** Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahme (Aufnahmeabstand 30 s) von AK13-1 Zellen (invertierte Darstellung), die mit 10mM OV inkubiert wurden. Für weitere Details siehe Abbildung 3.2.

**Film 5: Motilität des Keratinfilamentnetzwerkes in SK8/18-2 Zellen.** Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen (Aufnahmeabstand 25 s) von SK8/18-2 Zellen (invertierte Darstellung). Detektion der HK18-YFP-Verteilung. Die Keratinfilamente werden kontinuierlich und gleichmäßig in Richtung des Zellzentrums transportiert.

**Film 6: Entstehung der KFP in der Zellperipherie von SK8/18-2 Zellen.** Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen (Aufnahmeabstand 30 s) von SW13 Zellen die fluoreszenzmarkierte Keratine HK8-CFP und HK18-YFP exprimieren. Die Keratinfilamentbildung findet unterhalb der Plasmamembran (oben) statt. Die KFP werden in Richtung des Zellzentrums transportiert und in das bestehende periphere Netzwerk (unten) integriert. Für weitere Details siehe Abbildung 3.4.

**Film7: Flexibilität und Fusionskompetenz der KFP.** Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen (Aufnahmeabstand 25 s) der peripheren Region von SK8/18-2 Zellen, die stabil fluoreszenzmarkiertes Keratin 18 (HK18-YFP) exprimieren. Die KFP werden in der Zellperipherie generiert und in Richtung des Zellzentrums transportiert. Während des Transportes sind sie äußerst flexibel und fusionieren untereinander an ihren Enden. Die Integration in das Netzwerk erfolgt durch Fusion mit den peripheren Keratinfilamenten. Für weitere Details siehe Abbildung 3.5.

**Film 8: Entstehung von Keratinfilamenten in einem neu gebildeten Lamellipodium.** Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen (Aufnahmeabstand 25 s) der Peripherie von SK8/18-2 Zellen, die stabil fluoreszenzmarkiertes Keratin 18 (HK18-YFP) exprimieren. Für weitere Details siehe Abbildung 3.6.



**Film 9: Veränderte KFP-Orientierung in Lamellipodien.** Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen (Aufnahmeabstand 25 s) eines Lamellipodiums lebender SK8/18-2 Zellen (invertierte Darstellung). Im Gegensatz zu der übrigen Peripherie sind die KFP im Bereich des Lamellipodiums senkrecht zur Plasmamembran orientiert. Für weitere Details siehe Abbildung 3.7.

**Film 10: Transport der KFP in axonartigen Ausläufern der SK8/18-2 Zellen.** Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen (Aufnahmeabstand 25 s) eines Segments eines langen, axonartigen Ausläufers von SK8/18-2 Zellen. Detektion von HK18-YFP (invertierte Darstellung). Die KFP werden diskontinuierlich, bidirektional und schnell entlang des Ausläufers transportiert. Für weitere Details siehe Abbildung 3.8.

**Film 11: Transient mit fluoreszenzmarkiertem Keratin 5 und Keratin 14 transfizierte SW-13 Zellen.** Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen (Aufnahmeabstand 20 s) von SW-13 Zellen, die HK14-EYFP und HK5-ECFP exprimieren. Detektion von HK14-EYFP (invertierte Darstellung). Die aus Keratin 5 und 14 generierten KFP sind nicht in der Lage, ein intaktes Keratinnetzwerk bzw. Keratinfilamente zu bilden.

**Film 12: Fusionskompetenz und Ringbildung der Keratin 5 und 14 KFP in SW-13 Zellen.** Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen (Aufnahmeabstand 20 s) von Sw-13 Zellen, die HK14-EYFP und HK5-ECFP exprimieren. Detektion von HK14-EYFP (invertierte Darstellung). Die kurzen Keratinfilamentstücke sind in der Lage miteinander zu fusionieren und durch Aufrollen Keratinringe zu bilden. Für weitere Details siehe Abbildung 3.9.

**Film 13: KFP-Transport entlang von Aktin-Stressfasern in EpH4 Zellen.** Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen und Zeitraffer-Phasenkontrastaufnahmen (Aufnahmeabstand 15 s) des Lamellipodiums einer EpH4-Zelle, die HK18-YFP (grün) und mRFP-Aktin (rot) exprimiert. KFP werden kontinuierlich entlang der Aktinstressfasern in Richtung des Zellzentrums transportiert. Für weitere Details siehe Abbildung 3.11.

**Film 14: Reorganisation des Keratinfilamentnetzwerkes durch Zerstörung der Aktinfilamente in SK8/18-2 Zellen mit Latrunculin B.** Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen (Aufnahmeabstand 25 s) einer HK18-YFP exprimierenden SK8/18-2 Zelle (invertierte Darstellung) nach Inkubation mit 30  $\mu$ M Latrunculin B. Nach der Inkubation mit Latrunculin B konzentriert sich das Keratinnetzwerk um den Nukleus. Für weitere Details siehe Abbildung 3.13.

**Film 15: Detektion des Mikrotubulus-abhängigen Transports der KFP nach Zerstörung der Aktinfilamente.** Detailausschnitt des Films 14. Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen (Aufnahmeabstand 25 s) einer HK18-YFP exprimierenden SK8/18-2 Zelle (invertierte Darstellung) nach Inkubation mit 30  $\mu$ M Latrunculin B. Die in der Zellperipherie (rechts) generierten KFP werden nur noch diskontinuierlich und schnell in Richtung des Zellzentrums transportiert. Für weitere Details siehe Abbildung 3.13.

**Film 16: Reorganisation des Keratinfilamentnetzwerkes durch die Zerstörung der Mikrotubuli mit Nocodazol.** Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen (Aufnahmeabstand 30 s) von SK8/18-2 Zellen nach Inkubation mit 100  $\mu$ M Nocodazol. Detektion des stabil exprimierten HK18-YFP (invertierte Darstellung). Nach Inkubation der Zellen mit Nocodazol kommt es zu einer langsamen Konzentrierung der Keratinfilamente um den Nukleus. In der Zellperipherie werden weiterhin KFP gebildet. Für weitere Details siehe Abbildung 3.15.

**Film 17: Reorganisation des Keratinfilamentnetzwerkes und Stopp der KFP-Bildung durch die Zerstörung der Aktinfilamente und Mikrotubuli.** Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen (Aufnahmeabstand 25 s) von SK8/18-2 Zellen nach Inkubation mit 30  $\mu$ M Latrunculin B, gefolgt von einer Inkubation der Zellen mit 100  $\mu$ M Nocodazol. Detektion von HK18-YFP (invertierte Darstellung). Die Inkubation mit beiden Drogen führt zu einem kompletten Stopp des KFP-Transportes. Für weitere Details siehe Abbildung 3.16.

**Film 18: Reorganisation des Keratinfilamentnetzwerkes und Stopp der KFP-Bildung durch die Zerstörung der Mikrotubuli und Aktinfilamente.** Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen (Aufnahmeabstand 25 s) von SK8/18-2 Zellen nach Inkubation mit 100  $\mu$ M Nocodazol, gefolgt von einer Inkubation der Zellen mit 30  $\mu$ M Latrunculin B. Detektion von HK18-YFP (invertierte Darstellung). Die Inkubation mit beiden Drogen führt zu einem kompletten Stopp des KFP-Transportes. Für weitere Details siehe Abbildung 3.16.

**Film 19: Die Reorganisation des Keratinfilamentnetzwerkes durch p38-Knock-Down hat keinen Einfluss auf das Mikrotubulus-System.** Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen (Aufnahmeabstand 10 s) der Zellperipherie von AK13-1 Zellen die mit  $\delta/\gamma$ -p38 MAPK-shRNA und EB3-GFP transfiziert wurden. Detektion von EB3-GFP (invertierte Darstellung). Die Bildung der MT wird nicht durch die Reorganisation bzw. durch die dadurch induzierte Reorganisation des Keratinnetzwerkes beeinflusst.

**Film 20: Die Inhibierung der p38-Aktivität verhindert die Bildung und den Abbau von Keratingranula in Zellen die mutierte Keratine exprimieren.** Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen (links; Aufnahmeabstand 20 s) und Phasenkontrast-Aufnahmen (Überlagerung; rechts) der HK14<sub>R125C</sub>-EYFP exprimierenden MT5K14-26 Zellen, vor, während und nach der Inkubation mit dem p38 Inhibitor SB202190 (100  $\mu$ M). Die Keratingranulabildung wird durch die Inhibierung der p38 MAPK-Aktivität gestoppt. Für weitere Details siehe Abbildung 3.39.

**Film 21: Verhindern der KFP-Entstehung in der Zellperipherie durch Inhibierung der p38-Aktivität.** Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen (links; Aufnahmeabstand 20 s) und Zeitraffer-Phasenkontrastaufnahmen (Überlagerung; rechts) von AK13-1 Zellen vor und nach Inkubation mit dem p38 MAPK-Inhibitor SB202190 (100  $\mu$ M). Detektion von HK13-EGFP (invertierte Darstellung). Stopp der KFP-Bildung in der Zellperipherie der Zellen und Retraktion des Keratinfilamentnetzwerkes. Für weitere Details siehe Abbildung 3.39.

**Film 22: Stabilisierung der Mutanten-Keratingranula durch Inhibierung der p38 MAPK-Aktivität.** Zeitraffer-Fluoreszenzaufnahmen (Aufnahmeabstand 20 s) der HK14<sub>R125C</sub>-EYFP Fluoreszenz (links; invertierte Darstellung) und der entsprechenden Phasenkontrast-Aufnahmen (Überlagerung; rechts) vor und nach Inkubation mit dem p38 MAPK-Inhibitor SB202190. Die Inhibierung der p38 MAPK-Aktivität führt zu einem sofortigen Stopp des Keratingranula-Abbaus.

## 7.2 Abkürzungsverzeichnis

Im Folgenden sind im Text häufig verwendete Abkürzungen nochmals alphabetisch aufgelistet. Zusätzlich wurden in diese Liste allgemein gebräuchliche Abkürzungen von Einheiten und Chemikalien aufgenommen, die nicht im Text definiert wurden.

AK	Antikörper
Abb.	Abbildung
ABP	Aktin-bindende Proteine
AF	Aktinfilamente
APS	Ammonium-Persulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BES	N,N-bis(hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca	Calcium
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre DNA
DAPI	4, 6-Diamidino-2-Phenylindol
d.h.	das heißt
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt-destilliertes Wasser
DIC	Differenzieller Interferenzkontrast
dk	Esel, <i>engl. donkey</i>
DMEM	„ <i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i> “
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> (Bakterium)
ECL	“ <i>enhanced chemi-luminescence</i> ”
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronen Mikroskopie
Fa.	Firma
FCS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
gt	Ziege, <i>engl. goat</i>

HRP	<i>Horse-Raddish-Peroxidase.</i>
HWZ	Halbwertszeit
IF	Intermediärfilament
IFAP	Intermediärfilament assoziierte Proteine
IZC	Immunzytochemie
KaP	Keratin assoziierte Proteine
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KF	Keratinfilament
LSM	Laser-Scanning Mikroskop
M	Molmasse
MAPK	<i>„mitogen activated protein kinase“</i>
MCS	<i>engl. multiple cloning site</i>
mc	Maus, <i>lat. Mus musculus</i>
min	Minuten
mM	Millimol
mRNA	<i>„messenger“ RNA</i>
MT	Mikrotubuli
MTOC	Mikrotubuliorganisationszentrum
MW	Molekulargewicht (engl. <i>„molecular weight“</i> )
NaCl	Natriumchlorid
NEB	New England Biolabs
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
OV	Orthovanadat
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>„polymerase chain reaction“</i>
PFA	Paraformaldehyd
pmol	piko Mol
rb	Kaninchen, <i>engl. rabbit</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>„reverse transcription-polymerase-chainreaction“</i>
SAPK	<i>„stress activated protein kinase“</i>

shRNA	<i>short hairpin</i> RNA
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunden
Taq-Polymerase	<i>Thermophilus aquaticus</i> -Polymerase
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethylethylendiamin
U	Units
v/v	Volumen pro Volumen
WB	Western-Blot
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen
xg	Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel

### 7.3 Firmenverzeichnis

**Tabelle 7.1:** Firmenverzeichnis

<b>Firmenname</b>	<b>Firmensitz</b>	<b>Verwendete Abkürzungen</b>
Adobe	München, D	
Air Liquide	Düsseldorf, D	-
Amersham Biosciences	Little Chalfont, GB	Amersham
B.Braun Biotech	Melsungen, D	-
BioRad Laboratories Inc.	Hercules, USA	BioRad
Carl-Roth GmbH	Karlsruhe, D	Roth
Carl-Zeiss Jena GmbH	Jena, D	Carl-Zeiss, Zeiss
Clontech	Mountain View, USA	-
Corel	Unterschleißheim, D	-
Difco	Kansas City, USA	-
ELMI laboratory equipment	Riga, L	ELMI
Eppendorf	Hamburg, D	-
Fermentas Life Sciences	St.Leon-Rot, D	Fermentas
Fisher Bioblock Scientific	Illirch Cedex, F	Bioblock
Fluka / Riedel-deHaen	Buchs, CH	Fluka
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	MaTek
Media Cybernetics	Silver Spring, USA	-
Memmert	Schwabach, D	-

**Tabelle 7.1:** Firmenverzeichnis (Fortsetzung)

<b>Firmenname</b>	<b>Firmensitz</b>	<b>Verwendete Abkürzungen</b>
Merck	Darmstadt, D	-
Microsoft	Redmond, USA	-
Millipore	Billerica, USA	-
Nalgene Cryo	Rochester, USA	Nalgene
New England Biolabs	Ipswich, USA	NEB
Nunc	Rochester, USA	-
Olympus	Hamburg, D	-
Pechiney-Plastic	Chicago, USA	-
Peqlab	Erlangen, D	-
Pharmacia-Biotech	Piscataway, USA	Pharmacia
Progen Biotechnik	Heidelberg, D	Progen
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	Sigma
Systat	Erkrath, D	-
Till Photonics	Gräfeling, D	-
Vincent Associates	Rochester, USA	-
WTW	Weilheim, D	-

## **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, den .....2006

Stefan Wöll