

Identifikation von Vimentin als humanes Katarakt-Gen

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Dipl.-Biochem. Martin Müller
aus
Erfurt

Bonn, Juli 2009

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. T. M. Magin
2. Gutachter: Prof. Dr. C. E. Müller

Tag der Promotion: 22.10.2009

Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben habe. Diese Arbeit wurde an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht. Die veröffentlichten Teile sind unter Eigene Publikationen angegeben.

Bonn, Juli 2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Gen- und Proteinfamilie der Intermediärfilamente	1
1.2	Intermediärfilament-Proteine und humane Erkrankungen	5
1.3	Vimentin	7
1.3.1	Vimentin-Gen	7
1.3.2	Vimentin Expression	7
1.3.3	Vimentin Proteinstruktur und Verteilung in der Zelle	8
1.3.4	Vimentinfunktion	10
1.3.5	Vimentin 'knock-out'-Maus	14
1.4	Struktur von Auge und Linse des Menschen	16
1.5	Katarakt	20
1.6	Zielsetzung	22
2	Material	24
2.1	Chemikalien	24
2.2	Allgemeine Lösungen und Puffer	24
2.3	Lösungen für die Nukleinsäureanalytik	24
2.4	Lösungen für die Proteinanalytik	25
2.5	Medien und Lösungen für die Kultivierung von Bakterien	27
2.6	Medien für die Kultivierung eukaryotischer Zellen	28
2.7	Lösungen für histologische Färbungen	29
2.8	Kommerzielle Reagenziensätze	29
2.9	Plasmide	29
2.10	Oligonukleotide	29
2.11	Größenstandards	30
2.12	Bakterienstämme	31
2.13	Eukaryotische Zelllinien	31
2.14	Mauslinien	32
2.15	Antikörper	32
2.16	Geräte	34
2.17	Sonstige Materialien	35
3	Methoden	36
3.1	Molekularbiologische Methoden	36
3.2	Zellkulturmethoden	45
3.3	Tierexperimentelle Methoden	47
3.4	Biochemische Methoden	48
3.5	Histologie und indirekte Immunfluoreszenzanalysen	56
3.6	Elektronenmikroskopie	59
3.7	Analyse von Kataraktpatienten	59
3.8	Computergestützte Analysen	60
4	Ergebnisse	62
4.1	Vimentinmutation im Mausmodell	62
4.1.1	Herstellung der Mauslinien und Analyse der transgenen Proteinexpression	62
4.1.2	Altersabhängige Proteinaggregation und Kataraktbildung	64
4.1.3	Veränderte Membranorganisation und zellkontextabhängige Proteinaggregation	66
4.1.4	Verstärkter Abbau der Vimentinaggregate sowie erhöhte Chaperon Expression und Proteasomaktivität	69
4.1.5	Unveränderte Expression und Organisation von 'beaded-filament'-Proteinen	73

4.2	Vimentin Antikörper Generierung und Charakterisierung	77
4.3	Vimentinmutation und humane Erkrankungen	80
4.3.1	Identifikation einer humanen Vimentinmutation	80
4.3.2	<i>In vitro</i> Charakterisierung der Vimentinmutation	82
4.3.3	Erzeugung und Charakterisierung von stabil transfizierten Fibroblastenzelllinien	85
4.3.4	Erzeugung und Charakterisierung einer Vimentin-defizienten Fibroblastenzelllinie	87
4.3.5	Analyse der Vimentinverteilung innerhalb der Zelle	89
4.4	Putative Vimentin-Protein-Interaktionen	94
5	Diskussion	102
5.1	Vimentinfunktion in der Maus	102
5.2	Vimentin und Katarakt im Menschen	107
5.2.1	Vimentinstruktur und Pathologie	107
5.2.2	Proteinaggregation und Mechanismen der Erkrankungen	110
5.2.3	Behandlung von Katarakten und Proteinaggregaten	113
5.3	Vimentin-Stat3-Interaktion	116
6	Ausblick	120
7	Zusammenfassung	122
8	Literaturverzeichnis	123
9	Anhang	139
9.1	Lebenslauf	139
9.2	Eigene Publikationen	140
9.3	Konferenzen	141
9.4	Workshops	141
9.5	Danksagung	142

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Darstellung der Einteilung der IF-Proteine.	2
Abb. 1.2:	Schematische Darstellung der IF-Domänenstruktur und Filamentbildung.	3
Abb. 1.3:	Schematische Darstellung der IF-Domänenstruktur und Sequenzidentität.	4
Abb. 1.4:	Modell der Vimentin-Dimerstruktur.	9
Abb. 1.5:	Schematische Darstellung Vimentin-interagierender Proteine und posttranslationaler Modifikationen.	11
Abb. 1.6:	Schematische Darstellung des menschlichen Auges und der Linse.	17
Abb. 1.7:	Klinisches Erscheinungsbild von Katarakten.	21
Abb. 4.1:	Vimentin Expressionskonstrukte und Augen Phänotyp.	63
Abb. 4.2:	Nachweis von transgenem Vimentin auf Maus Ohrschnitten.	64
Abb. 4.3:	Vimentinexpression in Organen transgener Mäuse.	64
Abb. 4.4:	Histologie der Augen von Vimentin wt und VimR113C transgenen Mäusen.	65
Abb. 4.5:	Altersabhängige Aggregat- und Kataraktbildung in Mauslinsen.	67
Abb. 4.6:	Ultrastruktur von Linsenfaserzellen in transgenen Mäusen.	68
Abb. 4.7:	Erhöhte Proteasomenaktivität und Reversibilität von Vimentinaggregaten <i>in vivo</i> .	70
Abb. 4.8:	Rekrutierung von Chaperonen in Mauslinsen als Folge der Expression von Vimentin Punktmutanten.	71
Abb. 4.9:	Unveränderte Caspaseaktivität und keine Transglutaminaseaktivität in Linsen und Zellen mit wt Vimentin sowie Vimentin-Punktmutanten.	72
Abb. 4.10:	Unveränderte Verteilung und Expression von 'beaded filament'-Proteinen in Mauslinsen.	74
Abb. 4.11:	Verteilung von Zytoskelett- und Vimentin-assoziierten Proteinen in Mauslinsen.	75
Abb. 4.12:	Normale Fokalkontakte in VimR113C Fibroblasten.	76
Abb. 4.13:	Immunfluoreszenz α -Vimentin auf 3T3-L1 Zellen.	78
Abb. 4.14:	Immunoblot α -Vimentin.	78
Abb. 4.15:	Immunfluoreszenz α -Vimentin auf Maus Leber Kryoschnitten.	79
Abb. 4.16:	Etablierung der α -GFAP Immunfluoreszenz und des Immunoblots α -HA.	80
Abb. 4.17:	Vimentin Struktur und Mutation.	81
Abb. 4.18:	Immunfluoreszenzanalyse von transient transfizierten MCF-7 Zellen.	83
Abb. 4.19:	Die missense Mutation E151K verursacht eine erhöhte Proteasomenaktivität in transient transfizierten MCF-7 Zellen.	84
Abb. 4.20:	Charakterisierung der Filament-bildungskinetik von E151K Vimentin.	84
Abb. 4.21:	Immunfluoreszenzanalyse stabil transfizierter 3T3 F442A Fibroblasten.	86
Abb. 4.22:	Immunoblotanalyse stabil transfizierter 3T3 F442A Fibroblasten.	86
Abb. 4.23:	Immunfluoreszenzanalyse von Vimentin und Keratin 19 in wt und vim ko ^{-/-} MEF Zellen.	88
Abb. 4.24:	Stapel von α -Vimentin Immunfluoreszenzbildern von 3T3-L1 Zellen.	89
Abb. 4.25:	Stapel von α -Vimentin Immunfluoreszenzbildern von MCF-7 Zellen, transient transfiziert mit wt Vimentin.	90
Abb. 4.26:	Stapel von α -Vimentin Immunfluoreszenzbildern von MCF-7 Zellen, transient transfiziert mit E151K Vimentin.	91
Abb. 4.27:	Stapel von α -Vimentin Immunfluoreszenzbildern von 3T3-L1 und MCF-7 Zellen.	92
Abb. 4.28:	Stapel von α -Vimentin Immunfluoreszenzbildern von MCF-7 Zellen, transient transfiziert mit wt- und R113C Vimentin.	93
Abb. 4.29:	Vorhersage Vimentin-bindender Proteindomänen.	95
Abb. 4.30:	Alignment der Aminosäuresequenzen der menschlichen Typ III IF-Proteine.	96
Abb. 4.31:	Alignment der Vimentin-Aminosäuresequenzen verschiedener Spezies.	97
Abb. 4.32:	Immunfluoreszenzanalyse der Vimentin 2B-Domäne und Stat3 in MCF-7 Zellen.	98
Abb. 4.33:	Immunfluoreszenzanalyse der Vimentin 2B-Domäne in MCF-7 Zellen.	98
Abb. 4.34:	Immunhistochemische Detektion von Stat3 in der Retina transgener Mäuse.	99

Abb. 4.35:	Erhöhte GFAP-Expression im Linsenepithel transgener Mäuse.	99
Abb. 4.36:	Partielle DNS-Sequenz des humanen GFAP-Lokus.	100
Abb. 5.1:	Modell der Proteinsekundärstruktur der 1A Domäne von humanem Vimentin.	104
Abb. 5.2:	Modell der Interaktion von Vimentin mit Fokalkontakt-Proteinen.	105
Abb. 5.3:	Schematische Darstellung der Vimentin 1B-Domäne als 'wheel'-Projektion.	110
Abb. 5.4:	Mechanismen der zellulären Reaktion auf Proteinaggregate.	111
Abb. 5.5:	Modell der Vimentin-abhängigen Regulation von Stat3-Zielgenen.	118

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström	mg	Milligramm
A. bidest	zweifach destilliertes Wasser	MHC	Major Histocompatibility Complex
Abb.	Abbildung	min	Minute(n)
abs.	absolut	ml	Milliliter
Amp	Ampizillin(-Resistenzgen)	mM	Millimolar
APS	Ammoniumpersulfat	MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
ATCC	American Type Culture Collection	mRNS	Boten-RNS
ATP	Adenosintriphosphat	µg	Mikrogramm
A _x	Absorption bei der Wellenlänge x in nm	µl	Mikroliter
BCA	Bicinchoninsäure	Neo	Neomycin(-Resistenzgen)
Bp	Basenpaare	NF-L	Neurofilament L
BSA	Rinder Serumalbumin	NGS	Ziegennormalserum
cm	Zentimeter	nm	Nanometer
CMV	Cytomegalovirus	N-Terminus	aminotermiales Ende eines Peptids
C-Terminus	carboxyterminales Ende eines Peptids	OD _x	optische Dichte bei Wellenlänge x in nm
°C	Grad Celsius	P0	postnatal
Da	Dalton	PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
DAPI	4,6-Diamino-2-phenylindol	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
DEPC	Diethylpyrocarbonat	PFA	Paraformaldehyd
DMSO	Dimethylsulfoxid	pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
DNase	Desoxyribonuklease	poly(A)/pA	Polyadenylierungssignal/ Polyadenylierungsstelle
DNS	Desoxyribonukleinsäure	RNase	Ribonuklease
dNTP	2'-desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat	RNS	Ribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen	RT	Raumtemperatur/ Reverse Transkription
DTT	Dithiothreitol	SB	Natrium-Borat Puffer
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	SDS	Natriumdodecylsulfat
EBS	Epidermolysis bullosa simplex	sek	Sekunde
ECL	enhanced Chemilumineszenz	SOC	SOB (super optimal broth) Medium mit 20 mM Glukose
ED	Embryonaltag	Src	Tyrosinkinase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	Stat	Signal Transducer and Activator of Transcription
eGFP	enhanced green fluorescent protein	SV40	Simian Virus 40
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β-aminoethylether)-tetraessigsäure	TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
EMT	epitheliale mesenchymale Transition	TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
Erk	extracellular signal-regulated kinase	TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
EtOH	Ethanol	TE	Tris-EDTA Puffer
FCS	fötale Kälberserum	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
FLAG	Peptide Epitop	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
g	Gravitationskraft	U	Enzymeinheit (Unit)
g	Gramm	ÜN	über Nacht
G418	Geneticin	Upm	Umdrehungen pro Minute
GFAP	glial fibrillary acidic protein	UTR	untranslatierter Bereich
h	Stunde(n)	UV	ultraviolett
HA	Hämagglutinin	V	Volt
Hsp70	Hitzeschockprotein 70	v/v	Volumen pro Volumen
IF	Intermediärfilament(e)	Vim	Vimentin
kB	Kilobasenpaare (1000 Bp)	Vol.	Volumen
kDa	Kilodalton (1000 Da)	w/v	Gewicht pro Volumen
l	Liter	wt	Wildtyp
LB-Medium	Luria-Bertani Medium		
LDL	Low density lipoprotein		
Lsg.	Lösung		
M	Molar		
mA	Milliampere		
MCS	Vielfachklonierungsstelle		
MEF	murine embryonale Fibroblasten		

1 Einleitung

1.1 Gen- und Proteinfamilie der Intermediärfilamente

Genfamilien kodieren oft strukturell ähnliche Proteine mit unterschiedlichen Funktionen und sind eine Eigenschaft der evolutionären Entwicklung der Metazoa, zusammen mit einer Vielzahl von spezialisierten Zelltypen. Eine große Genfamilie, mit etwa 70 Mitgliedern im Menschen, der Maus und anderen Säugetieren, kodiert für die Intermediärfilament (IF) Proteine (Hesse et al., 2001). IF bilden zusammen mit Mikrotubuli, Mikrofilamenten und assoziierten Proteinen das Zytoskelett der Eukaryoten. Mit einem Durchmesser von 10-12 nm liegen sie in der Größe zwischen Aktin-Mikrofilamenten (8 nm) und Mikrotubuli (25 nm) (Strelkov et al., 2003), was ihnen den Namen Intermediärfilamente gab. Im Gegensatz zu den globulären Proteinen Aktin und Tubulin sind IF-Proteine stäbchenförmig und besitzen weder enzymatische Aktivität noch strukturelle Polarität. Desweiteren kommen IF-Proteine sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern vor und zeigen eine deutlich größere Diversität als Aktin und Tubulin.

Basierend auf ihrer Genstruktur und Sequenzhomologie werden die IF-Proteine in 6 Subgruppen unterteilt (Fuchs and Weber, 1994; Herrmann and Aebi, 2000). Typ I und II repräsentieren die Keratine, Typ III die Proteine GFAP, Desmin, Vimentin und Peripherin. Die Gruppe der Typ IV IF-Proteine besteht aus den Neurofilamentproteinen, α -Internexin, Nestin und Synemin. Zusammen umfassen die Gruppen I-IV die zytoplasmatischen IF-Proteine. Typ V bilden die IF-Proteine des Zellkerns, die Lamine. CP49 und Filensin, spezielle zytoplasmatische IF-Proteine des Auges, bilden die Gruppe VI (Abb. 1.1).

Alle IF-Proteine haben einen dreigeteilten Domänenaufbau, mit einer zentralen, 310 Aminosäuren langen, α -helikalen 'rod'-Domäne, die von nicht- α -helikalen N- und C-terminalen Domänen flankiert wird (Abb. 1.2) (Herrmann and Aebi, 2004). Die N- und C-terminalen Domänen, oft auch Kopf und Schwanz genannt, zeigen die größte Sequenzvariabilität zwischen den IF-Proteinen. Aufgrund der großen Variabilität wird angenommen, daß vor allem diese Bereiche für die Protein-spezifischen Funktionen in verschiedenen Zelltypen verantwortlich sind (Kim and Coulombe, 2007). Die 'rod'-Domäne weist eine Periodizität der Aminosäuren alle 7 Reste auf (abcdefg)_n. Dabei sind die Positionen a und d bevorzugt mit kleinen apolaren Aminosäuren besetzt (Strelkov et al., 2003). Diese sogenannte Heptadenwiederholung ist die

Typ	Protein	kDa	Expression
I	Keratin 9-20	40-64	Epithelien, Heteropolymer aus Typ I und II
II	Keratin 1-8	52-68	Epithelien
III	Vimentin	55	mesenchymale Zellen
	Desmin	53	Muskelzellen
	Peripherin	54	Neuronen
	GFAP	52	Gliazellen, Astrozyten
IV	NF-L, M, H	61-110	Neuronen
	α-Internexin	66	Neuronen
	Nestin	177	Muskelzellen, neuronale Stammzellen
	Synemin	182	Muskelzellen, Linse
	Syncoilin	54	Muskelzellen
V	Lamin A/C	62-78	nuklear Lamina
	Lamin B1/B2	66-68	nuklear Lamina
VI	Filensin	83	Linse, Kopolymer mit CP49
	CP49	47	Linse

Abb. 1.1: Darstellung der Einteilung der IF-Proteine. Für die einzelnen Proteine sind die Untergruppe, Molekulargewicht und exprimierenden Zellen aufgelistet. Die Keratine der Haare und Nägel sind nicht dargestellt.

charakteristische Eigenschaft von coiled-coil Proteinstrukturen. Historisch gesehen war die erste durch Beugung von Röntgenstrahlung ermittelte coiled-coil Struktur die des IF-Proteins Keratin (Crick, 1952). Coiled-coil Domänen sind ein häufiges Strukturelement in α -helikalen Proteinen (Burkhard et al., 2001) und entstehen, wenn 2 oder mehr α -Helices sich umeinander schlingen und eine Art Superhelix bilden. Innerhalb der verschiedenen IF-Proteine sind die beiden Enden der coiled-coil-bildenden 'rod'-Domäne besonders stark konserviert. Diese Bereiche sind essentiell für die Dimerisierung der Vimentinmoleküle (Herrmann and Aebi, 2004). Allerdings sind auch die nicht-helikalen Domänen für die Filamentbildung entscheidend, da z.B. ein mutantes Vimentin ohne 'Kopf'-Domäne nur Tetramere, aber keine langen Filamente ausbilden kann (Herrmann et al., 1996; Mücke et al., 2004).

Unter physiologischen Bedingungen bilden IF-Proteine ausgestreckte filamentöse Netzwerke, die das gesamte Zytoplasma, bzw. im Fall der Lamine den Zellkern, ausfüllen (Abb. 4.13). Diese Netzwerke sind dynamische Strukturen, die vor allem durch posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierung, moduliert werden (Helfand et al., 2003; Inagaki et al., 1997; Sihag et al., 2007; Windoffer and Leube, 1999). Im Aufbau der Filamente unterscheiden sich Keratine, die obligatorisch Heteropolymere aus Typ I und II bilden, und Typ III IF-Proteine Vimentin, GFAP, Desmin und Peripherin, die bevorzugt Homopolymere formen (Abb. 1.1)

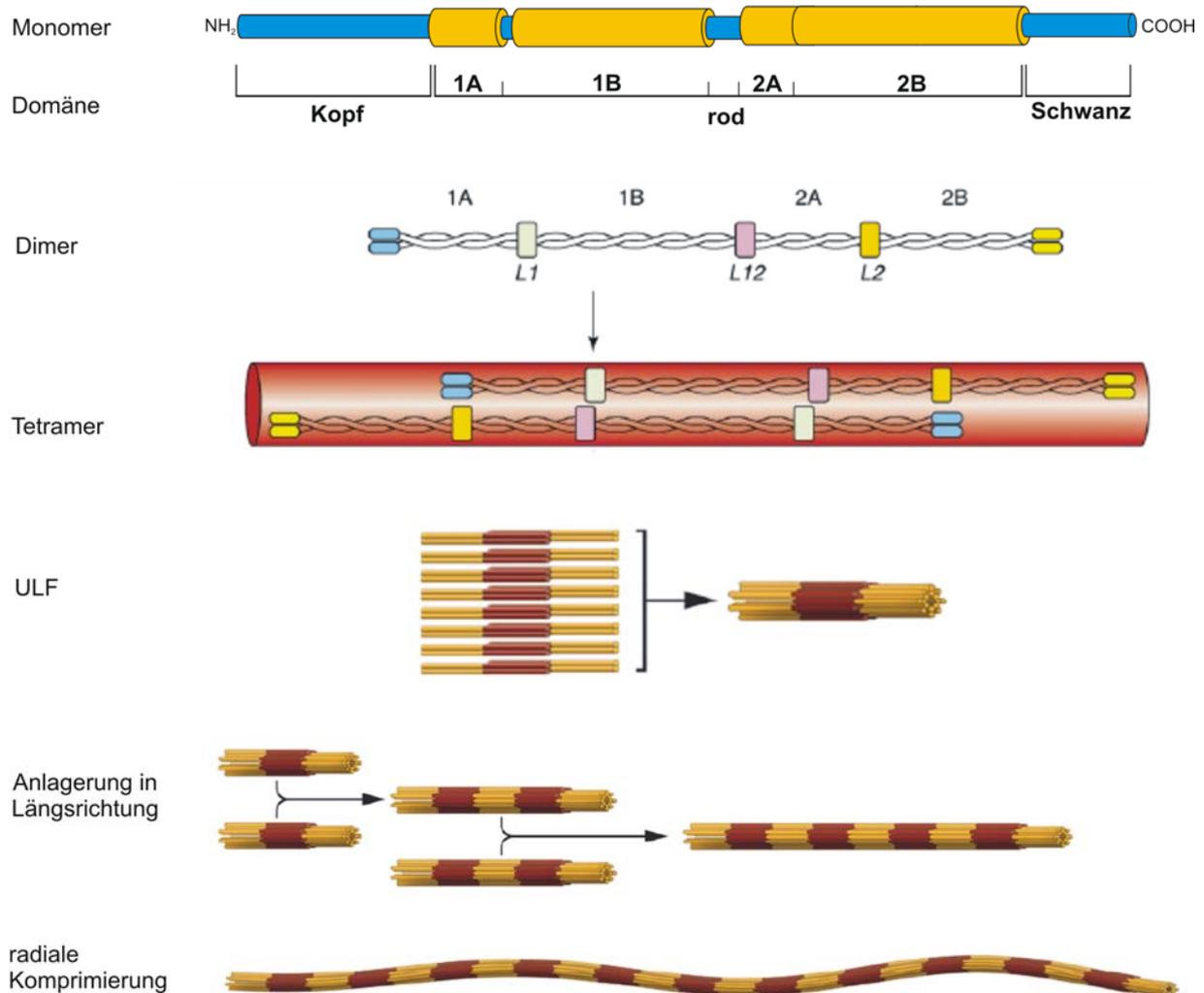


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der IF-Domänenstruktur und Filamentbildung. Das Modell basiert auf *in vitro* Assemblierungsexperimenten mit rekombinantem Vimentin. Die Filamentbildung beginnt mit der Bildung von parallelen α -helikalen coiled-coil Dimeren. Dimere verbinden sich lateral zu anti-parallelen Tetrameren und weiter zu Protofilamenten, bei denen sich die 1B-Domänen gegenüber liegen. Die Protofilamente werden auch als ULF (unit length filaments) bezeichnet und bilden durch seitliche Anlagerung lange Filamente aus. Diese werden in einem finalen Komprimierungsschritt zu fertigen Filamenten prozessiert. Die Bezeichnungen 1A, 1B, 2A, 2B entsprechen den Subdomänen der zentralen Vimentin 'rod'-Domäne. L1, L12 und L2 bezeichnen die Linker zwischen den Subdomänen. Modifiziert nach (Godsel et al., 2008) und (Herrmann et al., 2009).

(Parry et al., 2007). Zusätzlich können Typ III IF-Proteine mit den neuronalen, Typ IV IF-Proteinen, wie z.B. den Neurofilamentproteinen und Nestin, Kopolymere bilden. Vimentin wird in verschiedenen Geweben mit anderen IF-Proteinen koexprimiert und kann Heteropolymere mit Desmin, Synemin, Nestin und GFAP bilden (Abb. 1.1) (Granger and Lazarides, 1984; Michalczyk and Ziman, 2005; Robson et al., 2004). Die Filamentbildung von IF-Proteinen konnte durch *in vitro* Assemblierungsexperimente analysiert werden. Dabei zeigten sich 3 entscheidende Schritte. Durch parallele Anlagerung zweier α -helikaler 'rod'-Domänen entsteht ein Dimer mit typischer coiled-coil Struktur. Zwei Dimere verbinden sich lateral zu anti-parallelen

Tetrameren, der kleinsten *in vivo* nachweisbaren löslichen Oligomereinheit von IF-Proteinen (Soellner et al., 1985). Tetramere lagern sich *in vitro* in weniger als einer Sekunde lateral zu ULFs (unit length filaments) zusammen (Abb. 1.2). Im zweiten Schritt lagern sich innerhalb einer Minute ULFs in Längsrichtung aneinander und bilden lange, lose gepackte Filamente. Während sich die Filamente weiter verlängern, reduziert sich im letzten Schritt ihr Durchmesser und es entstehen kompakte Filamente (Herrmann and Aebi, 2000; Herrmann and Aebi, 2004). Obwohl es für jedes spezifische IF-Protein geringe Unterschiede in der Filamentbildung gibt, ist bisher nicht klar, wie sich kleine Unterschiede in der Primärsequenz auf die Filamentbildung, die Struktur sowie die Dynamik und Funktion auswirken. Beispielhaft ist in Abb. 1.3 die Sequenzidentität der humanen Vimentin und Desmin-Proteinsequenz dargestellt.

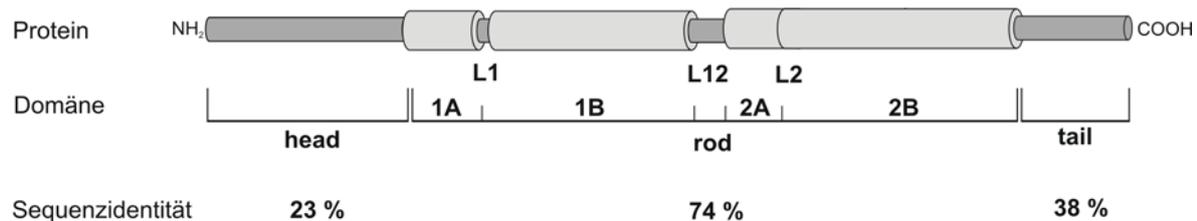


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der IF-Domänenstruktur und Sequenzidentität. Buchstaben kennzeichnen die Subdomänen und Linker der 'rod'-Domäne. Die Sequenzidentität ist für die Domänen der humanen Vimentin und Desmin-Proteinsequenz angegeben.

Aktin und Mikrotubulofilamente können durch Substanzen wie Cytochalasin und Nocodazol polymerisiert oder depolymerisiert werden. Ähnliche Moleküle sind für IF-Proteine bisher nicht bekannt. Die Aufklärung der Funktion der IF-Proteine erweist sich aufgrund ungewöhnlicher biochemischer Eigenschaften, wie z.B. sehr geringe Löslichkeit, und der funktionellen Redundanz innerhalb der Proteinfamilie, als schwierig (Coulombe and Wong, 2004). Durch die Etablierung transgener Mausmodelle konnte demonstriert werden, daß die Gewährleistung der strukturellen und mechanischen Stabilität der Zelle, sowie der Schutz der Zelle gegen verschiedene Formen von Streß die grundlegende Eigenschaft der IF-Proteine darstellt (Fuchs and Cleveland, 1998). Zusätzlich zu ihren strukturellen Funktionen sind IF-Proteine auch in die unterschiedlichsten zellulären Prozesse, wie z.B. Apoptose, Zellmigration, Reaktion auf metabolischen Streß, Vesikeltransport und Zelladhäsion, involviert (Coulombe and Wong, 2004; Kim and Coulombe, 2007; Magin et al., 2007; Toivola et al., 2005). Desweiteren wird zunehmend klar, daß zur allgemeinen strukturellen Funktion individuelle IF-Proteine, zusätzlich zu ihrer

Zelltyp-spezifischen Expression, auch spezifische Funktionen in einzelnen Geweben haben (Abb. 1.3) (Herrmann et al., 2007). Auch die Interaktion von IF-Proteinen mit dem Aktin- und Mikrotubulizytoskelett sowie mit einer Vielzahl IF-bindender Proteine wird als entscheidend für ihre diversen Funktionen angenommen (Ivaska et al., 2007; Magin et al., 2007; Pallari and Eriksson, 2006). Kapitel 1.2 geht auf die Funktionen von IF-Proteinen im Zusammenhang mit Erkrankungen ein, sowie Kapitel 1.3.4 auf die Funktionen von Vimentin.

1.2 Intermediärfilament-Proteine und humane Erkrankungen

Die Hauptfunktion von IF-Proteinen besteht im Schutz der Zellen vor mechanischem und anderen Formen von Streß. Einzelne IF-Proteine haben wie in 1.1 dargestellt in verschiedenen Zelltypen zusätzliche Funktionen. Diese Funktionen wurden durch Studien mit Gen-'knock-out' und transgenen Mäusen, die dominante Keratinmutationen exprimierten, nachgewiesen (Fuchs and Cleveland, 1998; Herrmann et al., 2007). Dabei wird die Funktion des endogenen Proteins durch das mutierte Protein gestört und somit ein Effekt erzeugt, der sich gravierender auf die Funktion auswirkt als der komplette Verlust des nativen Proteins (Herskowitz, 1987). Es stellt sich daher für die große Familie der IF-Proteine die Frage nach einem Bezug von Mutationen in IF-Proteinen und humanen Erkrankungen. Der mögliche Bezug wurde erstmals durch eine dominante Mutation im Keratin14 Gen der Maus gezeigt (Vassar et al., 1991). Die transgenen Mäuse hatten Proteinaggregate des Zytoskeletts in der Basalschicht der Epidermis und zeigten eine starke Blasenbildung der Haut sowie Zytolyse. Dies spiegelt die Pathologie der humanen Erkrankung Epidermolysis bullosa simplex (EBS) wider. Kurz darauf wurden auch Mutationen im humanen Keratin14 Gen als eine Ursache für EBS identifiziert (Coulombe et al., 1991). Seitdem konnten mehr als 30 verschiedene Krankheiten mit Mutationen in den Genen von IF-Proteinen assoziiert werden. So verursachen z.B. Mutationen in 19 verschiedenen Keratinen Keratinopathien, Mutationen in Desmin und Lamin A Desminopathien bzw. Laminopathien, sowie Mutationen in GFAP die Alexandersche Krankheit (Bär et al., 2004; Irvine, 2005; Kim and Coulombe, 2007; Liem and Messing, 2009; Magin et al., 2004; Omary, 2009).

Trotz der unterschiedlichen klinischen Erscheinungsbilder von IF-Erkrankungen zeigen sich doch gemeinsame Prinzipien. Es handelt sich um monogene

Erkrankungen mit einem relativ seltenen Auftreten bei einer Entität in 25.000 bis 100.000 Personen und sie betreffen in der Regel nur das jeweilige IF-exprimierende Gewebe (Fuchs, 1997; Irvine, 2005; Magin et al., 2004). Die Gewebeidentität bleibt trotz intensiver Reparaturmechanismen erhalten und IF-Proteine sind bisher weder als Onkogene noch als Tumorsuppressor-Gene identifiziert worden (Magin et al., 2004). In den meisten Fällen zerstören Punktmutationen in IF-Proteinen die normale Organisation des Zytoskeletts und führen zur Bildung von zytoplasmatischen Proteinaggregaten. Insbesondere nach Einwirkung von Streß verursacht ein verändertes Zytoskelett eine erhöhte Zellfragilität in der Epidermis, dem Herz- oder Skelettmuskel, abhängig vom betroffenen IF-Protein (Kim and Coulombe, 2007; Uitto et al., 2007). Proteinaggregate sind nicht nur typisch für IF-Erkrankungen wie EBS oder die Alexandersche Krankheit, sondern sind auch charakteristisch für viele neurodegenerative Erkrankungen, weshalb man auch von Protein-Konformationserkrankungen spricht. Obwohl die der Aggregation zugrunde liegenden Pathomechanismen noch nicht vollständig verstanden sind, geht man davon aus, daß Fehler in den Mechanismen der Protein-Qualitätskontrolle eine Rolle spielen. Einen Hinweis darauf liefert neben dem fehlgefalteten Protein das Vorhandensein von Ubiquitin, Proteinen des Proteasomenkomplexes und Chaperonen in den Proteinaggregaten (Aigelsreiter et al., 2007). Aggregationserkrankungen werden von der Induktion von Chaperonen begleitet. Ob das auch für IF-Proteine gilt, ist bisher nicht geklärt.

Interessanterweise können Krankheiten mit einem ähnlichen Phänotyp wie die entsprechende IF-Mutation auch durch Mutationen in einem IF-bindenden Protein, wie z.B. in Lamin-assoziierten Proteinen, Hitzeschockproteinen (Hsps), Kristallinen oder in Proteinen der Plakin-Familie, die an Desmosomen Keratine mit Cadherinen verbinden, entstehen (Magin et al., 2004; Omary et al., 2004). Mutationen im gleichen IF-Gen können, je nach Lage im betroffenen Protein, unterschiedliche Phänotypen auslösen (Lane and McLean, 2004). So führen Mutationen in Domänen, die für die Filamentbildung oder für Protein-Protein-Interaktionen wichtig sind, oft zu stärker ausgeprägten Krankheitsbildern (Magin et al., 2004). Dies trifft insbesondere für die beiden Enden der α -helikalen 'rod'-Domäne zu, deren Aminosäuresequenz zwischen den IF-Proteinen besonders stark konserviert, und essentiell an der Filamentbildung beteiligt ist (Abb. 1.3) (Herrmann and Aebi, 2004; Smith, 2003). Eine besonders häufig festgestellte Mutation, die in etwa 20 % aller Keratinopathien und

insbesondere bei EBS auftritt, liegt im Kodon der Aminosäure Arginin¹²⁵ des Keratin¹⁴ (Lane and McLean, 2004; Magin et al., 2004).

Die Abwesenheit von Vimentin in der Maus führt zu keinem letalen Phänotyp und verursacht nur unter Stressbedingungen eine Reihe von pathologischen Veränderungen (Colucci-Guyon et al., 1994; Pekny and Lane, 2007) (siehe auch 1.3.5). Vimentin könnte daher besonders unter Stressbedingungen eine wichtige Funktion ausüben. Da die Effekte von Vimentinmutationen *in vivo* bisher nicht untersucht worden sind, wurde in Analogie zur häufigsten humanen Keratinmutation die Vimentinmutation R113C entworfen. Dabei sollten in einem transgenen Mausmodell aus der engen Verwandtschaft der Keratin- und Vimentinstruktur neue Erkenntnisse über die Funktion von Vimentin in humanen Erkrankungen und über eine mögliche Konservierung der Pathomechanismen gewonnen werden.

1.3 Vimentin

1.3.1 Vimentin-Gen

Vimentin gehört zur Genfamilie der Intermediärfilament (IF) Proteine. Das IF-Protein in Fibroblasten wurde zuerst von (Franke et al., 1978) isoliert und Vimentin genannt. Baserga und Kollegen sequenzierten und beschrieben erstmals das humane Vimentin (Ferrari et al., 1986). Nach der Entschlüsselung des humanen Genomes zeigte sich, daß sich nur eine einzelne Kopie des Vimentingens auf Chromosom 10 befindet (Hesse et al., 2001). Trotz vorhandener alternativer Spliceseiten wurden bisher keine funktionalen alternativen Spliceprodukte von Vimentin nachgewiesen.

1.3.2 Vimentin Expression

Wie alle IF-Proteine wird Vimentin differentiell und in zelltypspezifischer Weise exprimiert. Im adulten Organismus wird Vimentin vorwiegend in den Zellen und Geweben mesenchymalen Ursprungs gebildet (Bachmann et al., 1983; Colucci-Guyon et al., 1994). Während der Embryonalentwicklung wird es dagegen in vielen anderen Zellen vorübergehend synthetisiert. In der Maus ist Vimentin ab dem Embryonaltag E8,5 im parietalen Endoderm, in primären Mesenchymzellen, die vom embryonalen Ektoderm abstammen, und in Neuralleistenzellen nachweisbar

(Cochard and Paulin, 1984; Franke et al., 1982; Lane et al., 1983). Ab Embryonaltag E9 ist Vimentin das zuerst exprimierte IF-Protein in den Zellen, die zu Muskel- oder Nervenzellen differenzieren (Cochard and Paulin, 1984; Furst et al., 1989) und wird im weiteren Verlauf der Histogenese durch andere IF-Proteine ersetzt. Im Muskelgewebe wird Vimentin durch Desmin ersetzt, in Neuronen durch Neurofilamentprotein NF-L und in Astrogliazellen durch GFAP. In einigen Astrozyten bleibt allerdings auch im adulten Organismus eine Koexpression von Vimentin und GFAP erhalten (Lazarides, 1982). Ebenso wird bei Verletzungen des Zentralnervensystems (ZNS) in reaktiven Astrozyten wieder vermehrt Vimentin exprimiert (Takamiya et al., 1988). Vimentin wird in allen Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems gebildet, wobei die Vimentinexpression je nach Zelltyp transient bis dauerhaft ist (Dellagi et al., 1983). Weiterhin wird Vimentin neben Fibroblasten, Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen auch in wenigen epitheloiden Geweben, wie dem Linsenepithel des Auges, exprimiert (Ramaekers et al., 1980). Schließlich wird Vimentin in vielen Zelllinien in Kultur sowie von vielen Tumoren, zusätzlich zum gewebetypischen IF-Protein dieser Zellen, synthetisiert (Franke et al., 1979; Osborn and Weber, 1983). Daher wird die Vimentinexpression in der Pathologie auch als Tumormarker verwendet, der den Übergang von epithelialen zu mesenchymalen Eigenschaften der Zellen (EMT) anzeigt (Kokkinos et al., 2007; Mandal et al., 2008).

1.3.3 Vimentin Proteinstruktur und Verteilung in der Zelle

Vimentin zeigt einen sehr hohen Grad an Sequenzidentität zwischen den Spezies. Diese reicht von Knorpelfischen bis zum Menschen und unterstreicht eine wichtige und evolutionär konservierte Funktion von Vimentin (Fuchs and Weber, 1994; Hesse et al., 2001) (siehe auch Abb. 4.17 C und 4.31). Vimentin hat eine dreigeteilte Domänenstruktur mit einer zentralen α -helikalen 'rod'-Domäne, die von nicht- α -helikalen N- und C-terminalen Domänen flankiert wird (Herrmann and Aebi, 2004). Die 'rod'-Domäne wird unterteilt in 4 Subdomänen 1A, 1B, 2A und 2B, die von kurzen Linkern unterbrochen werden (Abb. 1.2). Für die Filamentbildung ist die 'rod'-Domäne essentiell, da sich einzelne Vimentinmoleküle zu coiled-coil Strukturen zusammenlagern (siehe auch 1.1). Von einzelnen Bereichen der 'rod'-Domäne konnte eine Kristallstruktur gewonnen werden (Strelkov et al., 2002), die zusammen mit Daten aus Ultrazentrifugations- und *in vitro* Assemblierungsexperimenten eine

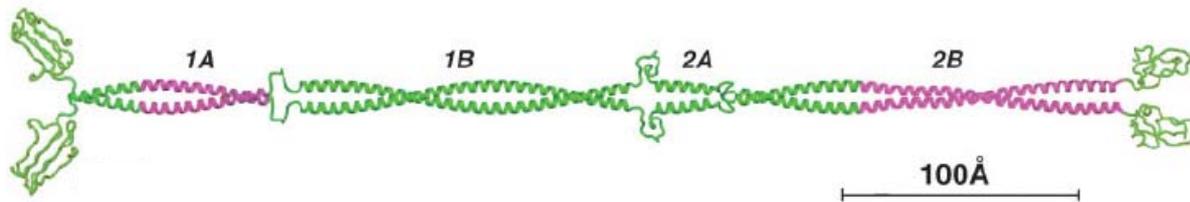


Abb. 1.4: Modell der Vimentin-Dimerstruktur.

Die Buchstaben kennzeichnen die Subdomänen der α -helikalen 'rod'-Domäne. Violett sind die Bereiche des Vimentinmoleküls gekennzeichnet, für welche bisher eine Kristallstruktur vorliegt. Nach (Strelkov et al., 2002).

molekulare Darstellung der Vimentinstruktur erlaubt (Herrmann and Aebi, 2004) (Abb. 1.4).

In der Zelle bildet Vimentin ein ausgedehntes irreguläres Filamentsystem (Abb. 4.13), das den Zellkern, Organellen und die Plasmamembran verbindet sowie über assoziierte Proteine mit Aktin- und Mikrotubulifilamenten wechselwirken kann (Evans, 1998; Helfand et al., 2003; Svitkina et al., 1996). Dieses IF-Netzwerk ist eine dynamische Struktur, die als Reaktion auf verschiedene Signale immer wieder reorganisiert wird. Dabei stehen Vimentinpolymere mit einem kleinen Anteil löslicher Vimentinmoleküle im Gleichgewicht (Chou et al., 2007). Durch Experimente mit GFP-markiertem Vimentin in Zellkultur konnte gezeigt werden, daß unpolymerisiertes Vimentin mit den Motorproteinen Kinesin und Dynein interagiert und entlang von Mikrotubuli transportiert wird (Pralhad et al., 1998; Yoon et al., 1998).

Desweiteren beeinflussen posttranslationale Modifikationen, insbesondere Phosphorylierung, die Filamentbildung, modulieren bestehende Vimentinfilamente sowie die Interaktion mit anderen Proteinen (Inagaki et al., 1997; Izawa and Inagaki, 2006; Sihag et al., 2007). *In vitro* und in kultivierten Zellen interagiert eine Vielzahl von verschiedenen Kinasen, wie Proteinkinase A und C, Calmodulin-abhängige Kinase II (CAMK), p21-aktivierte Kinase (PAK) und Cyclin-abhängige Kinase 1 (Cdk1) mit Vimentin und phosphorylieren Serinreste in der N-terminalen 'Kopf'-Domäne (Inagaki et al., 1996; Izawa and Inagaki, 2006). Dabei bewirkt die Phosphorylierung eine Destabilisierung und Depolymerisierung bestehender Filamente, wobei lösliche Vimentin-Tetramere freigegeben werden (Eriksson et al., 2004). Besonders gut untersucht ist die Vimentinphosphorylierung während der Mitose, die einen zeitlich und räumlich eng durch Phosphorylierung regulierten Prozeß darstellt. Während der Prometaphase wird die Aminosäure Ser55 durch Cdk1 phosphoryliert. In der Metaphase bindet dann die Polo-like Kinase (Plk1) diesen Phosphoserinrest, wird dadurch aktiviert und phosphoryliert wiederum Ser82. Aurora-B und Rho-Kinase

phosphorylieren Vimentin an Position Ser71 und Ser72 während der Anaphase bis zur Zytokinese. Die durch Phosphorylierung induzierte Depolymerisierung des Vimentinfilamentsystems ist dabei entscheidend für die Verteilung von Vimentin auf die beiden Tochterzellen (Izawa and Inagaki, 2006; Sihag et al., 2007). Die Mutation der beiden Serinreste zu Alanin führt in Zellkultur zu Zytokinesedefekten.

Vimentinfilamente können auch durch Interaktionen mit Caspasen irreversibel moduliert werden. Eine in vielen IF-Proteinen konservierte Caspase6-Interaktionsstelle liegt in der Linkerregion L₁₂ der 'rod'-Domäne (Marceau et al., 2007). In Zellkulturexperimenten wird Vimentin durch die Caspasen 3, 6 und 7 proteolytisch gespalten und die Vimentinfragmente wirken verstärkend auf die Aktivität der Caspasen und dadurch auf den Apoptosesignalweg (Byun et al., 2001). Ob dies durch den extrinsischen oder intrinsischen Apoptosesignalweg geschieht, ist nicht geklärt.

1.3.4 Vimentinfunktion

Vimentin ist das IF-Protein aller Gewebe mesenchymalen Ursprungs. Die Hauptfunktion besteht in der Stabilisierung der Zellen durch Ausbildung eines suprazellulären Zytoskeletts und der Sicherstellung der Gewebeintegrität durch Interaktion mit Adhäsionsstrukturen (Herrmann et al., 2003). Über weitere *in vivo* Funktionen ist trotz Expression in einer Vielzahl von Zellen nur wenig bekannt, was insbesondere an den nur subtilen Effekten der Vimentin 'knock-out'-Maus liegt (Colucci-Guyon et al., 1994). Die an der 'knock-out'-Maus beobachteten Effekte und damit verbundenen Funktionen sind in Abschnitt 1.3.5 dargestellt.

Weitere Informationen über mögliche Vimentinfunktionen in der Zelle wurden durch Identifizierung und Charakterisierung von Vimentin-interagierenden Proteinen und durch die Untersuchung von Vimentin-defizienten Zelllinien gewonnen. Dabei werden putative Funktionen von Vimentin durch eine Beteiligung an Signaltransduktion, Lipidmetabolismus, Zelladhäsion und Migration oder an Transportvorgängen in der Zelle postuliert (Ivaska et al., 2007; Kim and Coulombe, 2007; Pallari and Eriksson, 2006; Toivola et al., 2005). Wichtige Gruppen von Proteinen, die mit Vimentin interagieren, sind in Abb. 1.5 zusammengefaßt und sollen im Folgenden erläutert werden.

Vimentin steht in der Zelle mit anderen Proteinen des Zytoskeletts und den Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten in Verbindung. Eine wichtige Gruppe von 'Linker'-

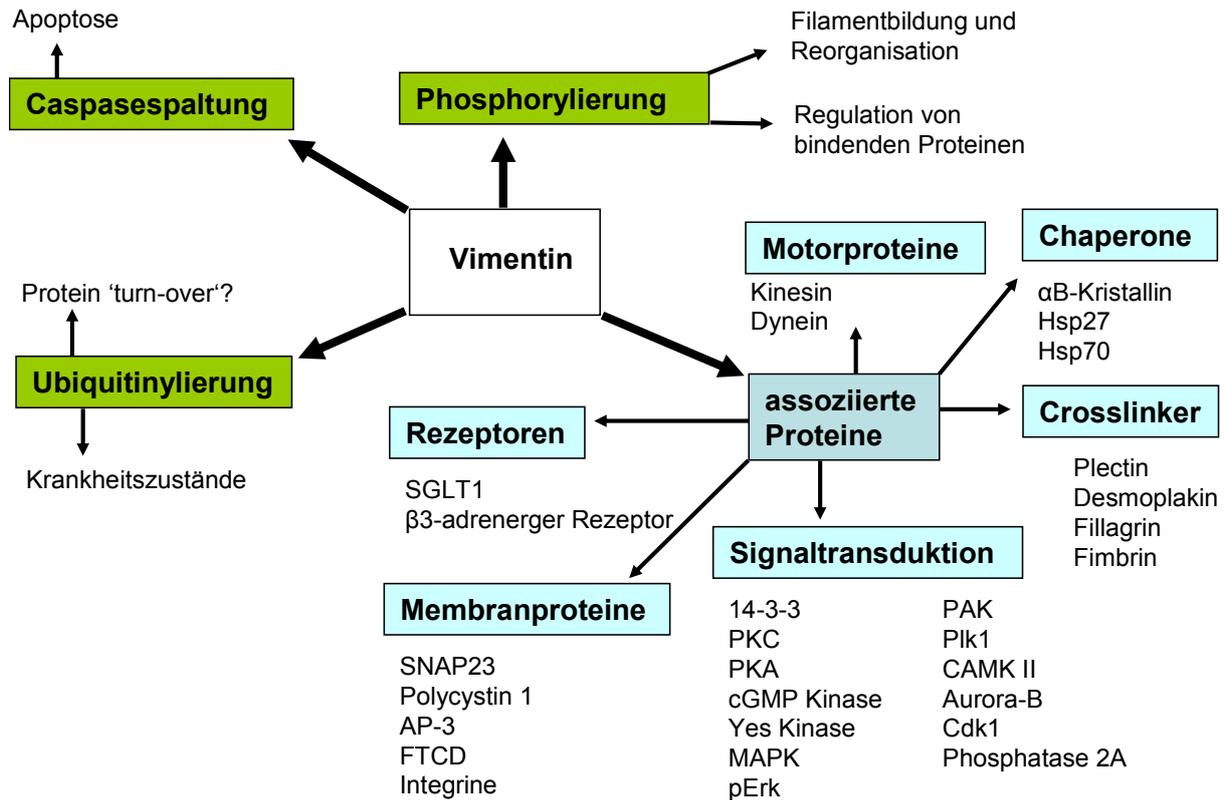


Abb. 1.5: Schematische Darstellung Vimentin-interagierender Proteine und posttranslationaler Modifikationen.

Vimentin interagiert mit einer Vielzahl unterschiedlicher Proteine, die in der Abbildung nach ihren Funktionen gruppiert wurden. Die physiologische Relevanz einiger Interaktionen ist noch nicht geklärt. Erläuterungen im Text.

Proteinen, die IF mit Aktinfilamenten und Mikrotubuli verbinden, sind die Proteine der Plakin-Familie. Für Plectin wurde gezeigt, daß es Vimentin mit Aktinfilamenten, Mikrotubuli und Membran-Adhäsionskomplexen verknüpft (Foisner et al., 1995; Svitkina et al., 1996). Das Aktin-bindende Protein Filamin kolokalisiert mit Vimentin und verbindet so möglicherweise Vimentin- mit Aktinfilamenten (Brown and Binder, 1992). Vimentin beeinflusst die Zelladhäsion durch Regulation von Integrinen, die als Transmembranrezeptoren Zell-Zell und Zell-Substratkontakte sicherstellen. In Endothelzellen kann Vimentin direkt und indirekt mit verschiedenen Zelladhäsionskomplexen interagieren (Green et al., 2005; Ivaska et al., 2007). So verbindet das Adapterprotein Plectin Vimentin mit α 6 β 4 Integrin-enthaltenden Fokalkontakten (Homan et al., 2002). Desweiteren wurde eine Interaktion mit α 2 β 1 und α v β 3 Integrin-exprimierenden Fokalkontakten (Gonzales et al., 2001; Kreis et al., 2005; Tsuruta and Jones, 2003) nachgewiesen, wobei Vimentin die Größe von Fokalkontakten und die Adhäsionsstärke der Zellen beeinflusst (Tsuruta and Jones, 2003). Außerdem kann Synemin, ein Typ IV IF-Protein, durch Interaktion mit Talin und Vinculin Vimentin an Fokalkontakte binden (Uyama et al., 2006). In den Zellen

der humanen Hirnhaut wird Vimentin zudem durch Desmoplakin, einem weiteren Mitglied der Plakin-Proteinfamilie, an Desmosomen gekoppelt (Kartenbeck et al., 1984).

Vimentin ist auch an der Migration von Zellen, vor allem durch Modulation der Adhäsion und der Verformbarkeit der Zellen, beteiligt. So konnte gezeigt werden, daß Vimentin entscheidend für die Adhäsion und Migration von Immunzellen, speziell von Leukozyten und Lymphozyten, ist (Nieminen et al., 2006). Zudem wurde Vimentin in Podosomen und Filopodia, den Adhäsionsstrukturen von Makrophagen, nachgewiesen und ist dort über Fimbrin mit Aktinfilamenten verbunden (Correia et al., 1999). Bei zirkulierenden T-Lymphozyten wurde eine Abhängigkeit der Deformationsresistenz vom Vimentinfilamentsystem festgestellt (Brown et al., 2001), was auf eine wichtige Rolle für Vimentin in der endothelialen Transmigration dieser Zellen hinweist.

Neben Integrinen bestehen auch Interaktionen von Vimentin mit anderen Membranproteinen und Rezeptoren. So wurde eine Bindung an das Transmembranprotein Polycystin-1 (Xu et al., 2001) und ein Einfluß auf die Lokalisierung und Aktivität des Natrium-Glukose-Kotransporters SGLT1 (Runembert et al., 2002) nachgewiesen. Zudem konnte auch die Bindung an verschiedene Proteine von Organellmembranen, wie z.B. die Golgi-Apparat-assoziierten Proteine Formiminotransferase-Cyclodesaminase (FTCD) und MICAL (Gao and Sztul, 2001; Suzuki et al., 2002) sowie AP-3, einem Adapterprotein in der Membran von Lysosomen (Styers et al., 2006; Styers et al., 2004), demonstriert werden. Vimentin bindet weiterhin an SNAP23, ein Mitglied der SNARE Proteinfamilie, das am intrazellulären Vesikeltransport und der Fusion mit Zellmembranen beteiligt ist (Faigle et al., 2000). Dies gibt einen Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von Vimentin an der Positionierung von Organellen und am Vesikeltransport in der Zelle. Eine große Gruppe Vimentin-assoziiierter Proteine sind Kinasen. Kinasen spielen oft eine Rolle bei der Signaltransduktion, die meist in Kaskaden von Phosphorylierungsreaktionen ablaufen. IF-Proteine selbst sind auch Phosphoproteine und werden in dynamischen Prozessen von Kinasen phosphoryliert und von Phosphatasen dephosphoryliert. Die Phosphorylierung von Vimentin beeinflusst die Filamentbildung und hat häufig eine Reorganisation des Filamentnetzwerkes zur Folge. Da Vimentin als Bindungspartner von Kinasen auch deren räumliche Verteilung und Verfügbarkeit in der Zelle reguliert, wird für Vimentin

eine Funktion in der Regulation von Signaltransduktionsprozessen postuliert (Pallari and Eriksson, 2006). Dies ist sowohl für das unlösliche filamentöse Vimentinnetzwerk denkbar, als auch für den kleinen Anteil löslicher unpolymersierter Vimentinmoleküle, deren Verteilung und Funktion bisher weniger untersucht wurden. Vimentin-assoziierte Kinasen sowie die Vorgänge während der Mitose sind in Abschnitt 1.3.3 dargestellt. Phosphorylierung stellt die wichtigste posttranslationale Modifikation von Vimentin dar. Daneben kommen aber noch andere Modifikationen wie Glykosylierung, Transglutaminierung, Ubiquitylierung und proteolytischer Abbau durch Caspasen vor (Marceau et al., 2007; Omary et al., 2006). Eine weitere Funktion von Vimentin in der Regulation von Signalwegen wurde nach der Entdeckung der Bindung an das Protein 14-3-3 postuliert. Vimentin bindet mit seiner N-terminalen 'Kopf'-Domäne phosphorylierungsabhängig das Adapterprotein 14-3-3 ϵ und ζ (Sato et al., 2004; Tzivion et al., 2000). Die Familie der 14-3-3 Proteine nimmt eine Schlüsselrolle in den Prozessen der Zellteilung, Signaltransduktion und Apoptose ein (Bridges and Moorhead, 2005; Hermeking and Benzinger, 2006). Dabei scheint die Vimentinbindung die Interaktion von 14-3-3 mit anderen Zielproteinen zu limitieren und Vimentin somit indirekt Signalwege zu modulieren.

Die Motorproteine Kinesin und Dynein transportieren oligomere Vimentinspezies entlang von Mikrotubuli (Gyoeva and Gelfand, 1991; Helfand et al., 2002). Der gerichtete Transport von Vimentin scheint vor allem bei der neuronalen Regeneration eine Rolle zu spielen. Dabei bindet partiell proteolysiertes Vimentin nach einer Verletzung im Axon an pErk und dient als Transportadapter entlang der Mikrotubuli in den Zellkörper. Dort wiederum werden Zielproteine phosphoryliert, die für die Reparatur des Axons verantwortlich sind (Perlson et al., 2005). Vimentin blockiert während des Transportes sterisch die Dephosphorylierung von pErk und stellt dadurch den Transport der aktiven Kinase über große Distanzen sicher (Perlson et al., 2006).

In weiteren Zellkulturexperimenten wurde eine Beteiligung von Vimentin an der Streßantwort der Zelle dokumentiert. Dabei bindet Vimentin direkt die Chaperone Hsp27 und α B-Kristallin, welche die Filamentbildung und Organisation modulieren (Nicholl and Quinlan, 1994; Perng et al., 1999). Insbesondere die Bindung von Vimentin an α B-Kristallin stellte sich als abhängig von verschiedenen Streßsituationen der Zelle heraus (Djabali et al., 1997). Weiterhin konnte gezeigt

werden, daß ein intaktes Vimentinfilamentsystem einen positiven Einfluß auf die Entwicklung der Thermotoleranz von Zellen hat (Lee and Lai, 1995).

Im Zellkultursystem konnte ein möglicher Zusammenhang von Vimentin mit dem Lipidstoffwechsel beobachtet werden (Franke et al., 1987). In Präadipozyten sind Lipidtropfen von Vimentinfilamenten umschlossen und werden so stabilisiert, indem hydrophobe Wechselwirkungen mit Organellmembranen verhindert werden. Zudem ist ein intaktes Vimentinfilamentsystem Voraussetzung für die Bildung von Lipidtropfen (Lieber and Evans, 1996). In Vimentin-defizienten SW-13 Zellen spielt Vimentin vermutlich für den Transfer von Cholesterol aus LDL für den Steroidmetabolismus eine wichtige Rolle (Sarria et al., 1992). Zusätzlich konnte Vimentin auch mit Glykosphingolipiden kolokalisiert werden (Gillard et al., 1991) und scheint dabei eine Funktion in der Verwertung von Glykosphingolipiden im Kreislauf über Endosomen und den Golgi-Apparat zu besitzen (Gillard et al., 1996). In Adipozyten ist Vimentin durch die Interaktion mit dem β 3-adrenergen Rezeptor in den Fettabbau involviert (Kumar et al., 2007). Die Rezeptorinteraktion ist entscheidend für die Rekrutierung von Src-Kinase, die wiederum Erk aktiviert und dadurch den Fettabbau induziert (Robidoux et al., 2006).

Für viele der beschriebenen Vimentinfunktionen ist bisher die physiologische Relevanz nicht geklärt. Es zeigt sich aber, daß die Vimentin-Protein-Interaktionen abhängig vom Zelltyp und dem Differenzierungszustand der Zellen sind. Desweiteren scheint es ein generelles Muster zu sein, daß viele Vimentin-assoziierte Proteine sowohl Organisatoren von Intermediärfilamenten, als auch Ziel der Regulation durch diese sind.

1.3.5 Vimentin 'knock-out'-Maus

Die wohl am besten geeignete und am meisten genutzte Technik für die Analyse der *in vivo* Funktionen von Proteinen ist die Inaktivierung des entsprechenden Gens und die nachfolgende Untersuchung des Phänotyps in einem Modellorganismus wie z.B. der Maus. Die Inaktivierung des Vimentingens in der Maus ergab das überraschende Ergebnis, daß die 'knock-out'-Tiere keinen Phänotyp zeigten, sich normal fortpflanzten und auch in keinem Vimentin-exprimierendem Gewebe einen strukturellen Defekt aufwiesen (Colucci-Guyon et al., 1994). Es wurde auch kein kompensatorischer Effekt anderer IF-Proteine beobachtet, was die Schlußfolgerung nahelegt, daß Vimentin zum Erhalt der Gewebeintegrität sowie für eine normale

Entwicklung nicht notwendig ist. Weitere Untersuchungen der 'knock-out'-Mäuse ergaben allerdings Unterschiede zu wt Mäusen, vor allem im Zusammenhang mit Streßsituationen. So zeigen Vimentin-defiziente Mäuse eine gestörte Wundheilung in adultem und neugeborenem Hautgewebe, die auf eine reduzierte Beweglichkeit der Fibroblasten zurückzuführen ist (Eckes et al., 2000; Eckes et al., 1998). Dabei ist die verlangsamte Migration der Fibroblasten zur Wundstelle für eine verspätete mesenchymale Kontraktion beim Wundverschluß verantwortlich. *In vitro* Experimente mit Vimentin-negativen Fibroblasten ergaben eine reduzierte mechanische Stabilität, die von lokaler Reorganisation der Proteine der Fokalkontakte und des Aktinzytoskeletts begleitet war (Eckes et al., 1998). In Abwesenheit von Vimentin wurde eine veränderte Modulation des Tonus von vaskulären Gefäßen (Terzi et al., 1997), sowie eine gestörte Transduktion von Scherkräften in den Arterien in Form von reduzierter Vasodilatation festgestellt (Henrion et al., 1997). Gleichzeitig löste das Entfernen eines Teils der Niere bei Vimentin-defizienten Mäusen ein totales Nierenversagen aus und führte zum Tod, im Gegensatz zu wt Tieren (Terzi et al., 1997). Diese Ergebnisse demonstrierten eine Beteiligung von Vimentin an der Regulation des Endothelin-Stickstoffmonoxid-Verhältnisses, das den Blutfluß in den Endothelzellen der Niere reguliert. Außerdem wurde in einem Modell für Nierenverletzungen die Bedeutung von Vimentin für die Lokalisation und Aktivität des Natrium-Glukose-Kotransportes SGLT1 in den Zellen der Nierengefäße nachgewiesen (Runembert et al., 2004; Runembert et al., 2002). Das Fehlen von Vimentin verursachte in diesem Modell Glukosurie. Durch Verhaltenstests konnte eine gestörte Motoroordination in Vimentin-negativen Mäusen gezeigt werden, die mit nekrotischen Purkinje-Zellen und schwach entwickelten Bergmann Gliazellen im Cerebellum der Tiere einherging (Colucci-Guyon et al., 1999).

Gemeinsam demonstrieren die Beobachtungen an Vimentin 'knock-out'-Mäusen eine Beteiligung von Vimentin an unterschiedlichen physiologischen Prozessen und postulieren Funktionen, die über mechanische Stabilität von Zellen und Geweben hinausgehen. Es gibt jedoch auf molekularer Ebene noch keinen Mechanismus oder Konzept, wie die Abwesenheit von Vimentin diese Veränderungen bewirkt. Es stellt sich daher die Frage, wie die *in vivo* Funktion des Vimentins besser aufgeklärt werden kann. Ein klassischer Ansatz besteht in der Überexpression oder der Expression von dominant-negativen Formen des Proteins. Besonders deutlich wurde der Vorteil transgener Systeme beim strukturell verwandten Typ III IF-Protein GFAP.

Entgegen den Erwartungen zeigte, wie der Vimentin 'knock-out', auch der GFAP 'knock-out' keinen gravierenden Phänotyp, obwohl in den Astrozyten der Mäuse kein GFAP nachweisbar war (Pekny et al., 1995). Die Überexpression von GFAP in der Maus lieferte dagegen einen Hinweis auf die Funktion und einen möglichen Zusammenhang mit einer humanen Erkrankung (Messing et al., 1998). In den Astrozyten der Mäuse wurden Proteinaggregate sichtbar, die den Rosenthalfasern, welche wiederum charakteristisch für die degenerative Alexandersche Erkrankung des Menschen sind, glichen. Daraufhin konnten auch in Patienten der Alexanderschen Erkrankung Mutationen im GFAP-Gen nachgewiesen werden (Brenner et al., 2001). Dies demonstriert den Zusammenhang zwischen dominant-negativen GFAP-Mutationen und dem Ausbruch der Krankheit. Dabei hat der komplette Ausfall eines bestimmten IF-Proteins offenbar weit weniger gravierende Auswirkungen als das Auftreten von Mutationen, die zur Aggregation des Proteins in der Zelle führen. Wahrscheinlich führt die Expression eines veränderten Proteins zu einer neuen, aber für die Zelle abträglichen Funktion („gain of toxic function“). Für die Vimentin 'knock-out'-Maus wurde die Hypothese aufgestellt, daß Vimentin in der Homeostase keine wichtige Funktion ausübt, unter Stress aber entscheidend für die Integrität und Funktion ist.

1.4 Struktur von Auge und Linse des Menschen

Das nahezu kugelförmige Auge des Menschen dient der Wahrnehmung optischer Reize in Form von Farben und Bewegungen. Dabei werden in den Photorezeptoren der Retina Photonen in elektrische Aktionspotentiale umgewandelt, die im Gehirn zu einem räumlichen Bild zusammengesetzt werden. Die Retina enthält etwa 70 % aller Sinneszellen des Menschen (Campbell, 1997), was die Bedeutung und Komplexität dieses Organs unterstreicht.

Das Auge wird von 3 konzentrischen Schichten, der Bindehaut (Conjunctiva), der Lederhaut (Sklera) und der Aderhaut (Chorioidea) umschlossen (Abb. 1.6 A). An der Vorderseite des Auges ist die Lederhaut transparent, nicht von der Bindehaut umgeben und wird als Hornhaut (Cornea) bezeichnet. Ebenso geht in diesem Bereich die Aderhaut in eine spezialisierte Struktur, die Iris (Regenbogenhaut) über, welche dem Auge die Farbe verleiht und durch Regulation der Pupillengröße die einfallende Lichtmenge bestimmt (Abb. 1.6 A). Auf der Innenseite der Aderhaut liegt

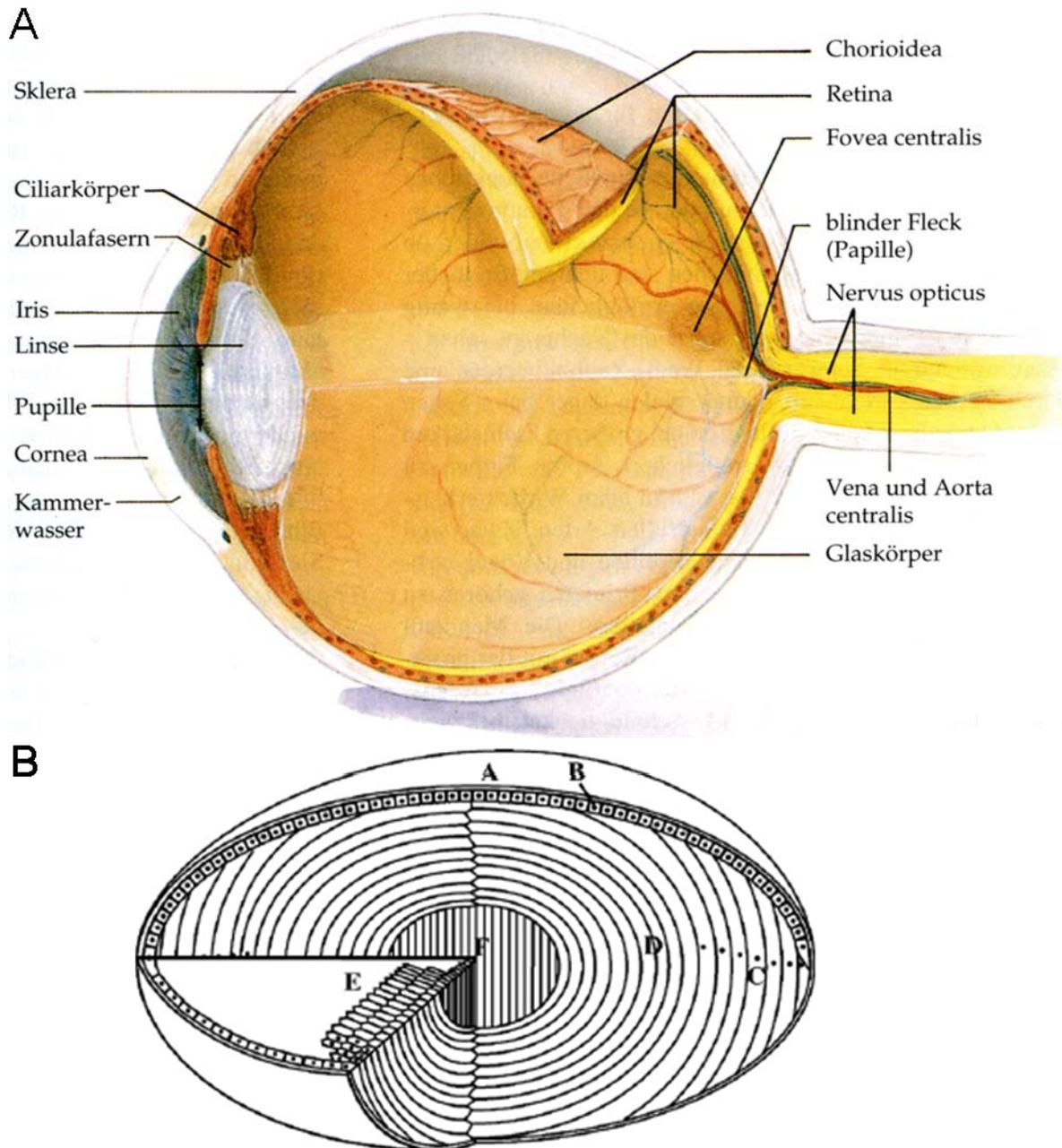


Abb. 1.6: Schematische Darstellung des menschlichen Auges und der Linse.

A) Auge im Längsschnitt. Die Bindehaut (Conjunctiva) ist nicht eingezeichnet. B) Linse. Die Linse wird von der Linsenkapsel (A) umschlossen. (B) Einschichtiges Linsenepithel. (C) Am Linsenäquator neugebildete Linsenfaserzellen, die im Laufe der Differenzierung ihre Organellen und Zellkerne abbauen. Punkte kennzeichnen Zellkerne. (D) Ausdifferenzierte sekundäre Linsenfaserzellen ohne Organellen. (E) Charakteristische hexagonale Struktur der Linsenfaserzellen im Querschnitt. (F) primäre Linsenfaserzellen im Zentrum der Linse. Modifiziert nach (Campbell, 1997) und (Perng et al., 2007).

die Netzhaut (Retina), welche die Photorezeptoren enthält, und die generierten elektrischen Reize über den optischen Nerven zum Gehirn weiterleitet. Durch die Linse und den Cilliarkörper wird das Auge in 3 Hohlkörper unterteilt, die mit Kammerwasser gefüllte vordere und hintere Augenkammer, vor und hinter der Iris, sowie den transparenten, gallertartigen Glaskörper. Der Cilliarkörper produziert das

Kammerwasser und kann durch Muskelrelaxation bzw. Kontraktion die Form der Linse variieren und dadurch deren Brechkraft verändern.

Die Linse unterscheidet sich von anderen Geweben durch ihre Transparenz und das Fehlen von Blutgefäßen. Eine weitere Besonderheit sind die Zellen im Zentrum der Linse, die im Gegensatz zu vielen anderen Zelltypen ein Leben lang erhalten bleiben und dadurch die ältesten Proteine des Körpers enthalten (Harding, 2002; Lynnerup et al., 2008). Die Linse liegt eingebettet zwischen Glaskörper und Kammerwasser (Abb. 1.6 A), von dem sie durch Diffusion mit Nährstoffen versorgt wird. Die Linse ist von einer Membran, der Linsenkapsel, umschlossen und enthält darunter auf der lichtzugewandten, anterioren Oberfläche eine einzellige Schicht von Epithelzellen (Abb. 1.6 B). Aus diesen proliferierenden Zellen gehen während der Embryonalentwicklung die Linsenfaserzellen hervor, die einen Großteil der Linse ausfüllen (Abb. 1.6 B). Die Linsenfaserzellen liegen dichtgepackt in konzentrischen Ringen um das Zentrum der Linse. Dabei sind im Zentrum die ältesten Zellen, die primären Linsenfaserzellen. Während der Entwicklung der adulten Linse lagern sich vom Linsenäquator aus neue, sekundäre Linsenfaserzellen auf die schon vorhandenen primären Linsenfaserzellen (Graw, 1996). Vom Zentrum der Linse aus werden die Zellen daher nach außen hin immer jünger. Die Linsenfaserzellen bauen während der Differenzierung in einem Apoptose-ähnlichen Prozeß alle Organellen und auch ihren Zellkern ab (Bassnett, 2002). Der Abbau der Organellen ist essentiell für die Transparenz der Linse und ein scharf fokussiertes Bild auf der Retina, da dadurch die Lichtstreuung und Absorption entlang der optischen Achse stark reduziert wird (Dahm, 1999). Ein gestörter Abbau der Organellen bzw. des Zellkerns führt zur Bildung von Katarakten (Bassnett, 2002). Obwohl beim Abbau der Organellen in den differenzierenden Linsenfaserzellen viele Elemente des Apoptoseprogrammes, wie z.B. die Aktivierung der Caspasen 3 und 6 (Zandy et al., 2005), vorhanden sind, zeigen sich doch zwei entscheidende Unterschiede. Zum einen kommt es während der Differenzierung der Linsenfaserzellen nicht wie in der Apoptose zu Einstülpungen der Plasmamembran und zum anderen bleibt das Aktinzytoskelett intakt und wird nicht abgebaut (Bassnett, 2002). Daher spricht man im Fall des Organellenabbaues auch von attenuierter Apoptose (Dahm, 1999).

Zusätzlich zum Aktin- und Mikrotubulizytoskelett enthalten Linsenfaserzellen zwei unabhängige IF-Netzwerke, die zum einen aus Vimentin und zum anderen aus einem Kopolymer der Linsen-spezifischen IF-Proteine Filensin und CP49 bestehen

(Sandilands et al., 1995a). Filensin und CP49 werden ausschließlich in den Linsenfaserzellen exprimiert und haben im Vergleich zu anderen IF-Proteinen ungewöhnliche Sequenzeigenschaften (Song et al., 2009). CP49 hat keine C-terminale 'Schwanz'-Domäne und Filensin weist eine verkürzte 'rod'-Domäne auf und weicht von der konservierten IF-Konsensussequenz an den Enden der 'rod'-Domäne ab (Perng et al., 2007). *In vitro* können sowohl Filensin als auch CP49 allein keine Filamente bilden, nur in der Mischung in einem molaren Verhältnis von 1:2 bilden sich typische IF (Song et al., 2009). Native, aus der Linse isolierte Filamente sind in regelmäßigen Abständen mit 10-15 nm großen, globulären Proteinen, den α -Kristallinen, dekoriert. Deshalb spricht man bei den Linsen-spezifischen IF auch von 'beaded-filaments'. α -Kristalline sind kleine Hitzeschockproteine mit Chaperonaktivität. Die Funktion ihrer Assoziation mit den Linsen-IF ist noch nicht geklärt (Perng et al., 2007). Vimentin wird in der Linse sowohl in den Epithelzellen, als auch in den Linsenfaserzellen exprimiert (Ramaekers et al., 1980). Zusätzlich zu Vimentin und den 'beaded-filaments' werden in der Linse noch weitere IF-Proteine in geringer Menge exprimiert. Im Epithel der adulten Linse werden GFAP und die Keratine 8, 18 und 19 exprimiert, während Synemin im Epithel und in Linsenfaserzellen exprimiert wird (Song et al., 2009). Die IF-Proteine der Linse, Vimentin, CP49 und Filensin, sind entscheidend für den Erhalt der optischen Eigenschaften, indem sie die dichtgepackte, hexagonale Struktur der Linsenfaserzellen aufrechterhalten (Perng et al., 2007). Obwohl 'knock-out'-Mäuse für alle 3 IF-Proteine des Auges etabliert wurden, ist bisher nicht klar, welches der beiden IF-Netzwerke die mechanische Stabilität der Linse gewährleistet (Alizadeh et al., 2003; Alizadeh et al., 2002; Colucci-Guyon et al., 1994). Außerdem sind Filensin und CP49, zusammen mit den Kristallinen, an der Bildung der kristallinen Masse der Linse beteiligt. Kristalline werden in der Linse in großer Menge exprimiert und stellen durch ihre dichte und regelmäßige Anordnung den Brechungsindex und die Transparenz der Linse sicher (Delaye and Tardieu, 1983). Sie bilden etwa 90 % der löslichen Linsenproteine (Andley, 2007). Man unterscheidet 2 Gruppen, α - sowie $\beta\gamma$ -Kristalline, wobei den α -Kristallinen durch ihre Chaperonaktivität eine besondere Rolle beim Schutz der Linse vor Apoptose und Proteinaggregation zukommt (Andley, 2007; Horwitz, 1992). α -Kristalline interagieren mit IF-Proteinen in der Linse und modulieren dadurch deren Filamentbildung (Djabali et al., 1997; Nicholl and Quinlan, 1994).

1.5 Katarakt

Katarakte werden charakterisiert durch eine Trübung der Linse des Auges und sind weltweit die häufigste Ursache für Erblindung des Menschen (Harding, 2002). Sie werden unterteilt nach der Lage des Katarakts in der Linse (total, polar, zonular, kapsular) und nach dem Beginn des Auftretens (angeboren, Jugend, altersbedingt) (Shiels and Hejtmancik, 2007). In Abb. 1.7 sind ein normales Auge und exemplarisch die klinischen Erscheinungsformen von zwei Typen von Katarakten dargestellt. Die charakteristische Linsentrübung resultiert aus einer veränderten Lichtbrechung aufgrund von Veränderungen der Linsenproteine und/ oder der Struktur der Linsenfaserzellen. Dies beinhaltet Membranveränderungen, Bildung von Vakuolen und Akkumulation von Proteinaggregaten mit einem Durchmesser von mehr als 0,1 nm (Shiels and Hejtmancik, 2007). Am häufigsten verursachen allerdings Proteinaggregate einen veränderten Brechungsindex und damit eine Trübung der Linse. Auch wenn die klinischen Erscheinungsbilder von Katarakten unterschiedlich sind, zeigt sich doch als allgemeiner Grundzug der Kataraktbildung eine Modifikation von Proteinen, die einhergeht mit Konformationsänderungen und schließlich zu Proteinaggregation führt, die direkt für die Linsentrübung verantwortlich ist. Daher dienen Katarakte auch als Beispiel und Modell für Protein-Konformationskrankheiten (Harding, 2002).

Gründe für die Fehlfaltung und Konformationsänderung von Proteinen liegen zum einen in chemischen, nicht-enzymatischen Veränderungen von Proteinen, wie z.B. Glykierung, Carbamylierung, Deamidierung, Reaktionen mit Kortikosteroiden und Racemisierung von Asparaginsäure (Harding, 2002). Die chemische Modifikation von Proteinen ist ein altersbedingter Prozeß (Horwitz, 2003), von dem angenommen wird, daß er zu einer veränderten Oberflächenladung der Proteine und dadurch zu erhöhter Aggregationsneigung führt. Dabei handelt es sich bei den Proteinmodifikationen um unspezifische Reaktionen, die nicht nur die strukturellen Proteine, wie Kristalline, Vimentin und 'beaded-filaments' betreffen, sondern auch Enzyme in der Linse inhibieren. Ebenso lassen sich die bekannten Risikofaktoren für das Entstehen von Katarakten, wie z.B. Rauchen, übermäßiger Alkoholkonsum, Diabetes, Nierenerkrankungen, UV-Strahlung und oxidativer Streß (Harding, 2002) auf nicht-enzymatische, posttranslationale Proteinmodifikationen zurückführen. Zum anderen führen Genmutationen in Linsenproteinen, wahrscheinlich durch Konformationsänderungen und gestörte Interaktion mit anderen Proteinen und

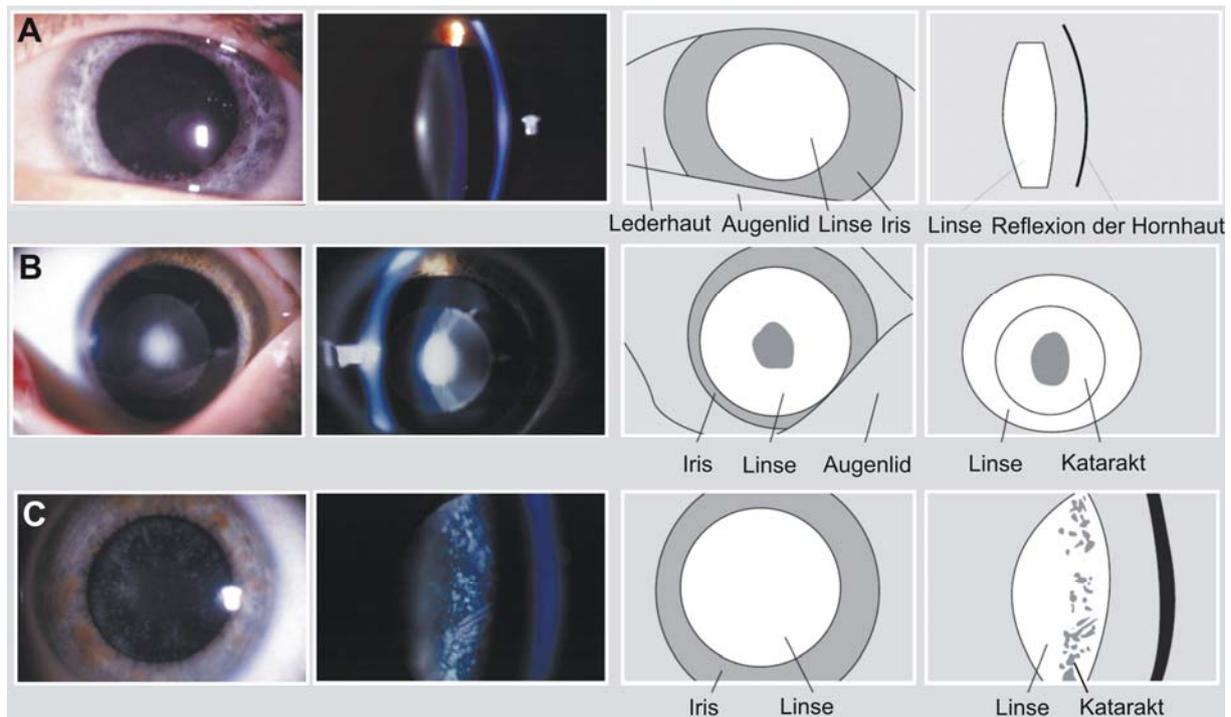


Abb. 1.7: Klinisches Erscheinungsbild von Katarakten.

Abgebildet sind jeweils eine Photographie, Schräglichtbeleuchtung und eine schematische Darstellung, in der die Linsentrübung grau hervorgehoben ist. A) Normales Auge. B) Nuklearer Katarakt. C) Zonularer Katarakt mit 'staubartiger' Ablagerung in der Linse. Modifiziert nach (Francis et al., 1999).

Membranen, in der Maus und im Menschen zu Proteinaggregation und final zum Katarakt (Graw, 2003; Hejtmancik, 2008). Mutationen in Aquaporin, einem in der Linse stark exprimierten Transmembranprotein, und in den Gap Junction-bildenden Connexinen 46 und 50 (Francis et al., 2000; Mackay et al., 1999; Rees et al., 2000) führen beispielsweise zur Ausbildung eines Katarakts, ebenso wie Mutationen in den α , β , und γ -Kristallinen (Berry et al., 2001; Heon et al., 1999; Litt et al., 1997; Litt et al., 1998; Vicart et al., 1998) sowie den 'beaded-filament'-Proteinen Filensin und CP49 (Conley et al., 2000; Jakobs et al., 2000; Ramachandran et al., 2007). Mutationen in den Transkriptionsfaktoren PITX3, PAX6, SOX2, die für Morphogenese des Auges verantwortlich sind, können unter anderem zum Katarakt führen, aber auch zu Augenfehlbildungen und dem kompletten Verlust der Augenanlage. Mutationen im Hitzeschock-Transkriptionsfaktor HSF4, welcher die Transkription von Kristallinen steuert, können ebenfalls Katarakte verursachen (Graw, 2003; Hejtmancik, 2008). Die Pathomechanismen, die zu Katarakten führen, sind in den molekularen Details noch weitgehend unbekannt. Es zeigen sich allerdings Gemeinsamkeiten mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson, Huntington und der Alexanderschen Erkrankung, in Bezug auf Proteinaggregation (Graw, 2009; Quinlan et al., 2007). Wie in den Aggregaten neurodegenerativer Erkrankungen, wurde auch

in Katarakten eine erhöhte Menge an α B-Kristallin nachgewiesen (Ecroyd and Carver, 2009; Horwitz, 2003). Mit seiner Chaperonaktivität trägt α -Kristallin im Auge zur Transparenz der Linse bei, indem es fehlgefaltete und denaturierte Proteine bindet und sie so in einer löslichen Konformation hält (Horwitz, 2003). Potentiell läßt sich dieser Mechanismus auch auf andere Proteinaggregationskrankheiten übertragen.

Über eine Beteiligung von Vimentin an der Entstehung von Katarakten ist bisher wenig bekannt. Zwar konnte gezeigt werden, daß die Überexpression von Vimentin in der Linse von Mäusen zu einer gestörten Differenzierung der Linse und zum Katarakt führt (Capetanaki et al., 1989). Allerdings scheint dieser Effekt nicht spezifisch für Vimentin zu sein, da auch die Überexpression von Desmin und NF-L Differenzierungsstörungen oder Katarakte der Linse verursachen (Dunia et al., 1990; Monteiro et al., 1990). Vielmehr scheint die Überexpression eines IF-Proteins das fein ausbalancierte Verhältnis von Vimentin und 'beaded-filaments', das entscheidend für die Differenzierung und Funktion der Linse ist, zu stören. Desweiteren verursachte auch die Überexpression der Proteine Connexin 50, MHC 1 und SV40 T-Antigen, die keinen Bezug zu IF-Proteinen haben, in der Linse die Bildung eines Katarakts (Chung et al., 2007; Gotz et al., 1991; Martin et al., 1995). Dies deutet auf eine Störung der Mengenverhältnisse der Strukturproteine der Linse hin.

Bisher ist bei bestehendem Katarakt die einzige Behandlungsmöglichkeit die Operation und der Ersatz der Linse. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß Aspirin und ähnliche Substanzen vor altersbedingtem Katarakt schützen können, indem sie die chemische Modifikation von Proteinen verhindern (Harding, 2002).

1.6 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollte anhand eines vorhandenen Mausmodells die *in vivo* Funktion von Vimentin im Auge der Maus aufgeklärt, und die von R. Meier-Bornheim begonnene Charakterisierung der transgenen VimR113C und Vim Δ C2B Mauslinien abgeschlossen werden. Zur Verbesserung der Immunfluoreszenzfärbungen sollte ein neuer anti-Vimentin Antikörper, der insbesondere auf Gewebeschnitten ein verbessertes Signal/ Hintergrundverhältnis aufweist, generiert werden.

Da die Vimentin-transgenen Mäuse als Phänotyp im Auge einen Katarakt der Linse entwickeln, sollte in Zusammenarbeit mit einer großen Augenklinik ein

Patientenkollektiv auf mögliche Mutationen im Vimentin untersucht werden. Nach potentieller Identifikation einer Vimentinmutation in einem Kataraktpatienten sollte diese in verschiedenen *in vitro* Zellsystemen charakterisiert, und damit erstmals ein möglicher Zusammenhang zwischen Vimentinmutation und humaner Erkrankung etabliert werden. Bei einem potentiellen Effekt der Mutation auf die Vimentin-Filamentbildung sollten stabile Zelllinien generiert, und die Mutation in funktionellen Studien, z.B. in Hinblick auf Apoptose, Zellmigration und Proteasomenaktivität untersucht werden. In Zusammenarbeit mit anderen Arbeitsgruppen im Rahmen des GRK804 sollten mögliche funktionelle Konsequenzen einer Vimentinmutation mit kleinen chemischen Verbindungen oder Aptameren im Zellkultursystem beeinflusst werden, um als langfristiges Ziel Behandlungsmöglichkeiten für IF-Erkrankungen zu entwickeln.

In den letzten Jahren wird zunehmend deutlich, daß IF-Proteine *in vivo* nicht nur für die Integrität und mechanische Stabilität der Zelle verantwortlich sind, sondern eine Vielzahl weiterer Funktionen, welche sehr wahrscheinlich auch abhängig vom Zellkontext sind, ausüben (Kim and Coulombe, 2007; Magin et al., 2004; Magin et al., 2007; Toivola et al., 2005). Um ein genaueres Verständnis des Einflusses von Protein-Protein-Interaktionen auf die *in vivo* Funktionen von Vimentin zu bekommen, sollten mit Hilfe von bioinformatischen Methoden neue Vimentin-interagierende Proteine identifiziert werden. Die vorhergesagten Protein-Protein-Interaktionen sollten in Zellkulturexperimenten sowie durch biochemische Methoden verifiziert werden.

2 Material

2.1 Chemikalien

Chemikalien und Medienzusätze wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen AppliChem, Fluka, Invitrogen, Merck, PAA, Roche, Roth, Serva und Sigma-Aldrich in Analysequalität bezogen. Enzyme stammten von Fermentas, Roche, Invitrogen und New England Biolabs, Nukleotide von Fermentas.

2.2 Allgemeine Lösungen und Puffer

Soweit nicht anders beschrieben werden Lösungen und Puffer in doppelt destilliertem Wasser (A. bidest) aus einer Millipore-Anlage angesetzt. Die pH-Werte werden durch Verwendung von HCl oder NaOH eingestellt und die Lösungen bei Raumtemperatur (RT) gelagert. Wenn notwendig werden Lösungen zusätzlich autoklaviert.

2.3 Lösungen für die Nukleinsäureanalytik

2.3.1 Lösungen zur Präparation genomischer DNS

Lyse-Puffer	100 mM Tris-HCl, pH 8,5 5 mM EDTA 0,2 % SDS 200 mM NaCl Lagerung bei -20°C.
Proteinase K Lösung	20 mg/ml Proteinase K in A. bidest bei -80°C lagern.
RNase Lösung	20 mg/ml RNase in A. bidest bei -80°C lagern.
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA
DEPC-H ₂ O	A. bidest mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat, autoklavieren.

2.3.2 Lösungen zur Präparation von Plasmid-DNS

Resuspensionspuffer P1	50 mM Tris-HCl, pH 8 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
Lysepuffer P2	200 mM NaOH

	1 % SDS
Neutralisierungspuffer P3	3 M Kaliumacetat, pH 5,5 mit Essigsäure einstellen.

2.3.3 Lösungen zur Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

DNS-Ladepuffer (10x)	100 mM EDTA, pH 8,0 30 % (v/v) Ficoll 0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol 0,25 % (w/v) Orange G
TAE-Puffer (10x)	0,4 M Tris, pH 8,3 0,2 M Acetat 10 mM EDTA
TBE-Puffer (10x)	1 M Tris-Base, pH 8,3 0,83 M Borsäure 10 mM EDTA
SB-Puffer (20x)	200 mM NaOH, pH 8 mit Borsäure einstellen.
Ethidiumbromid-Lösung	10 mg/ml Ethidiumbromid (Sigma)

2.4 Lösungen für die Proteinanalytik

2.4.1 Lösungen für die Immunoblotanalyse

Acrylamid	37,5:1 Acrylamid/Bisacrylamid
APS	10 % Ammoniumpersulfat
Blockpuffer	5 % Magermilchpulver (Sucofin) in TBST
Bradford-Lösung	100 mg Coomassie Brilliant Blau G250 in 50 ml EtOH und 100 ml H ₃ PO ₄ lösen, auf 1 l mit A. bidest auffüllen.
Coomassie Blue-Färbelösung	0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 10 % (v/v) Essigsäure 30 % (v/v) Isopropanol Lösung durch Faltenfilter filtrieren.
Coomassie-Entfärber	10 % (v/v) Essigsäure 30 % (v/v) Isopropanol
ECL-Lösung A	50 mg Luminol in 200 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 8,6
ECL-Lösung B	11 mg para-Hydroxycoumarinsäure in 10 ml DMSO
High Salt-Puffer	20 mM Tris-HCl, pH 7,4 1 M NaCl 1 mM EDTA
Laemmli-Laufpuffer (5x)	25 mM Tris-HCl, pH 8,8 192 mM Glycin 0,1 % SDS
Laemmli-Probenpuffer (5x)	50 mM Natriumphosphat, pH 6,8 5 % SDS 40 mM DTT 5 mM EDTA 5 mM EGTA

	20 % (v/v) Glycerin 0,01 % (w/v) Bromphenolblau
Low Salt-Puffer	20 mM Tris-HCl, pH 7,4 0,2 M NaCl 1 mM EDTA
Ponceau-Färbelösung	0,1 % (w/v) Ponceau S 3 % (v/v) Essigsäure lichtgeschützt lagern.
RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,4 150 mM NaCl 5 mM EDTA 5 mM EGTA 0,1 % (v/v) Triton X-100 Complete Protease Inhibitor (Roche)
Sammelgelpuffer (upper Tris)	1 M Tris-HCl, pH 6,8 0,4 % SDS
Strip-Puffer	0,2 M Glycin, pH 2,2 0,1 % SDS
TBS-Puffer (10x)	100 mM Tris, pH 7,5 1,5 M NaCl
TBST-Puffer	TBS-Puffer 0,1 % (v/v) Tween20
TBSTT-Puffer	TBST-Puffer 0,5 % (v/v) Triton X-100
Transferpuffer (Towbin)	25 mM Tris-HCl, pH 8,8 192 mM Glycin 0,1 % SDS 10 % Methanol
Trenngelpuffer (lower Tris)	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 0,4 % SDS

2.4.2 Lösungen für die Immunfluoreszenz-Analyse

Ammoniumchlorid-Lösung	50 mM Ammoniumchlorid in PBS
Blockierungsreagenz	5 % (v/v) Ziegennormalserum (NGS) 0,1 % Triton X-100
DAPI	4,6-Diamino-2-phenylindol, 1 mg/ml in A. bidest. Endkonzentration in Farbreaktion 1 µg/ml. Bei -20°C lagern.
PFA	4 % Paraformaldehyd (Formalin) Durch Lösen von kristallinem Paraformaldehyd in PBS, unter Erhitzen auf 56°C und Zugabe von NaOH, pH 7,4 einstellen. Oder aus 37 % Formaldehyd, verdünnt in PBS.
TBS-BSA	1 % BSA in TBS
Mowiol+	Einbettmedium mit zusätzlichem Bleichschutz. 12,5 % Mowiol 4-88 (CalBiochem) 37,5 % Glycerol 30 mM Propylgallat in PBS, pH 7,4

2.5 Medien und Lösungen für die Kultivierung von Bakterien

Die Medien werden durch Autoklavieren bei 120°C für 20 min sterilisiert. Hitzelabile Zusatzstoffe werden sterilfiltriert und den Medien nach Abkühlen auf 50-55°C zugegeben. Zur Herstellung von Agarplatten wird dem Medium vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar zugegeben. Antibiotika werden nach Abkühlen des Agars auf 50-55°C hinzugegeben und die Platten werden unter sterilen Bedingungen gegossen.

2.5.1 Medien und Lösungen zur Herstellung kompetenter Bakterien

TFB I	30 mM Kaliumacetat, pH 5,8 50 mM MgCl ₂ 100 mM KCl 15 % Glycerol
TFB II	10 mM MOPS, pH 7,0 75 mM CaCl ₂ 10 mM KCl 15 % Glycerol

2.5.2 Medien und Lösungen zur Transformation und Kultivierung von Bakterien

Ampicillin	50 mg/ml in A. bidest, Lagerung bei -20°C. Die Endkonzentration im Medium beträgt 50 µg/ml, in Platten 100 µg/ml.
Chloramphenicol	34 mg/ml in Ethanol, Lagerung bei -20°C. Die Endkonzentration im Medium beträgt 100 µg/ml.
Kanamycin	30 mg/ml in A. bidest, Lagerung bei -20°C. Die Endkonzentration im Medium beträgt 30 µg/ml.
LB-Agar	LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar
LB-Medium	1 % Bacto-Trypton 0,5 % Hefeextrakt 172 mM NaCl pH 7,4
SOC-Medium	2 % Bacto-Trypton 0,5 % Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glukose
TB-Medium	1,2 % Bacto-Trypton 2,4 % Hefeextrakt 0,4 % Glycerol 720 mM K ₂ HPO ₄

	170 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Tetrazyklin	10 mg/ml in Ethanol, Lagerung bei -20°C. Die Endkonzentration im Medium beträgt 10 µg/ml.

2.6 Medien für die Kultivierung eukaryotischer Zellen

2.6.1 Medien und Puffer

Einfriermedium (2x)	20 % DMSO 10 % FCS in Normalmedium, Lagerung bei -20°C.
CaPO ₄ -Transfektionslösung (2x)	50 mM HEPES, pH 7,05 280 mM NaCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ 12 mM Glukose 10 mM KCl
DMEM+ (Normalmedium)	Dulbeccos Modified Eagle Medium (Invitrogen) 10 % FCS 1 mM Pyruvat
EBSS	Earle's Balanced Salt Solution (Invitrogen)
Glycerinlösung	50 % CaPO ₄ -Transfektionslösung (2x) 15 % Glycerin
GMEM	Glasgow Minimum Essential Medium (Invitrogen)
Opti-MEM	Serum-reduziertes Medium, basierend auf Eagle's Minimum Essential Medium (Invitrogen)
PBS (Invitrogen)	138 mM NaCl 2,66 mM KCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ 8 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Trypsin-Lösung	0,25 % Trypsin (Invitrogen) 1 mM EDTA

2.6.2 Inhibitoren und Antibiotika

G418-Stammlösung	50 mg/ml G418 Sulfat (Geneticin) in PBS. Lagerung bei -20°C. Die Konzentration im Medium ist zelllinienabhängig zwischen 0,6-1,5 mg/ml.
Cyprofloxacin	Stock: 1 mg/ml. Endkonzentration im Medium: 10 µg/ml.
Okadarsäure	Endkonzentration im Medium: 1 µg/ml.
Penicillin / Streptomycin	Stock: 10 mg/ml Streptomycin, 10000 U/ml Penicillin. Endkonzentration im Medium: 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin.

2.7 Lösungen für histologische Färbungen

Eosin-Lösung	0,1 % Eosin Y, vor Gebrauch filtrieren.
Hämatoxylin-Lösung	0,1 % Mayers Hämalaunlösung, vor Gebrauch filtrieren.

2.8 Kommerzielle Reagenziensätze

Nucleobond AX-500	Macherey-Nagel
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen
QiaEX II Gel Extraction Kit	Qiagen
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce

2.9 Plasmide

Name	Eigenschaften	Referenz
pFLAG-CMV-4 (6,3 kb)	Eukaryotischer Expressionsvektor mit N-terminaler FLAG-Sequenz.	Sigma-Aldrich
pFLAG-CMV4-BAP (6,7 kb)	Kontrollvektor, exprimiert die Bakterielle Alkalische Phosphatase als N-terminales FLAG-Fusionsprotein.	Sigma-Aldrich
pCMV-HA (3,8 kb)	Eukaryotischer Expressionsvektor mit N-terminaler HA-Sequenz.	Clontech
pEGFP-C1 (4,7 kb)	Eukaryotischer Expressionsvektor mit N-terminaler eGFP-Sequenz.	Clontech
pcDNA 3.1 (+) (5,4 kb)	Eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV-Promotor.	Invitrogen
pBluescript II SK(+/-) (3,0 kb)	Klonierungsvektor	Stratagene
pCRII TOPO (4,0 kb)	Klonierungsvektor	Invitrogen
pJET1.2 Blunt (3,0 kb)	Klonierungsvektor	Fermentas

2.10 Oligonukleotide

2.10.1 Primer zur Klonierung

Alle Primer wurden von der Firma Operon (Köln) in salzfreier Qualität bezogen.

Name	Basensequenz (5'→3')	Konstrukt
BN1139	AAGTCGACCATGGCCCAATGGAATCAGCT ACAG	humanes STAT3 in pCMV-HA
BN1140	TTCTCGAGTCACATGGGGGAGGTAGCGC	humanes STAT3 in pCMV-HA

BN1142	AAAAGCTTCGAACCTGCAGGAGGCAGAA GAATG	Vimentin D2B-Domäne in pEGFP-C1
BN1143	TTGGATCCCTATCCATTTACGCATCTGG CGTTC	Vimentin D2B-Domäne in pEGFP-C1
BN1116	TATAAAGCTTATGTCCACCAGGTCCGTGT CCTCG	humanes Vimentin mit HindIII Schnittstelle vor ATG
BN1117	CGGGGACGAGGCGTAGAGGC	humanes Vimentin mit HindIII Schnittstelle vor ATG
R113C_for	GCTGAATGACTGCTTCGCCAACTACATCG ATAAGGTGCGCTTCC	Mutagenese Vimentin R113C
R113C_rev	GGAAGCGCACCTTATCGATGTAGTTGGCG AAGCAGTCATTCAGC	Mutagenese Vimentin R113C
E151K_for	GGACCTCTACAAGGAGGAGATGCGGGAG CTCCGCCGGCAGG	Mutagenese Vimentin E151K
E151K_rev	CCTGCCGGCGGAGCTCCCGCATCTCCTC CTTGTAGAGGTCC	Mutagenese Vimentin E151K

2.10.2 Primer zur Genotypisierung von Mäusen

Name	Basensequenz (5'→3')
Vim1	TGTCCTCGTCCTCCTACCGC
Vim2	AGCTGCTCGAGCTCAGCCAGC
Vim3	CTGTTCCGCCAGGCTCAAGGC
Myc for	CTACGATTCACAGCCACCGC
Myc rev	CGCAGTGCGCTGCCAGA

2.10.3 Primer zur Sequenzierung des Vimentingens von Kataraktpatienten

Exon	Fragment Größe (Bp)	forward Primer (5'→3')	reverse Primer (5'→3')
1.1	499	GAGGGGACCCTCTTTCCTAAC	TCTTGAACCTCGGTGTTGATGG
1.2	357	CAGGACTCGGTGGACTTCTC	CGAGGCCAGCTACTTGCAT
2	171	GAGCGAATACGTGGTGTGTTG	TGCGAGTGGGAAGAGAGTCTA
3	157	CCTCCATGTCCTGTCTTTTCTC	TCATTCCCCGAAAGTCACTC
4	218	GCTGACCGTCTGTCTGTTCTT	GTTGAAGCCGCACTGATTTG
5	294	ACTGCTCTTTCCCTGGCTTT	CCCTCTTTTACTGCAGGGTTG
6	357	GGAACAGCTGGGTTTTTCTG	TGACACTGCTTAGAGCCCAGT
7	169	TCCCAGTGGTTGAAGTTATTTG	TGCTTTGACATAAACACAGTGG
8	234	TCATTTTTGGCCTGTTTGTG	GCATGAATGAAACCTGAACCT
9	465	GTCTTTGGCATGTGGCATTAT	AGGACCAAGTAGAGAATTGTT

2.11 Größenstandards

Bezeichnung	Fragmentgrößen
DNS 50 bp-Leiter	50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800,

(Fermentas)	900, 1000 Bp
λ EcoRI / HindIII (Fermentas)	DNS des λ -Phagen restringiert mit EcoRI und HindIII: 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564, 125 Bp
Unstained Protein Ladder (Fermentas)	10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 85, 100, 120, 150, 200 kDa
Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas)	10, 15, 27, 35, 55, 70, 100, 130, 250 kDa

2.12 Bakterienstämme

<i>E.coli</i> Stamm	Genotyp	Verwendung	Referenz
TG1	F ['] traD36 lacI ^q Δ (lacZ) M15 proA ⁺ B ⁺ /supE Δ (hsdM-mcrB)5 (r _k - m _k - McrB ⁻) thi Δ (lac- proAB)	Plasmidvermehrung	DSMZ 6056
TOP10	F ['] mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZ M15 lacX74 recA1 deoR araD139 (ara-leu)7697galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Plasmidvermehrung Klonierung	Invitrogen
XL1-blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1</i> <i>hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F ['] <i>proAB lacIqZΔM15 Tn 10</i> (Tetr)]	Plasmidvermehrung Klonierung	Stratagene, (Bullock, 1987)

2.13 Eukaryotische Zelllinien

Bezeichnung	Eigenschaften	Referenz
MCF-7	humane Epithel-Zelllinie, die aus den Zellen eines Adenokarzinoms der Brust einer weiblichen Patientin abgeleitet wurde.	ATCC: HTB-22 (Soule et al., 1973)
3T3-L1	murine embryonale Fibroblasten-Zelllinie.	ATCC: CL-173 (Green and Meuth, 1974; Todaro and Green, 1963)
3T3 F442A	murine embryonale Fibroblasten-Zelllinie. Subclon von 3T3 Zellen, der mit erhöhter Frequenz zu Adipozyten differenziert werden kann.	(Green and Kehinde, 1976)
SW-13	humane Epithel-Zelllinie, die aus den Zellen eines Karzinoms der Nebenniere einer weiblichen Patientin abgeleitet wurde.	ATCC: CCL-105 (Leibovitz et al., 1973)
3T3 E151K	3T3 F442A Fibroblasten, die stabil mit einem Vektor, welcher die humane Vimentin E151K Punktmutante kodiert, transfiziert wurden.	diese Arbeit
3T3 R113C	3T3 F442A Fibroblasten, die stabil mit	diese Arbeit

	einem Vektor, welcher die humane Vimentin R113C Punktmutante kodiert, transfiziert wurden.	
MEF	murine embryonale Fibroblasten-Zelllinie, die aus E14 Embryonen des Stammes C57Bl/6 gewonnen wurde.	diese Arbeit
MEF vim ^{-/-}	murine embryonale Fibroblasten-Zelllinie, die aus E14 Embryonen von vim ko ^{-/-} Mäusen gewonnen wurde.	diese Arbeit
Myc 9E10	Hybridoma-Zelllinie, die einen Antikörper gegen humanes c-myc produziert.	ATCC: CRL-1729 (Evan et al., 1985)

2.14 Mauslinien

Bezeichnung	Kurzbeschreibung	Referenz
C57Bl/6	Inzuchtstamm, schwarz.	Charles River
Vim ko ^{-/-}	Mauslinie, welche durch Insertion des Neomycin-Gens in Exon 1 defizient für Vimentin ist.	(Colucci-Guyon et al., 1994)
Vim ΔC2B tg	Transgene Mauslinie, die unter der Kontrolle des endogenen Vimentin Promotors ein mutiertes Vimentin-Gen exprimiert. Die 2B-Domäne sowie Teile des N-Terminus wurden deletiert.	(Bornheim et al., 2008)
Vim R113C tg	Transgene Mauslinie, die unter der Kontrolle des endogenen Vimentin Promotors ein mutiertes Vimentin-Gen exprimiert. Die Aminosäure Arginin an Position 113 wurde durch Cystein ersetzt.	(Bornheim et al., 2008)
Vim wt tg	Transgene Mauslinie, welche das Wildtyp Vimentin-Gen unter der Kontrolle des endogenen Vimentin Promotors exprimiert.	(Bornheim et al., 2008)
Vim ΔC2B tg / Vim ko ^{-/-}	Mauslinie, die das Vimentin ΔC2B Transgen auf einem Vimentin-defizienten Hintergrund exprimiert.	diese Arbeit

2.15 Antikörper

2.15.1 Primärantikörper

Antigen	Klon	Herkunft des Antikörpers	Verdünnung	Referenz
Aktin	AC-40	Maus	1:200 (IF) 1:1000 (WB)	Sigma
Aktin	AC-15	Maus	1:500 (IF) 1:5000 (WB)	Sigma
c-Myc	9E10	Maus, Hybridom	unverdünnt (IF)	Sigma,

				selbst hergestellt
CP49	2980	Kaninchen	1:50 (IF) 1:500 (WB)	Roy Quinlan, Durham
F-Aktin	Phalloidin-A488	-	1:20 (IF)	Invitrogen
Filensin	3241	Kaninchen	1:50 (IF) 1:500 (WB)	Roy Quinlan, Durham
FLAG	M2	Maus	1:2000 (IF)	Sigma
FLAG	F7425	Kaninchen	1:1000 (IF) 1:5000 (WB)	Sigma
GFAP	Z0334	Kaninchen	1:500 (IF)	Dako
GFP	42704	Kaninchen	1:100 (IF) 1:2500 (WB)	Chemokine
GFP	ab1218	Maus	1:2000 (WB)	Abcam
HA	3F10	Ratte	1:1000 (WB)	Roche
HSP70	W27	Maus	1:400 (IF) 1:4000 (WB)	Santa Cruz
HSP70	SPA-820	Maus	1:5000 (WB)	Stressgene
Plectin	HD1	Maus	1:200 (IF) 1:2000 (WB)	Katsushi Owaribe
Synemin	α -Syn	Kaninchen	1:200 (IF)	Denise Paulin, Paris
Talin	8D4	Maus	1:200 (IF)	Sigma-Aldrich
Tubulin	B5-1-2	Maus	1:20.000 (WB)	Sigma
Ubiquitin	P4G7	Maus	1:1000 (WB)	Abcam
Vimentin	3B4	Maus	1:100 (IF) 1:1000 (WB)	Harald Herrmann, DKFZ
Vimentin	GP53	Meerschwein	1:100 (IF) 1:2000 (WB)	Progen
Vimentin	vim_CT	Kaninchen	1:1000 (IF) 1:30.000 (WB)	Peptide Specialty Lab, Heidelberg
Vinculin	H-300	Kaninchen	1:250 (IF)	Santa Cruz
β 1-Integrin	9EG7	Ratte	1:50 (IF)	Reinhard Fäßler, Martinsried

2.15.2 Sekundärantikörper

	Antigen	Herkunft des Antikörpers	Verdünnung	Referenz
Alexa488	Kaninchen	Ziege	1:800 (IF)	Molecular Probes
Alexa488	Maus	Ziege	1:800 (IF)	Molecular Probes
Alexa488	Ratte	Ziege	1:800 (IF)	Molecular Probes
Alexa488	Meerschwein	Ziege	1:800 (IF)	Molecular Probes
Alexa594	Kaninchen	Ziege	1:800 (IF)	Molecular Probes
Alexa594	Maus	Ziege	1:800 (IF)	Molecular Probes
Alexa594	Ratte	Ziege	1:800 (IF)	Molecular Probes
Alexa594	Meerschwein	Ziege	1:800 (IF)	Molecular Probes
Cy2	Kaninchen	Esel	1:800 (IF)	Dianova
Cy2	Maus	Esel	1:800 (IF)	Dianova
Cy2	Ratte	Esel	1:800 (IF)	Dianova

Cy3	Kaninchen	Esel	1:800 (IF)	Dianova
Cy3	Maus	Esel	1:800 (IF)	Dianova
Cy3	Ratte	Esel	1:800 (IF)	Dianova
Peroxidase	Kaninchen	Ziege	1:30.000 (WB)	Dianova
Peroxidase	Maus	Ziege	1:30.000 (WB)	Dianova
Peroxidase	Ratte	Ziege	1:30.000 (WB)	Dianova
Peroxidase	Meerschwein	Ziege	1:30.000 (WB)	Dianova

2.16 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Bakterienschüttler	innova4000	New Brunswick Scientific
Blotkammer	Trans-Blot Cell	BioRad
Blotkammer, Semi dry	Fast Blot B49	Biometra
Blotkammer, Semi dry	Perfect Blue Sedec M	PeqLab
Brutschrank	B6/ B12/ B20	Hereaus
Brutschrank	CB 150	Binder
Filmentwicklermaschine	Curix 60	Agfa
Fluoreszenz-Mikroskop	Axiophot 2	Zeiss
Geldokumentationssystem	UV-Systeme	Intas
Gel-Gießstand (Polyacrylamidgele)	Mighty Small Dual gel Caster	Hoefer
Gelkammer	SE600 Ruby	Amersham Bioscience
Gelkammer (Agarosegele)	B1A, B2	PeqLab
Gelkammer (Polyacrylamidgele)	Mighty Small SE250	Hoefer
Heizblock	HMR20	HLC Biotech
Homogenisator	Potter-Elvehjem	Braun
Hybridisierungsöfen	Hybridisierer HB-1D	Techne
Kryostat	CM3050S	Leica
Laminarflow System	Herasafe	Heraeus
LSM-Mikroskop	Fluoview1000	Olympus
LSM-Mikroskop	LSM510	Zeiss
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph
Mikrotom	RM2155	Leica
Mikrowelle, Histologie	Vacuum Histoprocessor RHS-1	Milestone
Mini-Zentrifuge	MCF-2360	LMS
Ofen, Gewebetrocknung	TDO66	Medite
Paraffin Gewebeinfiltrationsautomat	Tissue-Tek VIP	Sakura
Paraffineinbettstation	TEC	Sakura
PCR-Thermocycler	T Gradient	Biometra
pH-Meter	761	Calimatic Knick
Photometer	Genesys 10UV	Thermo Electron
Pipetten (10, 20, 200, 1000 µl)	Pipetman	Gilson
Pipettierhilfe	vac-petus	Faust

Polytron Ultra Turrax	T 25	Janke & Kunkel
Rollermixer	SRT2	Stuart Scientific
Stereomikroskop, präparativ	SMZ1500	Nikon
Tischschüttler	3016	GFL
Vakuumpumpe	PM20405	VWR
Vortexer	Vortex Genie2	Scientific Industries
Waage	BP2100S	Sartorius
Waage (Feinwaage)	BP210D	Sartorius
Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q Plus Nanopure	Barnstead
Wasserbad	U3 und TW12	Julabo
Zellkultur-Mikroskop	Telaval 31	Zeiss
Zentrifugen	5417R, 5810R, 5417C	Eppendorf

2.17 Sonstige Materialien

2.17.1 Verbrauchsmaterial

Plastikwaren und Reaktionsgefäße werden, von den Firmen Becton-Dickinson, Eppendorf, Greiner und Sarstedt bezogen.

Dialyseschläuche, Ausschlussgröße 10 kDa	Roth
Faltenfilter	Schleicher & Schuell
Hybond N Nitrozellulose Membran	Amersham
Parafilm M	Pechiney
Röntgenfilme SuperRX	FujiFilm
Sterilfilter 0,4 µm und 0,2 µm	Schleicher & Schuell
Whatman 3MM-Papier GB 002	Schleicher & Schuell
Einfrierbehälter QualiFreeze	Qualilab

2.17.2 Präparationsbesteck

Präparationsbesteck zur Präparation von Embryonen und adulten Tieren wird von Witte GmbH (Solingen) bezogen. Nach der Benutzung wird das Präparationsbesteck gereinigt und für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert.

2.17.3 Reagenzien

DPX, Einbettmedium Histologie	Fluka
Mineralöl für PCR	Sigma
Prolong Gold, Einbettmedium	Invitrogen
Protease Inhibitor Complete	Roche
Proteasome Substrate III, #539142	CalBiochem
Tissue Tek O.C.T.	Sakura

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Analytische Plasmid-Isolierung (Mini-Präparation)

Die analytische Plasmidisolierung ermöglicht die Präparation von Plasmid-DNS aus Bakterien. Mit der gewonnenen DNS können Testspaltungen unter Verwendung von Restriktionsendonukleasen durchgeführt werden, um rekombinante Klone zu identifizieren.

Eine Einzelkolonie transformierter Bakterien wird in 2 ml LB-Medium mit entsprechendem Selektions-Antibiotikum überführt und ÜN bei 37°C und 225 Upm inkubiert. Durch Verwendung vom schnellwachsenden *E.coli* Stamm TG1 in TB-Medium kann die Inkubationszeit auf 8 bis 10 Stunden reduziert werden. Von dieser Kultur werden 1,5 ml in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und die Bakterien durch Zentrifugation (5 min, 3.800 g, RT) sedimentiert. Nach Dekantieren des Überstands werden die Bakterien in 400 µl Resuspensionspuffer P1 resuspendiert. Anschließend werden 400 µl Lysepuffer P2 zum Ansatz gegeben, durch Invertieren gemischt und 2 min bei RT inkubiert. Während dieser Zeit werden die Zellwände der Bakterien zerstört und die RNS durch die im Puffer enthaltene RNase abgebaut. Zum Ansatz werden 400 µl Neutralisierungspuffer P3 hinzugegeben und durch Invertieren gründlich gemischt. Durch anschließende Zentrifugation bei 20.000 g für 5 min kommt es zu einer Sedimentation der Zelltrümmer sowie der daran haftenden genomischen Bakterien-DNS. Der die Plasmid-DNS enthaltende Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNS durch Zugabe von 1 ml Isopropanol gefällt. Durch Zentrifugation bei 20.000 g für 10 min präzipitiert die DNS. Der Überstand wird verworfen und die DNS mit 0,2 ml 70 % Ethanol gewaschen. Nach Trocknung des Pellets wird die DNS in 50 µl TE-Puffer gelöst.

3.1.2 Präparative Plasmid-Isolierung (Midi-Präparation)

Zur Isolierung größerer Mengen (200-400 µg) Plasmid-DNS mit hohem Reinheitsgrad wird der Reagenziensatz der Firmen Qiagen oder Macherey-Nagel verwendet. Die Plasmid-Präparation erfolgt durch alkalische Lyse und anschließende Ionenaustausch-Chromatographie entsprechend den Herstellerangaben. Die so

gewonnene Plasmid-DNS wird für Klonierungen, Sequenzierungen und Transfektionen von somatischen Zellen verwendet.

3.1.3 Isolierung genomischer DNS aus Gewebe

Zur Isolierung genomischer DNS aus Schwanzspitzen der Maus werden Schwanzbiopsien (etwa 0,5 cm) in 0,2 ml Lyse-Puffer mit 5 µl Proteinase K (20 mg/ml) und 5 µl RNase (20 mg/ml) bei 55°C, unter langsamer Dreh- oder Schüttelbewegung, ÜN lysiert. Haare und unlösliche Zellrückstände werden durch Zentrifugation (20.000 g, 5 min, RT) abgetrennt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 160 µl Isopropanol und mehrmaliges Invertieren wird die DNS präzipitiert. Die DNS wird mit einer gelben Pipettenspitze gefischt, durch kurzes Eintauchen in 70 % Ethanol gewaschen und in ein neues Reaktionsgefäß mit 200 µl TE-Puffer überführt. Das Reaktionsgefäß wird mit geöffnetem Deckel 10 min bei 65°C inkubiert, um Spuren von Ethanol zu entfernen. Danach wird die Pipettenspitze entfernt und die DNS wird durch Inkubation für 3 h bei 55°C gelöst. Die genomische DNS wird bei 4°C gelagert und kann für Genotypisierungen mittels PCR eingesetzt werden.

3.1.4 Reinigung und Fällung von DNS

Um Nukleinsäuren von Proteinen und anderen Zellbestandteilen zu trennen, bedient man sich der Phenol/Chloroform-Extraktion. Proteinverunreinigungen werden durch mehrmalige Phenol-Extraktion vollständig denaturiert und von den in der wässrigen Phase verbleibenden Nukleinsäuren abgetrennt. Die DNS wird in TE gelöst und je 0,4 Volumen TE-gesättigtes Phenol und Chloroform hinzugegeben und gründlich gemischt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 2 min, 20.000 g bei 4°C wird die obere wässrige Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Bei bestehender Interphase wird die Phenol/Chloroform-Extraktion wiederholt. Um Reste von Phenol zu entfernen, wird zum Überstand 1 Volumen Chloroform zugegeben, gemischt und erneut zentrifugiert (4°C, 2 min, 20.000 g). Die wässrige Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Nukleinsäuren mit einem Volumen absoluten Ethanol präzipitiert (10 min, 20.000 g). Bei geringen DNS-Konzentrationen kann zur Erhöhung der Ausbeute vor der Zentrifugation 5 µg Glykogen zugegeben,

und der Ansatz für 30 min bei -20°C inkubiert werden. Nach kurzem Trocknen wird das DNS-Pellet in A. bidest oder TE-Puffer resuspendiert.

3.1.5 Konzentrationsbestimmung von DNS

Zur Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration einer Lösung wird die Absorption einer geeigneten Verdünnung bei 260 nm in einer Quarzküvette mit Hilfe eines Photometers gemessen. Die Konzentration wird unter der Annahme berechnet, daß eine Absorption von 1, bei einer Schichtdicke von 1 cm, 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNS bzw. 40 $\mu\text{g/ml}$ RNS entspricht. Zusätzlich kann das Verhältnis der Absorption bei 260 und 280 nm zur Abschätzung der Reinheit einer DNS-Präparation genutzt werden. Für reine DNS ergibt sich ein Verhältnis der Absorptionen 260/280 nm von 1,8 (Sambrook and Russell, 2001).

3.1.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion („Polymerase Chain Reaction“ PCR)(Mullis and Faloona, 1987) ist ein Verfahren zur exponentiellen und selektiven Amplifikation von DNS-Fragmenten. Hierzu werden aus einem bekannten DNS-Bereich zwei Oligonukleotid-Startermoleküle (Primer) abgeleitet, die gegenläufig an die denaturierten komplementären DNS-Stränge binden, deren Sequenzen bekannt sind und die den gewünschten Bereich flankieren. Durch die hitzestabile DNS-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) werden die 3'-Enden der Startermoleküle so verlängert, daß zwei komplementäre DNS-Stränge entstehen, die ihrerseits nach der Denaturierung wieder als Matrize dienen. Das Resultat der Wiederholungen (25-35 fach) aus Denaturierung, Primer-Anlagerung und DNS-Synthese ist die selektive Amplifikation des Primer-flankierten Bereichs der DNS. Die abschließende verlängerte Synthesephase ermöglicht die Verlängerung unvollständig vervielfältigter DNS-Stränge. Eine Analyse der amplifizierten DNS-Sequenz erfolgt durch Agarose-Gelelektrophorese. PCR-Puffer (10x), MgCl_2 und Taq-Polymerase werden von Invitrogen bezogen. Die Reaktionen werden in der Regel in einem 25 μl -Ansatz durchgeführt.

3.1.6.1 PCR-Analysen transgener Mäuse

3.1.6.1.1 PCR zum Nachweis des Vimentin Transgens

Reaktionsansatz:

DNS	2,0 µl
PCR-Puffer (10x)	2,5 µl
MgCl ₂ [50 mM]	0,75 µl
dNTP's [5 mM]	1,0 µl
myc for. [25 µM]	0,5 µl
myc rev. [25 µM]	0,5 µl
A. bidest	17,55 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl

Reaktionsprogramm:

95°C	5 min	1x
95°C	30 sek	30x
56°C	30 sek	
72°C	25 sek	
72°C	5 min	1x
4°C	∞	

Ein PCR-Fragment von 244 Bp zeigt die Anwesenheit des Myc-Tags, N-terminal vom Transgen, im Genom der untersuchten Mäuse an. Ein Fragment von 214 Bp die Anwesenheit des *Vim* Wildtyp-Lokus.

3.1.6.1.2 PCR zum Nachweis des Vimentin-'knock-outs'

Zum Nachweis der funktionalen Deletion des Vimentingens wird die in Exon 1 inserierte *neo*-Kassette nachgewiesen.

Reaktionsansatz:

DNS	2,0 µl
PCR-Puffer (10x)	2,5 µl
MgCl ₂ [50 mM]	0,75 µl
dNTP's [5 mM]	1,0 µl
vim1 [25 µM]	0,5 µl
vim2 [25 µM]	1,0 µl
vim3 [25 µM]	0,5 µl
A. bidest	16,55 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl

Reaktionsprogramm:

94°C	5 min	1x
94°C	1 min	30x
65°C	30 sek	
72°C	40 sek	
72°C	5 min	1x
4°C	∞	

Bei Anwesenheit eines *Vim* Wildtyp-Allels entsteht ein Amplikon von 398 Bp, im Falle des *Vim* ko^{-/-} Allels ein PCR-Fragment von 530 Bp. Heterozygote Mäuse weisen beide DNS-Fragmente auf.

3.1.6.2 PCR-Analyse zum Nachweis verschiedener DNS-Moleküle

Reaktionsansatz:

DNS	1 µl
PCR-Puffer (10x)	2,5 µl
MgCl ₂ [50 mM]	0,75 µl
dNTP's [5 mM]	2 µl
Primer for. [25 µM]	0,5 µl
Primer rev. [25 µM]	0,5 µl
A. bidest	17,55 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl

Reaktionsprogramm:

95°C	5 min	1x
95°C	30 sek	30x
55 → 65°C	1 min	
72°C	2 min	
72°C	7 min	1x
4°C	∞	

Mit dieser PCR-Reaktion ist die Amplifikation verschiedener DNS-Fragmente mit den unter Abschnitt 2.10.1 genannten Primer-Kombinationen möglich. Ein Temperaturgradient ermöglicht die parallele Optimierung der Annealing-Temperatur.

3.1.6.3 'Site-directed'-Mutagenese

Bei der 'site-directed'-Mutagenese werden Primer verwendet, die zur Ausgangssequenz sowohl komplementäre als auch mutierte Sequenz enthalten. Dadurch wird bei der Amplifikation eine DNS mit bekannter Sequenz und einer definierten Mutation generiert. Wird zusätzlich mit der Mutation eine Restriktionsstelle eingefügt oder zerstört, kann mittels Restriktion der Erfolg der Mutagenese nachgewiesen werden. Die Primer sind zwischen 25 und 45 Bp lang und sollten etwa 10 bis 15 Bp korrekte Basenpaarung up- und downstream der Mutation erlauben. Der GC-Gehalt sollte über 40 % liegen und die Primer sollten mit G oder C Basen enden. Die PCR muß mit HPLC- oder Gel-gereinigten Primern durchgeführt werden.

Reaktionsansatz:

PCR-Puffer (10x)	5 µl
dNTP's	1 µl
DNS	10 ng
Primer 1	125 ng
Primer 2	125 ng
Pfu-Polymerase (2,5 U/µl)	1 µl
A. bidest	ad 50 µl

Reaktionsprogramm:

95°C	30 sek	1x
95°C	30 sek	18x
60°C	1 min	
68°C	1 min je kB	
68°C	7 min	1x
4°C	∞	

Die PCR-Reaktion wird auf Eis abgekühlt, 10 U *DpnI* hinzugeben und nach kurzem Mischen für 1 h bei 37°C inkubiert. *DpnI* zerschneidet dabei spezifisch die methylierten und somit unmutierten DNA-Stränge. Ein bis 10 µl der *DpnI*-verdauten DNS werden benutzt, um kompetente *E.coli* zu transformieren. Auf LB-Platten mit

entsprechendem Antibiotikum werden positive Klone ÜN selektiert. Aus Flüssigkulturen wird Plasmid-DNA präpariert. Werden durch die Mutation bzw. Insertion oder Deletion neue Restriktionsschnittstellen geschaffen, können positive Klone durch einen Testverdau identifiziert werden.

3.1.7 DNS-Sequenzierung

Alle Sequenzierungen werden als Auftragssequenzierungen bei der Firma 4baseLab durchgeführt. Hierzu werden 10 µg DNS versandt. Zur Sequenzierung werden Vektor-spezifische Standardprimer oder wenn notwendig, von der Firma synthetisierte, interne Primer verwendet.

3.1.8 Agarose Gelelektrophorese

3.1.8.1 Native Agarose Gelelektrophorese

Zur analytischen und präparativen Trennung von DNS-Fragmenten dient die native Agarose-Gelelektrophorese im Gleichspannungsfeld. Die DNS-Moleküle wandern aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen zum positiven Pol. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt hierbei sowohl von der Molekülgröße als auch von der Konformation der DNS-Moleküle (einzelsträngig, doppelsträngig, zirkulär geschlossen oder mit Einzelstrangbruch) ab. Die verwendete Agarosekonzentration liegt zwischen 0,6 und 2,5 % und richtet sich nach der Länge der zu erwartenden Fragmente. Dazu wird eine entsprechende Menge Agarose in 1x TAE-Puffer aufgekocht, nach Abkühlung auf ca. 70°C, 1 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben und in die vorgesehene Gelkammer gegossen. Die zu analysierenden Proben werden vor dem Beladen des Gels mit der entsprechenden Menge 10x DNS-Ladepuffer versetzt. Die Bestimmung der DNS-Fragmentlängen erfolgt durch den parallelen Auftrag eines Längenstandards (siehe 2.11.). Die Auftrennung der Fragmente erfolgt bei Spannungen bis zu 140 V.

3.1.8.2 Ultraschnelle Agarose Gelelektrophorese in Natrium-Borsäure Puffer

Zur schnellen, analytischen Trennung von DNS-Fragmenten wird die Methode der ultraschnellen, hochauflösenden Agarose-Gelelektrophorese in Natrium-Borsäure

Puffer (SB-Puffer) benutzt (Brody and Kern, 2004). Bei der Verwendung von SB-Puffer findet keine Überhitzung des elektrophoretischen Systems statt, wodurch eine bis zu 15-fach schnellere Auftrennung von DNS- und RNS-Fragmenten, im Vergleich zu TAE-Puffer, möglich ist. Mini-Gele (50 ml) werden mit 200-250 V, große Gele (100 ml) mit einer Spannung von 300-400 V und einer Laufzeit von 10-20 min verwendet.

3.1.9 Enzymatische Modifikation von DNS

3.1.9.1 Restriktion von DNS

Für die Restriktion der DNS werden Restriktionsendonukleasen des Types II verwendet. Sie erkennen doppelsträngige, palindromische DNS-Abschnitte von 4 bis 8 Basenpaaren Länge und schneiden fast immer innerhalb der Erkennungssequenz. In Folge der Restriktion entstehen entweder glatte Doppelstrangenden oder Einzelstrangenden mit einem 3'- oder einem 5'-Überhang (kohäsive Enden). Für die vollständige Spaltung der DNS werden 2 U Restriktionsendonuklease pro μg DNS bei der vom Hersteller angegebenen Reaktionstemperatur eingesetzt. Es wird ein Reaktionsvolumen von 10 μl gewählt, die Inkubationszeit beträgt mindestens 30 min.

3.1.9.2 Auffüllen von 3' und 5' DNS-Überhängen

Durch Restriktionsspaltung entstandene, überhängende DNS-Enden werden entweder durch die Klenow-DNS-Polymerase I aus *E.coli* oder die T4-DNS-Polymerase aus dem Phagen T4 geglättet. Um ein 5'-überhängendes Ende aufzufüllen, wird das Klenow-Fragment verwendet, zum Abbau 3'-überhängender Enden die T4-DNS-Polymerase. Das Glätten wird im Falle der Klenow-DNS-Polymerase I in einem Restriktionsansatz von 20 μl mit 1 μl dNTP's sowie 1 μl Enzym in Puffer H (Roche) für 45 min bei 37°C durchgeführt. Bei Einsatz der T4-DNS-Polymerase werden zu 20 μl Restriktionsansatz 2 μl dNTP's, 2 μl T4-DNS-Polymerase und 2,5 μl 10x Puffer hinzugegeben. Der Ansatz wird bei RT für 5 min inkubiert. In beiden Ansätzen wird das Enzym anschließend hitzeinaktiviert (20 min bei 65°C) und die DNS präzipitiert oder durch Gelelution gereinigt.

3.1.9.3 Dephosphorylierung von Vektorenden

Die Dephosphorylierung von Vektorenden wird eingesetzt, um die Religation eines linearisierten Vektors zu verhindern. Hierzu werden die durch Restriktion entstandenen freien 5'-Phosphatgruppen mit der alkalischen Phosphatase aus Krabben (SAP = shrimp alkaline phosphatase) entfernt. Der Restriktionsansatz bzw. das Geleluat wird mit 1,5 U SAP und 0,1 Volumen 10x Phosphatasepuffer versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach werden weitere 1,5 U SAP hinzugegeben und noch einmal für 30 min bei 37°C inkubiert. Es folgt eine Hitzeinaktivierung der SAP bei 65°C für 20 min sowie die Zugabe von 10 mM EDTA. Die dephosphorylierte DNS wird in der Regel über ein Agarose-Gel gereinigt.

3.1.10 Extraktion von DNS aus Agarosegelen

Das entsprechende DNS-Fragment wird unter langwelligem UV-Licht (304 nm) mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Das Gelstück wird in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und die DNS mit Hilfe des QiaEX II Gel Extraction Kit (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben extrahiert. Die DNS wird mit A. bidest oder TE-Puffer von den Silikabeads eluiert und bei -20°C gelagert.

3.1.11 Ligation von DNS-Fragmenten

Die Ligation von DNS-Fragmenten wird mit Hilfe der T4-DNS-Ligase durchgeführt. Sie verknüpft ATP-abhängig freie 5'-Phosphatgruppen mit freien 3'-Hydroxylgruppen von DNS-Molekülen durch die Bildung von Phosphodiesterbindungen. Die Ligation kann zwischen glatten oder kohäsiven Enden stattfinden. Vektor-DNS (20-50 ng) und Insert-DNS werden im molaren Verhältnis von 1:3 bis 1:10 eingesetzt und mit 5 U T4-Ligase, sowie 2 µl Ligase-Puffer (10x) versetzt. Das Reaktionsvolumen beträgt 20 µl. Die Ligation erfolgt entweder bei RT für 2 h oder ÜN bei 16°C. 5 µl der Ligrationsreaktion werden benutzt, um kompetente *E.coli* zu transformieren.

3.1.12 Direkte Klonierung von PCR-Fragmenten

Die direkte Klonierung von PCR-Fragmenten aus dem PCR-Ansatz oder nach Aufreinigung der PCR-Fragmente aus einem Agarose-Gel (3.1.10) erfolgt nach

Angaben der Hersteller in die Vektoren pCRII-TOPO, pCR-Blunt-TOPO oder pJET Blunt. Alle Vektoren sind mit dem Enzymsystem der DNS-Topoisomerase I ausgestattet und ermöglichen eine schnelle und effiziente Klonierung von PCR-Fragmenten.

3.1.13 Transformation von *E.coli*

Als Transformation bezeichnet man die Aufnahme von Fremd-DNS durch Prokaryoten. Die Bakterienzellwand wird bei dem Verfahren nach (Hanahan, 1983) durch Behandlung mit CaCl_2 porös gemacht, so daß die Aufnahme der DNS ermöglicht wird.

3.1.13.1 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Mit einer Einzelkolonie werden 5 ml LB-Medium inokuliert und ÜN auf dem Thermoschüttler bei 225 Upm und 37°C inkubiert. Sie werden als Vorkultur zu 100 ml vorgewärmtem LB-Medium gegeben. Die Kultur wird bis zu einer OD_{600} von 0,45-0,55 bei 37°C geschüttelt (225 Upm). Anschließend wird die Kultur auf zwei 50 ml Röhrchen aufgeteilt und die Bakterien sedimentiert (3600 g, 4°C, 5 min). Der Überstand wird dekantiert und das Sediment bei 4°C in je 15 ml TFB I resuspendiert. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis schließt sich eine erneute Sedimentation (3600 g, 4°C, 5 min) an, der Überstand wird verworfen. Die Sedimente werden bei 4°C in je 2 ml TFB II aufgenommen und Aliquots von 50-200 µl Bakteriensuspension werden in Mikroreaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Bakterien sind bei -80°C über mehrere Monate lagerbar.

3.1.13.2 Transformation von *E.coli* durch Hitzeschock

Pro Transformationsansatz wird ein Aliquot (50 µl) transformationskompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut und dem Ligationsansatz beigefügt. Der Ansatz wird für 30 min auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit adsorbiert die DNS an die Bakterienzellwand. Zur Transformation wird ein Hitzeschock bei 42°C für 45 sek durchgeführt und der Ansatz anschließend sofort auf Eis gekühlt. Durch den Hitzeschock wird die DNS in die Bakterienzelle aufgenommen. Zum Transformationsansatz werden 250 µl LB-Medium gegeben und bei 37°C auf dem Schüttler (225 Upm) für 60 min inkubiert.

In dieser Zeit prägt sich die auf dem Plasmid kodierte Antibiotika-Resistenz aus. Es werden je 50 µl und 250 µl der Bakteriensuspension auf LB-Platten mit einem geeigneten Antibiotikum ausgestrichen und die Platten bei 37°C ÜN inkubiert.

3.1.13.3 Transformation von *E.coli* durch Elektroporation

Pro Transformationsansatz wird ein Aliquot (50 µl) transformationskompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut und dem Ligationsansatz beigefügt. Der Ansatz wird für 30 min auf Eis inkubiert. Die Bakterienlösung wird in eine vorgekühlte Küvette gegeben und bei 1,2 kV, 3 µF Kapazität, (BioRad Gene Pulser II) geschockt. Danach wird 1 ml 37°C-warmes LB oder SOC Medium zugegeben und der Ansatz 45 min bei 37°C, 225 Upm geschüttelt. Es werden je 100 µl und 400 µl der Bakteriensuspension auf LB-Platten mit einem geeigneten Antibiotikum ausgestrichen und die Platten bei 37°C ÜN inkubiert.

3.2 Zellkulturmethoden

Alle Arbeiten zur Kultivierung eukaryotischer Zellen werden in Sterilbänken mit Laminar-Luftstrom unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle benötigten Lösungen werden autoklaviert oder steril filtriert.

3.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Zellen werden in DMEM-Medium mit 10 % FCS in Inkubatoren bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach drei Tagen ist ein Wechsel des Mediums und/oder das Passagieren der Zellen notwendig.

3.2.2 Passagieren von Zellen

MCF-7 Zellen werden bei einer Konfluenz von 90-100 % im Verhältnis 1/6 bis 1/10 aufgeteilt. Hierfür wird das Medium abgesaugt, die Zellen werden mit PBS gewaschen und es wird 1/10 des Kulturvolumens an Trypsin hinzugegeben. Nach 3-minütiger Inkubation bei 37°C werden die Zellen durch leichtes Klopfen vom Boden der Kulturschale abgelöst und das Trypsin durch Zugabe von Medium inaktiviert. Die

Zellen werden sedimentiert (3 min, 250 g), durch vorsichtiges Pipettieren in Medium resuspendiert und in den gewünschten Verdünnungen neu ausplattiert.

3.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Durch Behandlung mit Trypsin werden die Zellen einer 10 cm-Schale mit 90 % Konfluenz vom Schalenboden abgelöst. Sie werden sedimentiert (5 min, 250 g, RT), in 500 µl Kulturmedium aufgenommen und in eine Einfrierampulle überführt, in die zuvor 500 µl 2x Einfriermedium vorgelegt wurden. Die befüllte Einfrierampulle wird in speziellen Behältern (QualiFreeze, Qualilab) 24 Stunden bei -80°C gelagert, um ein schonendes, langsames Einfrieren zu gewährleisten. Anschließend werden die Zellen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wird ein Zell-Aliquot aus dem flüssigen Stickstoff in ein 37°C-warmes Wasserbad überführt. Anschließend werden die Zellen in eine Zellkulturflasche mit entsprechender Menge vorgewärmtem Medium pipettiert. Am nächsten Tag wird das Medium gewechselt, um Zelltrümmer zu entfernen.

3.2.4 Transfektion von Zellen

Zellen mit 30-80 % Konfluenz werden in 24-Loch bis 6-cm Schalen mit gereinigten Plasmiden entsprechend den Herstellerangaben mit Lipofectamin2000 (Invitrogen), Lipofectamin LTX (Invitrogen), CaPO₄, FuGene HD (Roche), ExGen500 (Fermentas), NanoFect (Qiagen) oder Nanofectin (PAA) transfiziert. Für die meisten Zelllinien wurde mit Lipofectamin2000 die höchste Transfektionseffizienz erzielt. Vereinzelt wurden toxische Effekte beobachtet. Deshalb empfiehlt es sich mehrere Zeitpunkte, in der Regel 48 und 72 Stunden, nach der Transfektion zu analysieren. MCF-7 Zellen konnten auch mittels CaPO₄ mit bis zu 80 % Effizienz transfiziert werden.

3.2.5 Selektion auf stabile Integration von Plasmid-DNS

Um Plasmid-DNS stabil ins Genom der transfizierten Zellen zu integrieren, wird eine Selektion auf die Anwesenheit eines Selektionsmarkergens (Neomycin) durchgeführt. Das Selektionsmedium wird alle 2-3 Tage gewechselt. In einer Verdünnungsreihe wird zuvor die optimale Konzentration des Antibiotikums für die entsprechende Zelllinie bestimmt. Im Fall von 3T3 F442A Zellen wird G418 in einer Konzentration

von 1 mg/ml eingesetzt. Resistente Klone werden unter Selektionsdruck ausgewählt, vereinzelt und mit DMEM+ Medium kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz werden zwei Drittel der Zellsuspension weiterkultiviert und ein Drittel zur Gewinnung von Proteinlysate verwendet, das im Immunoblot eingesetzt wird. Ein Teil der Zellen wird auf Glasplättchen ausgesät, um die Expression des Transgenes mittels Immunfluoreszenz zu analysieren. Nach Expansion der positiven Klone wird ein Teil der Zellen zur späteren Verwendung eingefroren.

3.2.6 Herstellung von murinen embryonalen Fibroblasten

Embryonen werden am Tag E14 präpariert und in GMEM überführt. Der Kopf und die inneren Organe werden entfernt und der Embryo wird 3x mit PBS gewaschen. Die Embryonen werden geschnitten und mit 15 ml T/E-Lösung und sterilen Glasperlen unter Schütteln 10-15 min bei 37°C inkubiert. Zellen werden sedimentiert, in neuem GMEM Medium mit 10 % FCS aufgenommen und vereinzelt. Aliquots werden auf 10 cm-Schalen ausplattiert. Am nächsten Tag wird das Medium gewechselt. Nach 1-2 Passagen enthält die Kultur reine Fibroblasten. Aliquots werden in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.2.7 Herstellung von Myc-Antikörper

Der Klon 9E10 wird als Suspensionskultur in GMEM Medium mit 10 % FCS bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Das Medium wird nach 8 Tagen durch Zentrifugation abgetrennt und in Aliquots bei -80 °C gelagert. Das so gewonnene Myc-Hybridom wird in verschiedenen Verdünnungen auf Ohr-Kryoschnitten transgener Mäuse, oder anderem geeignetem Material, getestet.

3.3 Tierexperimentelle Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche erfolgten nach den Vorgaben des geltenden Tierschutzgesetzes und sind durch das Regierungspräsidium Köln (Az: 50.203.2 - BN24,20/04 und Az: 9.93.2.19.31.07.247) genehmigt. Tiere werden durch zervikale Dislokation oder CO₂ getötet.

3.3.1 Zucht und Haltung von Mäusen

Alle Mauslinien werden in Mikroisolator Käfigen des IVC-Typs (individually ventilated cage) in einem 12-stündigen Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Verpaarungen werden im Verhältnis 1:1 oder 1:2 angesetzt. Die Kontrolle des Vaginalpfropfens (VP), der aus denaturierten Proteinen des Ejakulats besteht, wird am Tag nach der Verpaarung am frühen Vormittag durchgeführt. Der VP löst sich etwa 12 bis 14 Stunden nach der Verpaarung auf. In der Regel werfen C57Bl/6 Weibchen 20 Tage nach Konzeption (dpc) mit Beginn der Hell-Phase. Den Jungtieren werden im Alter von 5 bis 6 Wochen Ohrmarken zur Identifizierung gesetzt. Gleichzeitig wird jedem Tier ein Stück der Schwanzspitze abgeschnitten, aus dem genomische DNS gewonnen und der Genotyp der Maus mittels PCR bestimmt wird.

3.3.2 Präparation von Geweben und Organen

Gewebe werden aus der Bauchhöhle präpariert und in PBS-Puffer überführt. Die einzelnen Organe werden für die Herstellung von Gefrierschnitten direkt in -80°C kaltem Isopentan eingefroren und bei -80°C gelagert. Alternativ werden Gewebe in 4 % PFA in PBS fixiert oder in heißem 5x Laemmli-Probenpuffer lysiert.

3.3.3 Herstellung von transgenen Mauslinien

Die DNS-Konstrukte wurden von D. Bröhl kloniert (Bröhl, 2002) und transgene Tiere wurden durch Pronukleusinjektion am Karolinska Institut, Zentrum für Transgene Technologie Stockholm, erzeugt. Die Gründertiere mit genetischem CBA Hintergrund wurden auf einen C57Bl/6 Hintergrund zurückgekreuzt und die Linien wurden als heterozygote Tiere für mehr als 7 Generationen fortgeführt.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Zellen

Die Zellen einer 10 cm-Kulturschale mit einer Konfluenz von etwa 90 % werden nach zweimaligem Waschen mit PBS bei RT und Zugabe von Proteaseinhibitoren (Complete, Roche) mit einem Gummischaber abgeschabt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Ansatz wird für 10 min gekocht. Das so entstandene

Lysat kann im Ultraschallbad oder durch Passagieren durch eine Nadel weiter aufgeschlossen werden. Das Proteinlysate ist bei -80°C lagerbar.

3.4.2 Herstellung von Proteinlysaten aus Geweben

Die präparierten und in Flüssigstickstoff gelagerten Gewebeproben werden in 95°C heißem 5x Laemmli-Probenpuffer (1 ml pro 100 mg Gewebe) aufgenommen und mit dem Ultra Turrax (2 min, 8000-20000 Upm) homogenisiert. Nach der Homogenisation wird die Suspension für 5 min auf 95°C im Wasserbad erhitzt. Bei anhaltender Viskosität wird nochmals für 5-10 min bei 95°C erhitzt. Um die Proteine von restlichen Verunreinigungen und Zelltrümmern zu trennen, wird die Suspension zentrifugiert (5 min, RT, 20.000 g) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um ein vollständiges Lösen der Disulfid-Brückenbindungen der Proteine zu erreichen, wird bis zu einer Endkonzentration von 40 mM DTT zugegeben. Die Proben werden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Vor dem Gelauftrag wird das Lysat für 5-10 min bei 95°C gekocht, um die Proteine zu denaturieren und die DNS zu hydrolysieren.

3.4.3 Präparation der löslichen und unlöslichen Zytoskelettfraction

Zytoskelettproteine besitzen im Vergleich zu anderen Proteinen eine geringe Löslichkeit und können somit durch Extraktion mit detergenshaltigen Lösungen oder durch Puffer mit hoher Ionenstärke aus Kulturzellen angereichert werden. Alle Präparationsschritte werden auf Eis durchgeführt. Zellen einer konfluenten 10 cm Schale werden zweifach mit PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit 4 ml eiskaltem Low-Salt-Extraktionspuffer aufgeschlossen, mit einem Zellschaber abgelöst und in einen Glas-Homogenisator überführt. Nach 5-facher Homogenisation mit einem L-Pistill wird dem Homogenisat Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche) zugefügt, 5 min auf Eis inkubiert und anschließend abzentrifugiert (10 min, 7.000 g, 4°C). Der Überstand wird abgenommen (lösliche Fraktion, SF), das Sediment in 7 ml High-Salt-Extraktionspuffer resuspendiert und weiter in einem Glas-Homogenisator mit S-Pistill etwa 30-fach homogenisiert. Nach einer weiteren Inkubation für 30 min auf Eis wird die unlösliche Fraktion (CF) abzentrifugiert (10 min, 15.000 g, 4°C) und der Überstand verworfen. Das Pellet der unlöslichen Fraktion wird in 600 μl TE-Puffer

resuspendiert, erneut abzentrifugiert und anschließend in 400 µl 5x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen. Die Lagerung erfolgt in Aliquots bei -80°C.

3.4.4 Bestimmung der Proteasomenaktivität in Zellhomogenisaten

5 Millionen Zellen werden in 2 ml Earl's balanced salt solution (EBSS) in einem Potter-Elvehjem Homogenisator (Braun) bei 4°C und 1,200 rpm für 3 Minuten aufgeschlossen. Im Überstand wird die Spaltung eines synthetischen, fluorogenen Proteasomensubstrates (50 µM, CalBiochem #539142) mit einem Varioskan Plattenreader (Thermo Fisher Scientific) bei 37°C über einen Zeitraum von 90 Minuten gemessen. Der Versuch wird im Triplikat durchgeführt und die Proteasomenaktivität wird normalisiert auf eine Proteinkonzentration von 1 µg/µl.

3.4.5 Bestimmung der Caspase- und Transglutaminase-Aktivität

Die Caspase- und Transglutaminase-Aktivität in Zell- und Gewebeextrakten wird bestimmt, wie unter (Bornheim et al., 2008) beschrieben.

3.4.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

3.4.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) basiert auf den proteinbindenden Eigenschaften des Coomassie Brilliantblau G250 Farbstoffes. Der gebildete Protein-Coomassie-Komplex verursacht eine Verschiebung des Extinktionskoeffizienten von 465 nm auf 595 nm, im Vergleich zum freien Farbstoff. Die Methode ist geeignet für Konzentrationen von 0,1-5 mg/ml Protein, für geringere Konzentration ist die BCA-Reaktion zu bevorzugen. Die Reaktion kann sowohl mit Küvetten und einem konventionellen Photometer als auch im Plattenformat mit Hilfe eines VarioScan Plattenreaders durchgeführt werden.

Zur Proteinbestimmung werden zu 1 ml Bradfordreagenz 10 µl Proteinlysat oder entsprechende Verdünnung gegeben und nach 5 min Inkubation bei RT die Extinktion bei 595 nm gemessen. Gleichzeitig wird eine Eichkurve mit einem BSA-Standard (0-1,25 bzw. 5 mg/ml in PBS) angesetzt und gemessen. Die Umrechnung der Proteinkonzentration anhand der Standard-Eichkurve erfolgt graphisch.

3.4.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mit BCA

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten mit geringen Konzentrationen im Bereich von 5-250 µg/ml, wird der Reagenziensatz „Bicinchononic Acid Kit“ der Firma Sigma verwendet. Es werden 2 bzw. 5 µl Lysat eingesetzt (Doppelbestimmung). Das Prinzip dieses Nachweises beruht auf der Fähigkeit von Proteinen, Kupfersulfat zu reduzieren. Die Bicinchoninsäure (BCA) komplexiert in einer Biuret-Reaktion das reduzierte Kupfer. Die Absorption dieses Komplexes ist bei 562 nm photometrisch nachweisbar, hierbei ist die Absorption proportional zur Proteinkonzentration. Die Durchführung erfolgt nach den Herstellerangaben.

3.4.7 Proteinfällung

3.4.7.1 Proteinfällung mit Trichloressigsäure

Proteine können durch Fällung mit Trichloressigsäure angereichert werden. Dazu wird auf Eis pro Volumeneinheit Proteinlösung 1 Volumen 10%ige Trichloressigsäure zugegeben, durch Invertieren gemischt, für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend abzentrifugiert (5 min, 20.000 g). Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 96% Ethanol gewaschen und getrocknet. Das Pellet wird in 5x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen, 5-10 min bei 95°C gekocht und in Aliquots bei -80°C gelagert.

3.4.7.2 Proteinfällung mit Aceton

Proteine können durch Fällung mit Aceton angereichert werden. Dazu wird die Proteinlösung mit 9 Teilen Aceton versetzt, gründlich mittels Vortexer aufgewirbelt und für 1 h bei -20 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 14.000 g, 4 °C) wird der Überstand entfernt, das Pellet in 0,5 ml eiskaltem 80%igen Aceton aufgenommen und erneut gründlich aufgewirbelt. Nach Zentrifugation wie zuvor wird das Pellet mit 0,5 ml eiskaltem absoluten Aceton versetzt, aufgewirbelt und nochmals zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes wird das Pellet bei RT vollständig getrocknet und dann in 5x Laemmli-Probenpuffer resuspendiert.

3.4.7.3 Proteinfällung mit Methanol und Chloroform

Proteine können durch Fällung mit Methanol und Chloroform angereichert werden. Dazu wird die Proteinlösung mit 3 Teilen Methanol und einem Teil Chloroform versetzt und gründlich mittels Vortexer gemischt. Nach Zugabe von 3 Teilen Wasser wird für eine Minute gemischt. Danach wird die Lösung für 5 min, 10.000 *g* zentrifugiert. Die obere Phase wird abgenommen und verworfen. Die Lösung wird mit 3 Teilen Methanol versetzt, gemischt und für 5 min, 10.000 *g* zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das getrocknete Pellet wird in 5x Laemmli-Probenpuffer resuspendiert.

3.4.8 Vimentin *in vitro*-Assemblierung und Viskositätsmessungen

Für *in vitro* Polymerisierungsexperimente werden Vimentin oder Vimentin-Punktmutationen in *E. coli* überexprimiert und anschließend gereinigt. Unter spezifischen Pufferbedingungen kann die Filamentbildung analysiert werden. Die Experimente werden in Kooperation mit Prof. Dr. H. Herrmann, DKFZ, Heidelberg durchgeführt. Die Experimente werden durchgeführt, wie unter (Herrmann et al., 1996) beschrieben.

3.4.9 Immunoblotanalysen

3.4.9.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) ermöglicht die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld, unabhängig von ihrer Eigenladung. Die Proteinproben werden mit SDS, einem anionischen Detergens, behandelt, welches sich an hydrophobe Aminosäuren anlagert, so daß die Eigenladung der Proteine vernachlässigt werden kann. Durch den Zusatz von β -Mercaptoethanol werden inter- und intramolekulare Disulfidbrücken reduziert. Die Proteinauftrennung erfolgt mit einem Sammel- und einem Trenngel, die sich in ihrem pH-Wert und ihrer Porengröße unterscheiden. Hierdurch wird die Fokussierung der Proteine in scharfe Banden erreicht. Die SDS-Proteinkomplexe ordnen sich im großporigen Sammelgel (pH 6,8) zwischen den vorauslaufenden Chloridionen (Leitonen) und den Glycin-Molekülen (Folgeionen) an, die bei diesem pH-Wert überwiegend als Zwitterionen mit einer Nettoladung von null vorliegen. Im

kleinporigen Trenngel (pH 8,8) erhält das Glycin eine negative Gesamtladung und überholt die SDS-Proteinkomplexe, wodurch der Sammeleffekt aufgehoben wird. Nun trennen sich die SDS-Proteinkomplexe nach ihrer molekularen Masse. Sie können anschließend mit verschiedenen Färbemethoden sichtbar gemacht werden. Zunächst wird das Trenngel bis etwa 0,5 cm unterhalb der Auftragetaschen gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wird das Sammelgel gegossen und der Auftragekamm eingesetzt. Das auspolymerisierte Gel wird in die Elektrophoreseapparatur eingespannt und die Pufferkammer mit 1x Laemmli-Laufpuffer gefüllt. Die mit 5x Laemmli-Probenpuffer versetzten Proben, sowie ein Größenstandard werden auf das Gel aufgetragen. Die

kleine Gele	8 %	10 %	12 %	15 %
30 % Acrylamid	1,35 / 2,7 ml	1,65 / 3,3 ml	2 / 4 ml	2,25 / 4,5 ml
Lower Tris	1,25 / 2,5 ml			
A. bidest	2,4 / 4,8 ml	2,1 / 4,2 ml	1,75 / 3,5 ml	1,5 / 3 ml
Temed	5 / 10 µl			
10 % APS	50 / 100 µl			

Tabelle 1: Zusammensetzung der kleinen SDS-PAGE-Trenngele. Angegeben sind die Volumina für je 1 bzw. 2 kleine Gele.

30 % Acrylamid	220 / 440 µl
Upper Tris	500 / 1000 µl
A. bidest	1,3 / 2,6 ml
Temed	3 / 6 µl
10 % APS	20 / 40 µl

Tabelle 2: Zusammensetzung der kleinen SDS-PAGE-Sammelgele. Angegeben sind die Volumina für je 1 bzw. 2 kleine Gele.

30 % Acrylamid	1,6 ml
Upper Tris	3 ml
A. bidest	7,4 ml
Temed	20 µl
10 % APS	100 µl

Tabelle 3: Zusammensetzung der großen SDS-PAGE-Sammelgele. Angegeben sind die Volumina für 2 große Gele.

große Gele	8 %	10 %	12 %
30 % Acrylamid	17,8 ml	22,2 ml	26,7 ml
Lower Tris	16,7 ml	16,7 ml	16,7 ml
A. bidest	32,1 ml	27,8 ml	23,3 ml
Temed	67 µl	67 µl	67 µl
10 % APS	670 µl	670 µl	670 µl

Tabelle 4: Zusammensetzung der großen SDS-PAGE-Trenngele. Angegeben sind die Volumina für 2 große Gele.

Elektrophorese erfolgt bei RT, zum Sammeln der Proben wird eine Stromstärke von 10 mA angelegt. Sobald die Probe das Trenngel erreicht hat, wird die Stromstärke auf 20-35 mA erhöht. Große PAA-Gele werden für eine verbesserte Bandenschärfe mit 2x Laemmli-Laufpuffer benutzt. Große PAA-Gele trennen mit 20 mA im Sammelgel und 30-65 mA im Trenngel das Proteingemisch auf. Unter anderem werden große Gele für die Auftrennung von Proteinen mit Größen von 50 und 55 kDa verwendet.

3.4.9.2 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen

Der Immunoblot ermöglicht mit Hilfe von Antikörpern den spezifischen Nachweis eines Proteins in einem durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteingemisch. Hierzu werden die Proteine aus dem Gel durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wird mit einer Antikörperlösung inkubiert und die gebundenen Antikörper werden mittels ECL-Reaktion sichtbar gemacht. Nach der Gelelektrophorese wird ein Stapel aus folgenden Komponenten gebildet: 3MM-Papier, Polyacrylamidgel, Nitrozellulosemembran, 3MM-Papier. Alle Komponenten werden zuvor für 10 min in 1x Blotpuffer inkubiert. Der Proteintransfer erfolgt bei RT, 300 mA für 1 h.

3.4.9.3 Ponceau-Färbung

Hiermit wird der Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulosemembranen nachgewiesen. Der Nachweis von Proteinen erfolgt reversibel, die Detektionsgrenze liegt bei 100 ng Protein pro Bande. Direkt nach dem Transfer wird die Membran mit Wasser gewaschen und für 5 min mit Ponceau-S Lösung inkubiert. Banden werden beim schrittweisen Entfärben mit A. bidest sichtbar. Die Färbung wird durch Scannen dokumentiert.

3.4.9.4 Immunoblotanalyse mittels Chemilumineszenz (ECL)

Mit Hilfe der Immunoblotanalyse kann ein spezifisches Protein auf einer Nitrozellulosemembran nachgewiesen werden. Nachdem die Proteine auf eine Membran transferiert wurden, wird diese in PBS gewaschen und zur Absättigung

unspezifischer Bindungsstellen in Blockpuffer für 30 min bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Es schließt sich die Inkubation (1 h RT oder ÜN 4°C) der Nitrozellulosemembran mit dem Primärantikörper, verdünnt in Blockpuffer, an. Durch Waschen mit TBSTT (3x 5 min) und TBST (1x 5 min, RT) werden unspezifisch gebundene Antikörper entfernt. Die Membran wird mit dem in Blockpuffer verdünnten Sekundärantikörper 1 h bei RT inkubiert. Anschließend werden unspezifisch gebundene Antikörper durch Waschen mit TBST (2x 5 min) und TBS (1x 5 min, RT) entfernt.

In dieser Arbeit erfolgt der Nachweis der Proteine durch das Chemilumineszenzverfahren (ECL = enhanced chemiluminescence) indirekt über sekundäre, mit dem Enzym „horseradish peroxidase“ (HRP) gekoppelte Antikörper, welche an die proteinspezifischen, primären Antikörper binden. HRP katalysiert die Oxidation von Luminol, wobei Energie in Form von Photonen freigegeben wird. Das emittierte Licht wird durch Exposition eines Röntgenfilms detektiert. Zur Signaldetektion werden die ECL-Lösungen A und B im Verhältnis eins zu zehn gemischt, 0,04 % H₂O₂ zugegeben und damit die Membran für 5 min bei RT inkubiert. Die Membran wird in eine Filmkassette eingelegt und ein Röntgenfilm (SuperRX, FujiFilm) aufgelegt. Nach verschiedenen Expositionszeiten (10 sek - 20 min) werden die Filme entwickelt. Bei sehr schwachen Signalintensitäten wird das sensitivere ECL-Substrat SuperSignal West Pico der Firma Pierce eingesetzt.

3.4.9.5 Entfernung gebundener Antikörper von Nitrozellulosemembranen

Um Nitrozellulosemembranen nach der Immunoblotanalyse wiederverwenden zu können, müssen die gebundenen Antikörper entfernt werden. Hierfür wird die Membran für 10 min in Strip-Puffer (0,2 M Glycin pH 2,2, 0,1 % SDS) inkubiert. Nach Waschen in TBS wird die Membran für 30 min mit Blockpuffer (5 % MMP in TBST) blockiert und kann dann wieder mit Antikörpern inkubiert werden.

3.4.9.6 Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie Blue

Polyacrylamidgele werden auf einem Horizontalschüttler in Coomassie Blue Färbelösung für mindestens 1h bei RT inkubiert. Anschließend werden die Gele in Coomassie-Entfärber inkubiert, bis die Proteinbanden deutlich erkennbar sind. Die

Nachweisgrenze liegt bei etwa 50 ng Protein pro Bande. Dadurch ist diese Färbemethode auch für Gele nach dem Proteintransfer auf eine Membran geeignet. Unter Vakuum kann das gefärbte Gel auf einem 3MM-Papier im Geltrockner (80 min, 80°C) getrocknet werden. Alternativ werden gefärbte Gele durch Scannen dokumentiert.

3.4.10 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation dient zur Fällung eines bestimmten Proteins unter nicht-denaturierenden Bedingungen aus einem Proteingemisch mit Hilfe von Antikörpern. Dadurch wird eine Anreicherung dieses Proteins erreicht, das anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch eine Immunoblotanalyse nachgewiesen werden kann.

Proteinextrakte werden durch Homogenisieren in kaltem RIPA-Puffer mit Protease Inhibitoren hergestellt. Vom Überstand nach Zentrifugation bei 4°C, 20.000 g wird die Proteinkonzentration mit Hilfe der Bradford-Methode (Bradford, 1976) bestimmt. Das Lysat wird mit 40 µl Sepharose versetzt und 1 h bei 4°C rotierend inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation werden die unspezifisch an Sepharose bindenden Proteine sedimentiert. Zum Überstand wird Protein A/G-Sepharose und spezifischer Antikörper gegeben. Die Inkubation erfolgt drehend bei 4°C für 2 h bis ÜN. Die gebildeten Komplexe aus Antigen, Antikörper und Protein A/G-Sepharose werden sedimentiert. Das Pellet wird dreimal mit 500 µl RIPA-Waschpuffer und einmal mit A. bidest gewaschen und in 20 µl 5x Laemmli-Probenpuffer resuspendiert. Die Proben werden für 3 Minuten auf 98°C erhitzt und mittels SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran werden die Proteine mit Antikörpern nachgewiesen (3.4.9.4.).

3.5 Histologie und indirekte Immunfluoreszenzanalysen

3.5.1 Herstellung von Gefrierschnitten

Gewebe werden direkt nach Präparation in Isopentan schockgefroren. Die gefrorenen Präparate werden mit Einbettmedium (O.C.T.) auf dem Objektisch des Gefriermikrotoms fixiert. Gewebeschnitte (12 µm) werden bei -20 bis -25°C Kammertemperatur, einem Schnittwinkel von 10° und einer Objekttemperatur, je

nach Gewebe, von -20 bis -35°C hergestellt und auf SuperFrost-Objektträger aufgenommen. Die Gewebeschnitte werden für 30 min bei RT luftgetrocknet. Sie sind anschließend bei -80°C lagerbar. Für Immunfluoreszenzen sind frische Schnitte besser geeignet.

3.5.2 Immunfluoreszenzanalysen an Gefrierschnitten

Die Gewebeschnitte werden für 10 min mit eiskaltem Aceton fixiert und 30 min bei RT getrocknet. Die Schnitte werden in PBS gewaschen und für 1 h bei RT mit Blockierungslösung inkubiert. Im Folgenden werden die Präparate in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Danach wird für 1 h bei RT oder ÜN bei 4°C mit den in Blockierungslösung verdünnten Primärantikörpern inkubiert. Es folgen drei Waschschritte mit PBS (5 min, RT). Danach werden die Gewebeschnitte für 1 h bei RT mit Sekundärantikörpern, verdünnt in Blockierungslösung, inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (je 5 min, RT) mit PBS folgt je ein Waschschritt (5 min, RT) mit A. bidest und absolutem Ethanol. Die Gewebeschnitte werden 1 h bei RT getrocknet und mit Mowiol+ oder ProLongGold (Invitrogen) und einem Deckglas verschlossen. Die Färbungen werden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axiophot 2E oder LSM510, Zeiss) mit Zeiss Plan-Neofluar/Apochromat 63x/1.4 und 40x/1.30 Öl-Immersion, 25x/0.80 Multi-Immersion und 10x/0.30 Objektiven analysiert und mit einer Digitalkamera (AxiocamHR, Zeiss) aufgenommen.

3.5.3 Herstellung von Paraffin-Gewebeschnitten

Zur histologischen Analyse werden häufig Paraffinschnitte angefertigt, da in ihnen die Gewebestruktur besonders gut erhalten bleibt und viele klassische Färbetechniken für diese Technik etabliert sind. Zur Paraffineinbettung werden die Gewebe einer Maus präpariert und in 4 % PFA bei RT gelagert. Vor Beginn des automatisierten Einbettungsprozesses (Paraffin Gewebeinfiltrationsautomat Tissue-Tek VIP, Sakura) werden die Organe in einen Metallkorb gelegt, der während der Einbettungsprozedur in verschiedene Flüssigkeitsbehälter getaucht wird. Jeder Einzelschritt dauert etwa 1 bis 2 h. Nach Dehydrierung der Gewebe in 60 %, 70 % und 80 % Ethanol werden die Präparate jeweils zweimal in 96 % und 100 % Ethanol, Xylol und Paraffin getaucht. Nach Beendigung der Einbettung werden die Präparate in Metallbechern in einer Paraffinausgießstation (Paraffineinbettstation TEC, Sakura) in der gewünschten

Schnitttrichtung positioniert und mit flüssigem Paraffin eingeschlossen, so daß nach Aushärtung ein Paraffinblock vorliegt.

Zum Schneiden wird ein Mikrotom (RM2155, Leica) verwendet, mit dem 4-10 µm dünne Schnitte des Paraffinblocks hergestellt werden, die über einen Flüssigkeitsfilm in ein 42°C-Wasserbad gleiten, sich strecken und mit einem Pinsel auf Glasobjektträger gezogen werden können. Die Schnitte werden eine Stunde bei RT getrocknet und können dann aufbewahrt werden. Da die Schnittpräparate noch in Paraffin eingeschlossen sind, müssen sie für alle Folgeuntersuchungen entparaffiniert werden. Dafür werden die Präparate für 30 Minuten bei 60°C inkubiert. Anschließend werden Paraffinreste durch 2x 5 min Inkubation in Xylol entfernt und die Präparate durch eine absteigende Alkoholreihe (je 2x 2 min 100 %, 95 %, 70 %, A. bidest) rehydratisiert.

3.5.4 Immunfluoreszenzanalysen an Paraffinschnitten

Damit die Schnitte für Antikörperreaktionen zugänglich sind, müssen sie zuerst wie unter 3.6.3 beschrieben entparaffiniert werden. Um unspezifische Reaktionen zu reduzieren, werden die Gewebeschnitte zunächst für 30 min mit 5 % Ziegennormalserum (NGS) in TBS inkubiert. Die Präparate werden dabei in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Der Erstantikörper in TBS mit 5 % NGS wird für 1 h bei RT oder bei 4°C ÜN zugegeben. Die Schnitte werden 3x 5 min mit TBS gewaschen. Danach werden die Gewebeschnitte 45 min bei RT mit fluorophorgekoppelten Sekundärantikörpern und DAPI inkubiert. DAPI interkaliert zwischen die Basen der DNS und ermöglicht eine blaue Kernfluoreszenz. Die Schnitte werden 3x 5 min mit TBS sowie je einmal kurz mit A. bidest und absolutem Ethanol gewaschen. Die Präparate werden 2 h bei RT getrocknet und mit Mowiol+ eingebettet. Die Epitop-Zugänglichkeit, und damit die Detektierbarkeit, kann für einzelne Antikörper durch Mikrowellenbehandlung (Vacuum Histoprocessor RHS-1, Milestone) in spezifischen Puffern verbessert werden.

3.5.5 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Diese Färbemethode dient zum Nachweis der Zellkerne (Hämatoxylin) und des Zytoplasmas (Eosin). Paraffinschnitte werden 30 Minuten bei 60°C inkubiert, um einen Großteil des Paraffins zu entfernen. Anschließend werden die Schnitte 2x 5

min in Xylol weiter entparaffiniert. Danach müssen die Gewebeschnitte über eine absteigende Alkoholreihe (je 2x 2 min 100 %, 95 %, 70 % EtOH, A. bidest) rehydratisiert werden. Zum Färben werden die Schnitte 20 sek in Hämatoxylin-Lösung inkubiert, mit A. bidest abgespült und anschließend unter etwa 50°C warmem Leitungswasser differenziert. In einem 30 sek Inkubationsschritt werden die Objektträger in 0,1%iger Eosin-Lösung gefärbt und überschüssige Lösung mit Leitungswasser abgewaschen. Die Färbung wird für 30 sek in 80 % Ethanol differenziert. Die Präparate werden anschließend erneut in aufsteigendem Alkohol dehydriert (je 2x 2 Minuten 70 %, 95 %, 100 % EtOH) und in Xylol (2x 5 min) inkubiert. Die noch feuchten Präparate werden mit DPX Medium eingedeckelt. Gefärbte Strukturen werden mittels Lichtmikroskopie abgebildet. Hochauflösende Abbildungen werden mit Hilfe eines Nikon 90i Mikroskops und einer Nikon DSRI Kamera aufgenommen.

3.6 Elektronenmikroskopie

Gewebeschnitte werden für die Elektronenmikroskopie vorbereitet, wie unter (Reichert et al., 2001) und (Meier-Bornheim, 2006) beschrieben. Elektronenmikroskopische Abbildungen werden in Kooperation mit Prof. Dr. H. Büsow, Anatomie, Universität Bonn aufgenommen und im Tif-Format gespeichert. Abbildungen werden mit Hilfe von Corel Draw 12 zusammengestellt.

3.7 Analyse von Kataraktpatienten

In Kooperation mit Prof. Dr. S. Bhattacharya, University College of London, wird von 90 Katarakt-Patienten das Vimentin-Gen auf Mutationen anhand der publizierten humanen Vimentin Sequenz (RefSeq ID: NM_003380) untersucht. Vimentin Exons, einschließlich der Donor- und Akzeptor-Splicesseiten, werden mit den unter 2.10.3 aufgeführten Primern amplifiziert. Die PCR-Produkte werden mit Hilfe des BigDye terminator cycle sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems) und einem ABI 3100 Genetic Analyser analysiert. Chromatogramme werden mit dem Programm Sequencer 4.5 (Gene Codes Corporation) ausgewertet. Die identifizierte Mutation wird durch Sequenzierung beider DNS-Stränge bestätigt.

3.8 Computergestützte Analysen

Die Vorhersage von Protein-Domänen und das Alignment von Proteinen werden mit Hilfe der folgenden Webseiten durchgeführt.

Datenbank	Ort	Webseite
BioGrid	Ontario Cancer Center, Kanada	http://www.thebiogrid.org
ELM	EMBL, Heidelberg	http://elm.eu.org
Expasy Proteomics Server	Swiss Institute of Bioinformatics, Schweiz	http://www.expasy.ch
Human Intermediate Filament Database	IMB, Signapur	http://www.interfil.org
Human Protein Atlas	Uppsala University, Schweden	http://www.proteinatlas.org
Human Protein Reference Database	John Hopkins University, USA	http://www.hprd.org
ScanSite	MIT, USA	http://scansite.mit.edu
SMART	EMBL, Heidelberg	http://smart.embl-heidelberg.de

Promotoren und Gene werden mit diesen Web-Ressourcen analysiert.

Datenbank	Ort	Webseite
Genescan	MIT, USA	http://genes.mit.edu/GENSCAN.html
Promoter 2.0	CBS, Technical University of Denmark	http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter
PromoterScan	NIH, USA	http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan
DBTSS	University of Tokyo	http://dbtss.hgc.jp/

Die potentiellen Phosphorylierungsstellen von Proteinen werden mit den folgenden Webseiten analysiert.

Datenbank	Ort	Webseite
KinasePhos	Chiao Tung University, Taiwan	http://kinasephos.mbc.nctu.edu.tw
NetPhos 2.0	CBS, Technical University of Denmark	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos
Phospho.ELM	EMBL, Heidelberg	http://phospho.elm.eu.org
Predikin Prediction Server	University of Queensland, Australien	http://predikin.biosci.uq.edu.au/pkr

Die Analyse oder Manipulation von Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen wird mit den Programmen Chromas 1.62 (Technelysium), pDRAW32 (AcaClone software) und NEBcutter 2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) durchgeführt.

Zur Analyse von genomischen Sequenzen der Maus und des Menschen werden die Datenbanken Ensembl Genome Browser (Welcome Trust Sanger Institute, UK,

<http://www.ensembl.org/index.html>), Entrez Gene (NIH, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>) und Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (University of Tokyo, Japan, <http://www.genome.jp/kegg>) eingesetzt.

Primer werden mit dem Programm OligoCalc (Northwestern University, USA, <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) konzipiert.

3D-Darstellungen von Proteinen werden mit PyMOL 1.1 (DeLano Scientific) erzeugt. Bildbearbeitung wird mit den mikroskopspezifischen Programmen Axiovision LE 4.6 (Zeiss), Zeiss LSM Image Browser 4,2 (Zeiss), Fluoview1000 (Olympus) sowie den Graphikprogrammen Photoshop 6.0 (Adobe), Corel Draw 12 und IrfanView V3.98 vorgenommen.

Zur densitometrischen Messung von Chemilumineszenzsignalen im Western Blot wird das Programm AIDA 2.11 (raytest) benutzt. Dazu werden die exponierten Filme (SuperRX, FujiFilm) mit einem Scanner als Bild im Tif-Format eingelesen und anschließend ausgewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Vimentinmutation im Mausmodell

4.1.1 Herstellung der Mauslinien und Analyse der transgenen Proteinexpression

Über die *in vivo* Funktion von Vimentin, sowie die Funktion in spezifischen Geweben und Zelltypen, ist bisher wenig bekannt. Dies liegt zum Teil auch am Phänotyp der Vimentin 'knock-out'-Maus, die nur unter Stressbedingungen eine Reihe von Effekten zeigt (Colucci-Guyon et al., 1994). In einem neuen Ansatz, basierend auf der hohen Sequenzidentität der IF-Proteine, sollte durch Expression von mutantern Vimentin in transgenen Mäusen die *in vivo* Funktion analysiert werden.

Dazu wurden zwei transgene Mauslinien, eine Vimentin Punktmutation (VimR113C) und eine C-terminal verkürzte (Vim Δ C2B) Vimentinvariante generiert. Zusätzlich diente eine wt Vimentin-exprimierende Mauslinie als Kontrolle. Alle Konstrukte basieren auf genomischer DNS der Maus und enthalten ein N-terminales c-Myc Epitop, um transgenes und endogenes Vimentin unterscheiden zu können. Zusätzlich zum Vimentingen enthalten alle Konstrukte 10,5 kB 5'-UTR und 1,5 kB 3'-UTR (Abb. 4.1 A). Dadurch wird die Vimentinexpression von seinen eigenen regulatorischen Elementen gesteuert und die natürliche Gewebsspezifität und physiologische Expressionslevel sichergestellt.

Die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse sind zusammen mit R. Meier-Bornheim bearbeitet wurden. Die Abbildungen 4.1, 4.5-4.12 sind in ähnlicher oder abgewandelter Form auch in der Dissertation von R. Meier-Bornheim enthalten.

Nach 3 Jahren kontinuierlicher Haltung wurde die Expression des Transgenes durch Immunoblot von Gewebslysaten und Immunfluoreszenz von Ohrschnitten analysiert, um 'DNS-silencing'-Effekte und dadurch verringerte Proteinmengen auszuschließen. Mittels Immunoblot konnte transgenes Vimentin nur im Auge und zu geringen Anteilen in der Milz der transgenen Tiere nachgewiesen werden (Abb. 4.3). Da in den meisten Geweben die Vimentin-exprimierenden Zellen nur einen geringen Anteil haben, liegt ohne Zellanreicherung die detektierbare Menge an Vimentin unter der Nachweisgrenze des Immunoblots. Dies deckt sich mit Untersuchungen der F1-Generation dieser Mäuse von R. Meier-Bornheim (Meier-Bornheim, 2006). Die mittels Immunfluoreszenz untersuchte Verteilung von Vimentin in Ohrschnitten zeigte ebenfalls ein der F1-Generation identisches Bild (Abb. 4.2). Aus diesem Grund

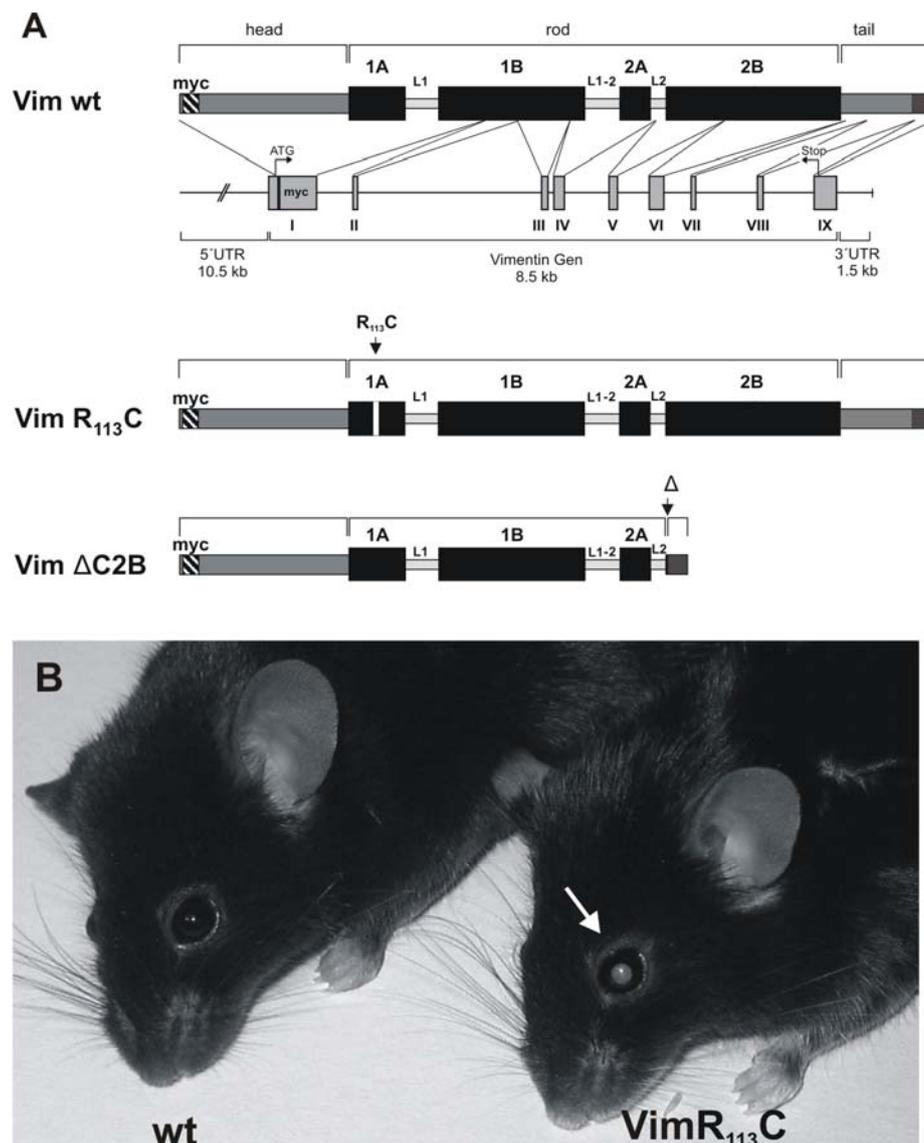


Abb. 4.1: Vimentin Expressionskonstrukte und Augen Phänotyp.

(A) Schematische Darstellung der Expressionskonstrukte für wt, R113C Punktmutante (VimR113C) und C-terminal verkürzte (Vim Δ C2B) Vimentin Transgene. Alle Konstrukte basieren auf dem murinen Vimentingen mit seinen eigenen regulatorischen Elementen. Zusätzlich enthalten alle Konstrukte ein N-terminales c-Myc Epitop, um transgenes von endogenem Vimentin unterscheiden zu können. (B) Getrübte Linse in einem 22-Wochen alten, VimR113C Tier (Pfeil).

wurde auf eine weitere Immunfluoreszenzanalyse der Vimentinexpression in einzelnen Organen und Geweben, wie sie für die F1-Generation durchgeführt wurde (Meier-Bornheim, 2006), verzichtet. Die densitometrische Auswertung des Immunoblot ergab, daß die exprimierte Menge an transgenem Vimentin im Auge von VimR113C Tieren etwa 48 % und in den Augen von Vim ko^{+/-} Vim Δ C2B^{+/-} Tieren 70-170 % des endogenen Vimentins entsprach. Dabei macht Vimentin etwa 5 % des Gesamtproteins in Augenlysaten aus (Tabelle 5). Um statistische Signifikanz zu erreichen, sollten diese Ergebnisse mit mindestens 5 Tieren je Genotyp wiederholt werden.

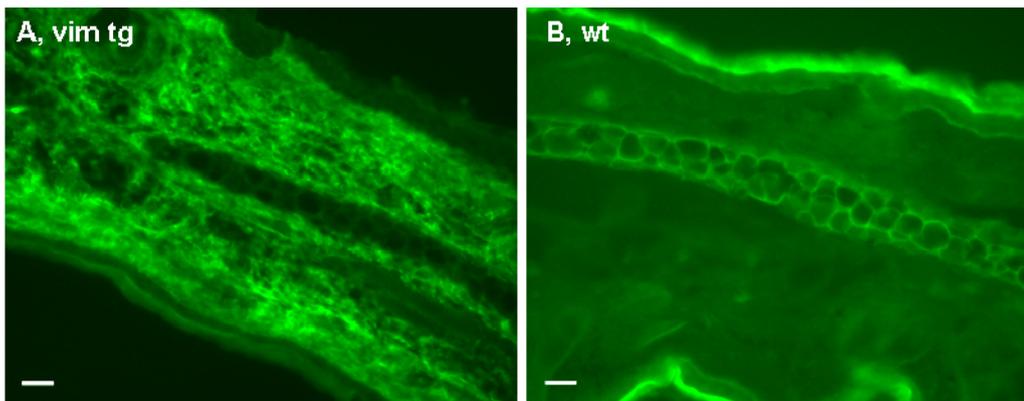


Abb. 4.2: Nachweis von transgenem Vimentin auf Maus Ohrschnitten. (A,B) Test der Expression des Vimentin Transgenes mittels anti-Myc Immunfluoreszenzreaktion an Ohr Kryoschnitten. (A) VimR113C Maus. (B) C57Bl/6 Maus. Maßstabsbalken: 20 μ m.

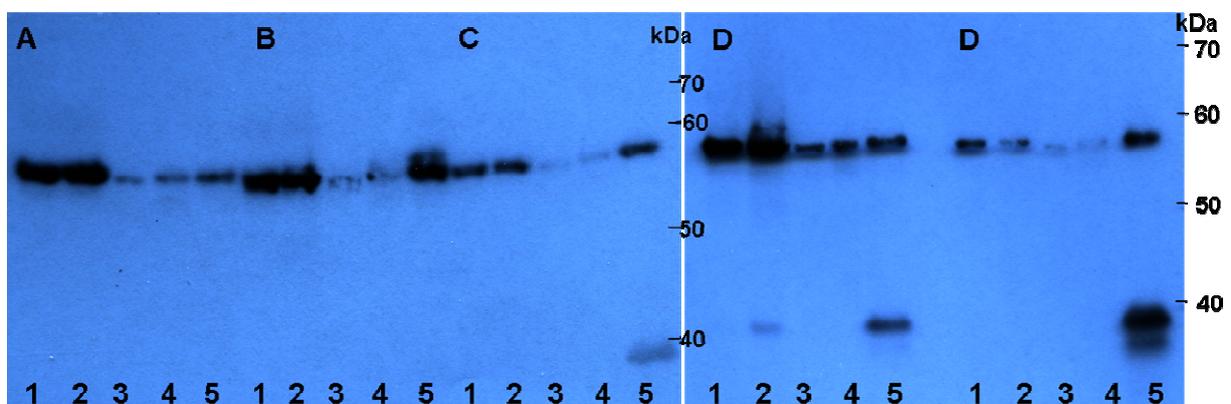


Abb. 4.3: Vimentinexpression in Organen transgener Mäuse. Die Vimentinexpression in verschiedenen Organen transgener Mäuse wurde mittels Immunoblot analysiert. Die Menge an transgenem Vimentin sowie die Verhältnisse endogenes/ transgenes Vimentin und Vimentin/ Gesamtprotein wurden mit Hilfe rekombinanten Vimentins bekannter Konzentration densitometrisch bestimmt. (A) C57Bl/6 Maus. (B) VimR113C^{+/-} Maus. (C) Vim Δ C2B^{+/-} Maus. (D) Vim ko^{+/-} Vim Δ C2B^{+/-} Maus. (1) Lunge. (2) Milz. (3) Niere. (4) Herz. (5) Auge.

Genotyp	C57Bl/6	VimR113C ^{+/-}	Vim Δ C2B ^{+/-}	Vim ko ^{+/-} Vim Δ C2B ^{+/-}	Vim ko ^{+/-} Vim Δ C2B ^{+/-}
Tier		#6266	#6211	#6108	#6209
% endogenes Vimentin / Gesamtprotein	4,9	9,3	4,3	4,7	5
% transgenes / endogenem Vimentin	-	48	61	70	171

Tabelle 5: Quantitative Auswertung des Immunoblot in Abb. 4.3. Dargestellt ist die Vimentinexpression im Auge prozentual zum Gesamtprotein bzw. endogenen Vimentin.

4.1.2 Altersabhängige Proteinaggregation und Kataraktbildung

Die morphologische Untersuchung der transgenen Tiere offenbarte eine Linsentrübung und Kataraktbildung in erwachsenen VimR113C Mäusen (Abb. 4.1. B),

die in wt Tieren nicht auftrat. Nachfolgende histologische Untersuchungen an Linsen-Paraffinschnitten ergaben eine deutlich erhöhte Fragilität der VimR113C Linsen im Vergleich zu wt Linsen (Abb. 4.4). Außerdem sind VimR113C Linsen unter mechanischer Belastung bei der Verarbeitung empfindlicher und weisen eine zerrissene Morphologie der Faserzellen auf.

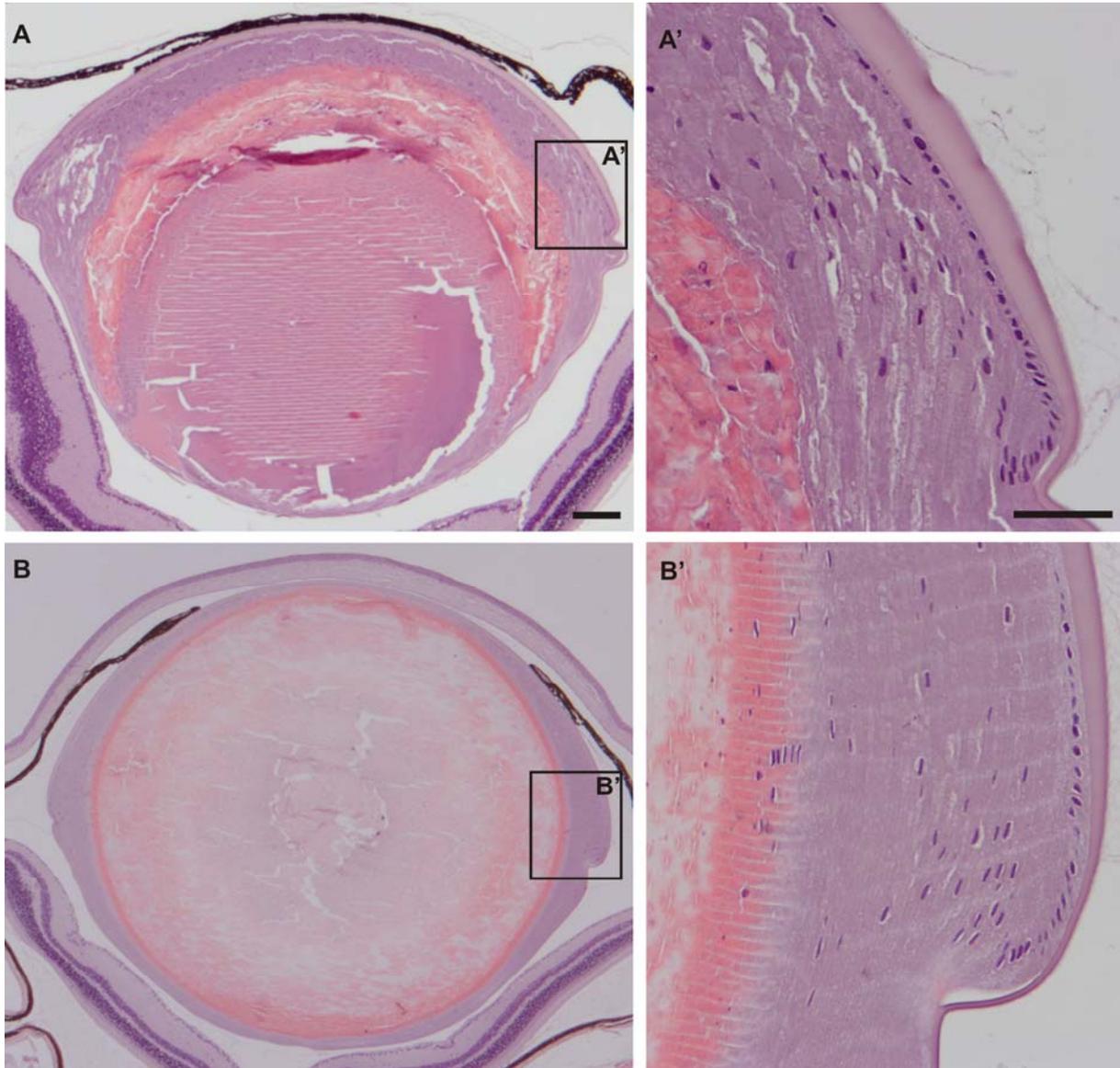


Abb. 4.4: Histologie der Augen von Vimentin wt und VimR113C transgenen Mäusen. (A,B) Hämatoxylin und Eosin (H&E) Färbung von Paraffinschnitten 45 Wochen alter Linsen. (A) VimR113C transgene und (B) wt Maus. (A',B') Höhere Vergrößerung der Bereiche in (A) und (B). VimR113C Linsen sind deutlich fragiler als wt Linsen. Sie zeigen eine weniger gleichmäßige Anordnung der Linsenfasern. Maßstabsbalken: A,B) 70 µm, A',B') 60 µm.

Mit Hilfe von Immunfluoreszenzmikroskopie wurde die Expression von transgenem Vimentin analysiert. Es konnte gezeigt werden, daß transgenes Vimentin in allen erwarteten Geweben exprimiert wird und dabei größtenteils zytoplasmatische Aggregate bildet (Meier-Bornheim, 2006). Trotz der Aggregation des Vimentin

Zytoskeletts durchliefen alle transgenen Tiere eine normale Embryonalentwicklung, zeigten keine Abnormalitäten und waren fruchtbar.

Um den Beginn der Kataraktbildung zu identifizieren, wurden Tiere in verschiedenen Entwicklungsstadien mit Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Es stellte sich heraus, daß die Vimentin Proteinaggregation ein altersabhängiger Prozeß ist. In den Linsen neugeborener Mäuse kolokalisiert VimR113C zu großen Teilen mit endogenem Vimentin und bildet ein normales Zytoskelett (Abb. 4.5 C), wie in Kontrollmäusen (Abb. 4.5 B). Die Aggregatbildung in transgenen Tieren begann in einem Alter von 6 Wochen und wurde besonders deutlich sichtbar ab 12 Wochen (Abb. 4.5 E). Wt Tiere weisen im Gegensatz dazu ein submembranöses Vimentin Zytoskelett auf (Abb. 4.5 D). In der Überlagerung der Immunfluoreszenzen ist deutlich zu erkennen, daß die Aggregate sowohl aus transgenem als auch endogenem Protein bestehen. Das heißt, das mutierte Vimentin wirkt dominant und kann endogene Vimentinfilamente kollabieren bzw. deren Assemblierung behindern. Gleichzeitig ist, bei noch intaktem Zytoskelett, eine partielle Kolokalisation von mutiertem und endogenem Protein in den Filamenten zu erkennen (Abb. 4.5 C). Dies demonstriert, daß endogenes und mutiertes Vimentin *in vivo* Filamente bilden können, und daß mutiertes Vimentin nicht ausschließlich aggregiert, sondern wahrscheinlich in Abhängigkeit vom Mengenverhältnis zum endogenen Vimentin, in Filamente eingebaut wird.

Um auszuschließen, daß die Aggregation und Kataraktbildung durch Proteinüberexpression verursacht wird, wurde die Vimentin Expression in der löslichen und unlöslichen Fraktion von Linsenextrakten untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß transgenes Vimentin in der Linse etwa 50 % des endogenen Vimentins ausmacht. Dieses Verhältnis von transgenem und endogenem Vimentin ist unabhängig vom Alter der Tiere.

4.1.3 Veränderte Membranorganisation und zellkontextabhängige Proteinaggregation

Um die Ursache der Kataraktbildung genauer zu verstehen, wurden 11 Wochen alte Linsen von transgenen und wt Tieren mit Elektronenmikroskopie (EM) untersucht. Dabei fällt auf, daß im Linsenepithel keine Vimentinaggregate vorhanden sind und nur differenzierende Faserzellen Vimentinaggregate akkumulieren. In Vim Δ C2B Mäusen war die Aggregatbildung im Vergleich zu VimR113C Mäusen noch verstärkt.

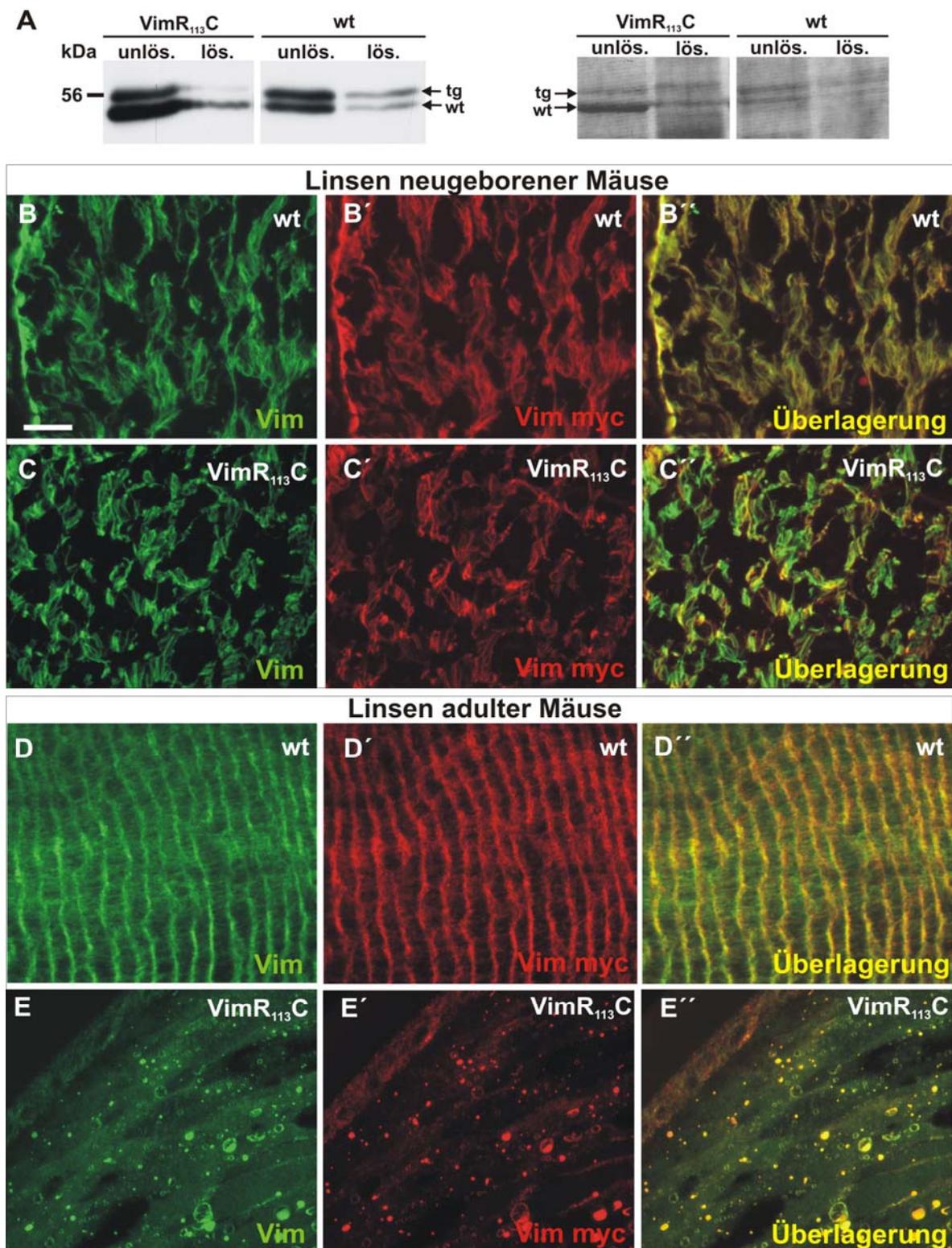


Abb. 4.5: Altersabhängige Aggregat- und Kataraktbildung in Mauslinsen.

(A) Immunoblotanalyse von endogenem und transgenem Vimentin in Linsenextrakten 4-Monate alter wt und VimR113C Mäuse. Endogenes und transgenes Vimentin wurde mit einem Vimentin Antikörper detektiert. Durch das Myc-Epitop im punktmutierten Vimentin ist die Migration langsamer als die von endogenem Vimentin. (B-E) Immunfluoreszenzanalyse von Linsen. Kryoschnitte von neugeborenen und 5-Monate alten Tieren wurden gegen Gesamt- (grün) und Myc-Vimentin (rot) gefärbt. (B,D) Vimentinexpression und -lokalisierung in wt Linsen. (C,E) Vimentinexpression in VimR113C Mäusen. In neugeborenen Mäusen ist die Verteilung von VimR113C Protein ähnlich der von wt Vimentin, aber weniger homogen. (E) Aggregatbildung in Faserzellen adulter Tiere. Bemerkenswert ist die große Anzahl und die Größe der Vimentinaggregate in Linsen adulter, im Vergleich zu denen neugeborener Tiere (C',C'',E',E''). Maßstabsbalken: 20 µm.

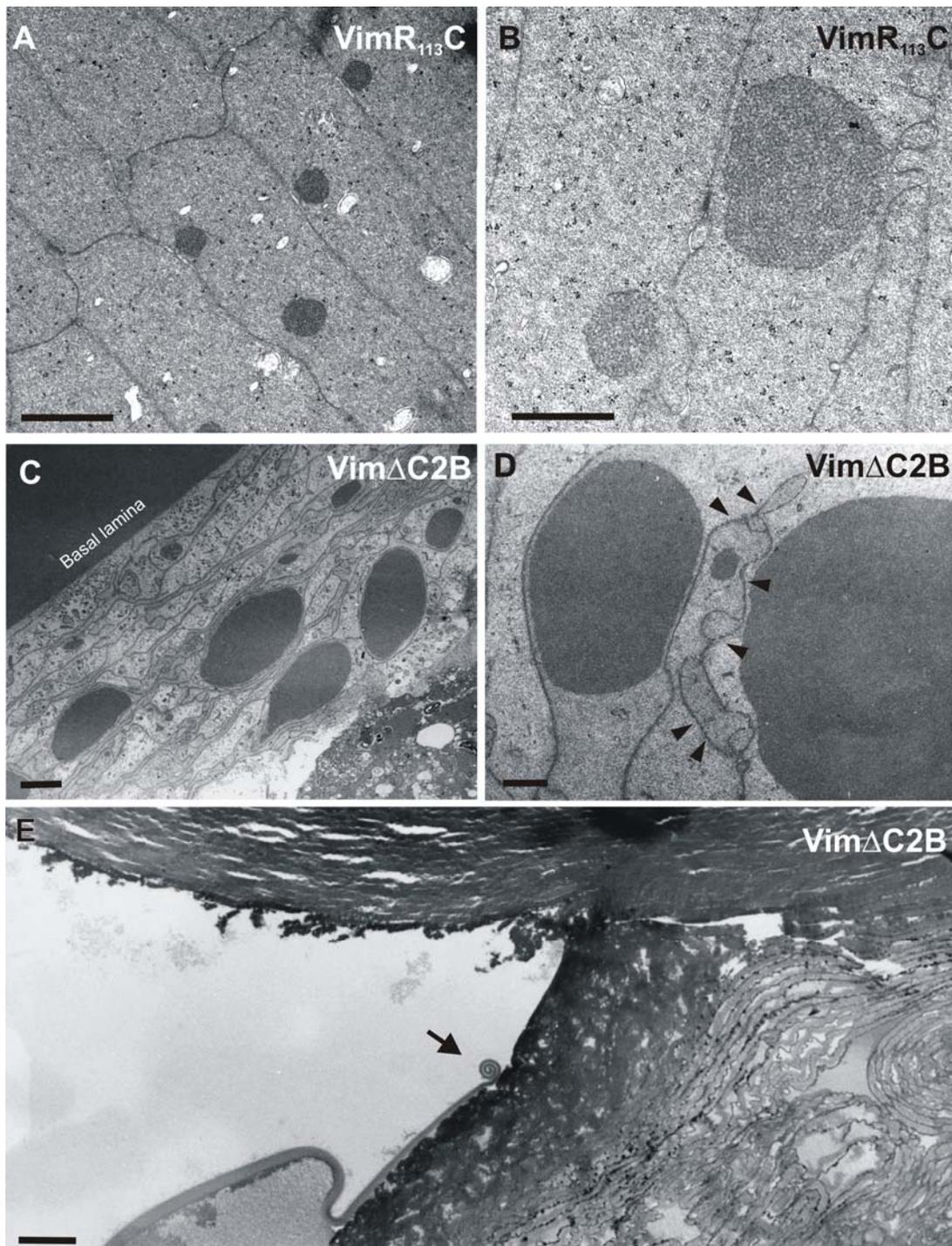


Abb. 4.6: Ultrastruktur von Linsenfaserzellen in transgenen Mäusen. (A,B) EM von Vimentinaggregaten in Linsenfaserzellen von 11-Wochen alten VimR113C Mäusen. Vimentinaggregate sind amorph, mit scharfen Grenzen, und sind nicht von Membranen umgeben. Zu diesem Zeitpunkt ist die Plasmamembran noch nicht stark beeinflusst. (C,D) Auffällig ist die stark gefaltete Organisation der Plasmamembran in Vim Δ C2B Mäusen. (D) Vimentinaggregate und Membranreorganisation in Vim Δ C2B Mäusen bei höherer Auflösung. Die Aggregate sind dicht, unterschiedlich in der Größe und sind nicht an eine Membran gebunden oder von einer Membran umgeben. Pfeilspitzen markieren irreguläre Membraneinstülpungen. (E) Semi-dünne Linsenschnitte von 22-Wochen alten Vim Δ C2B transgenen Mäusen. Ein Pfeil kennzeichnet die zerrissene Basallamina der Linsenkapsel. Linsenfaser durchbrechen die Basallamina und stehen in den Glaskörper vor. Maßstabsbalken: A) 2 μ m, B,D) 1 μ m, C) 3 μ m, E) 20 μ m.

Zusätzlich ist die Plasmamembran der Faserzellen desorganisiert und mit vielen Einstülpungen versehen (Abb. 4.6 D). Dieser Effekt wurde nicht durch eine Zerstörung der Membrananbindung von Aktin oder 'beaded-filament' Proteinen verursacht (Abb. 4.10) (Straub et al., 2003). Außerdem konnte durch EM gezeigt werden, daß die Aggregate sehr dicht und nicht von einer Membran umschlossen sind, was ihre Aufnahme in Lysosomen ausschließt. Ultimativ führt die Vimentinaggregation im Alter von etwa 6 Monaten zum Riß der Linsenkapsel, gefolgt von Linsenfaserzellen, die in den Glaskörper vorstehen (Abb. 4.6 E). Dieser Phänotyp erinnert stark an den im Menschen beschriebenen 'Schneeball-Katarakt' (Eshagian et al., 1981).

4.1.4 Verstärkter Abbau der Vimentinaggregate sowie erhöhte Chaperon Expression und Proteasomaktivität

Mutationen in IF Genen führen häufig zu Proteinaggregation, welche die Ursache der Pathologie in den entsprechenden Geweben ist. So führen z.B. Mutationen in GFAP zur Alexanderschen Krankheit, in Keratin 5 und 14 zu EBS (Epidermolysis Bullosa Simplex) und in Desmin zu Myopathien (Bär et al., 2007; Kim and Coulombe, 2007; Magin et al., 2004; Omary et al., 2004). Auch in vielen neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. Alzheimer, Parkinson, Huntington, Creutzfeldt-Jakob und ALS (Amyotrophe Lateralsklerose) spielen fehlgefaltete Proteine eine entscheidende Rolle (Aigelsreiter et al., 2007; Gregersen et al., 2006; Irvine et al., 2008). Deshalb spricht man auch kollektiv von Protein-Aggregationskrankheiten. Der Pathomechanismus ist in den meisten Fällen noch nicht geklärt.

Für Proteinaggregate, die mutiertes Keratin enthalten, konnte in Zellkultur gezeigt werden, daß diese Aggregate hochdynamische Strukturen mit einer Halbwertszeit von weniger als 15 min sind (Werner et al., 2004). Diese Beobachtung legt eine transiente Natur der Proteinaggregate nahe und veranlaßte die Untersuchung der Größe und Verteilung der Vimentinaggregate in der Linse.

Im Gegensatz zur Erwartung, daß die Aggregate zum Zentrum der Linse hin, wo sich die ältesten und metabolisch gering aktiven Faserzellen befinden, größer werden, konnte durch Konfokalmikroskopie gezeigt werden, daß die Aggregate kleiner werden und letztendlich ganz verschwinden (Abb. 4.7 A,B). In der Vergrößerung (Abb. 4.7 1-3) ist die Verringerung, sowohl in der Größe als auch der Anzahl der Aggregate, gut zu erkennen. Im Linsenepithel sind keine Vimentinaggregate

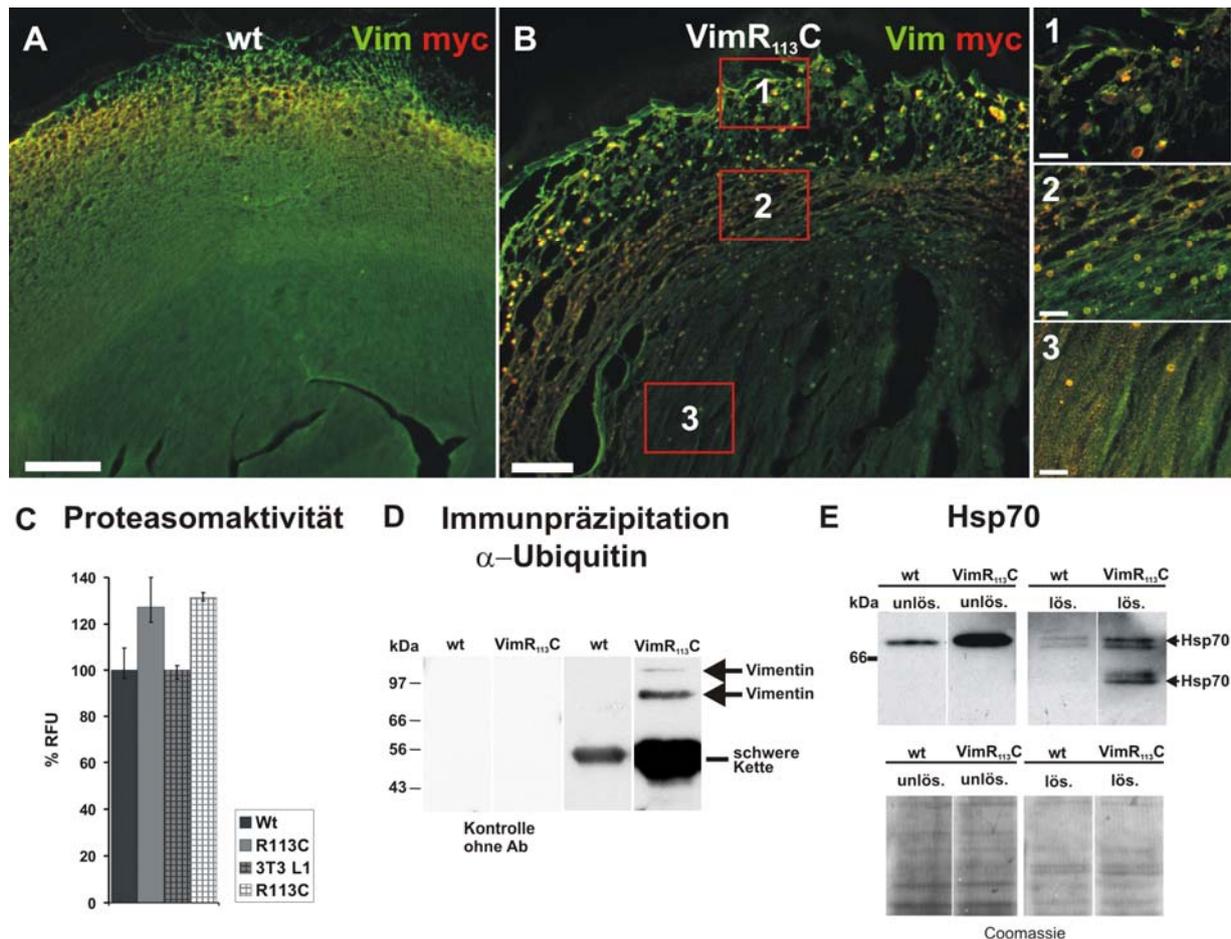


Abb. 4.7: Erhöhte Proteasomenaktivität und Reversibilität von Vimentinaggregaten *in vivo*.

(A,B) Immunfluoreszenzanalyse von 4-Monate alten Linsen VimR113C transgener and wt Mäuse. Gewebeschnitte wurden mit Antikörpern gegen Gesamt- (grün) und transgenes Vimentin (rot) gefärbt. Bilder 1-3 zeigen eine höhere Vergrößerung von Bereichen der Linse, welche die verschiedenen Stadien der Differenzierung von Linsenfasern abbilden. Zum Zentrum der Linse hin, das die ältesten Faserzellen enthält, lösen sich die Vimentinaggregate auf. Dies impliziert, daß Aggregate *in vivo* transiente Strukturen sind. (C) Fluoreszenz-basierte Analyse der Proteasomenaktivität in Linsenextrakten und von stabil transfizierten Zellen. In beiden Fällen wurde ein Anstieg der Proteasomenaktivität von 30 % in der Punktmutante, verglichen zum wt, gemessen. (D) SDS-PAGE und Immunoblot gegen Ubiquitin in VimR113C und wt Linsenextrakten nach Immunpräzipitation mit einem Vimentin Antikörper. Eine deutlich verstärkte Ubiquitylierung von Vimentin wurde in transgenen Linsen nachgewiesen (Pfeile). Die Position der Ig schweren Kette ist eingezeichnet. (E) Immunoblot gegen Hsp70 in der löslichen und unlöslichen Fraktion von Linsenextrakten von wt und VimR113C transgenen Mäusen. In beiden Fraktionen von VimR113C Linsen ist die Hsp70 Expression erhöht. Maßstabsbalken: (A,B) 100 μ m, (1-3) 15 μ m.

vorhanden. Diese Ergebnisse konnten durch EM bestätigt werden (Meier-Bornheim, 2006). Die Vimentinaggregate scheinen in primären und sekundären Faserzellen in einem aktiven Prozeß abgebaut zu werden und sind somit transiente Strukturen. Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, daß die Expression von VimR113C, abhängig vom zellulären Kontext, eine Streßantwort der Zelle verursacht. Proteinaggregate können durch verschiedene Mechanismen wie z.B. Lysosomen, Ubiquitin/Proteasom System, Caspasen sowie molekulare Chaperone abgebaut werden. Da durch EM gezeigt werden konnte, daß die Vimentinaggregate nicht von

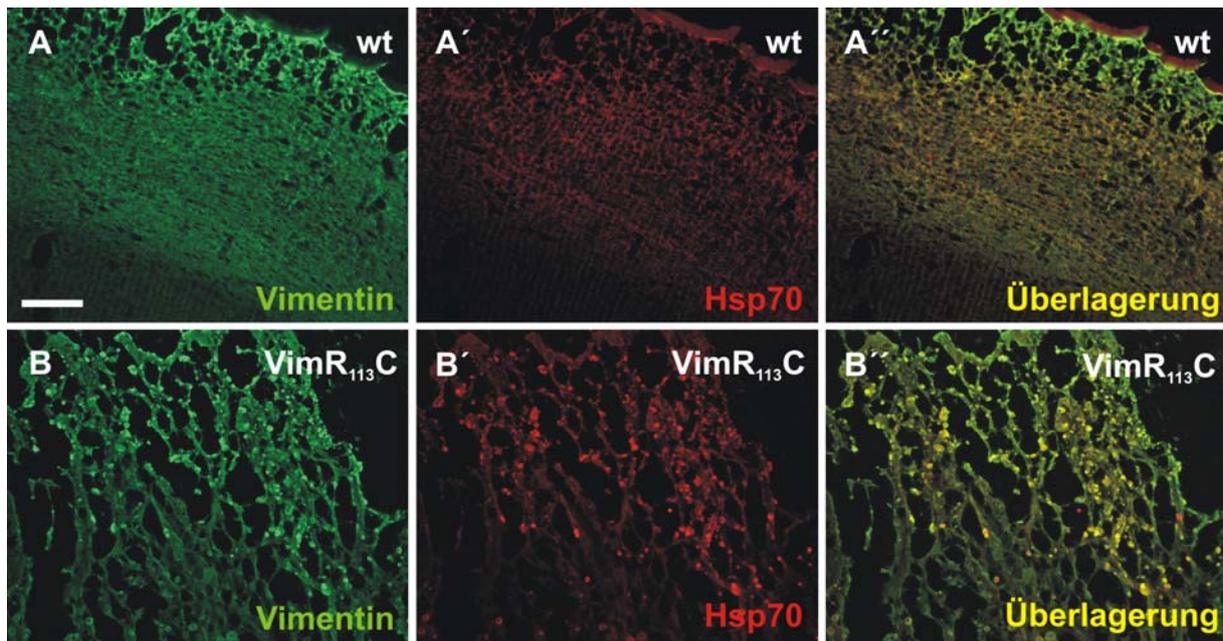


Abb. 4.8: Rekrutierung von Chaperonen in Mauslinsen als Folge der Expression von Vimentin Punktmutanten.

(A,B) Immunfluoreszenz von Linsen, gefärbt mit Antikörpern gegen Hsp70 (rot) und Gesamt-Vimentin (grün). In Linsen von wt Tieren ist Hsp70 kaum nachweisbar, während es in Linsen von VimR113C Tieren stark erhöht ist und mit Vimentin kolokalisiert. Maßstabsbalken: 20 μ m.

einer Membran umschlossen sind, findet der Abbau in den Faserzellen nicht über Lysosomen statt (Abb. 4.6). Fehlgefaltete Proteine induzieren die Expression von molekularen Chaperonen der Hsp70-Familie und es ist bekannt, daß das Chaperon α B-Kristallin die Organisation der Vimentinfilamente beeinflusst (Nicholl and Quinlan, 1994; Perng et al., 1999). In den Linsen transgener VimR113C Mäuse konnte durch Immunfluoreszenz eine substantielle Hochregulation von Hsp70 gezeigt werden. Ein Großteil des Chaperones kolokalisiert mit Vimentinaggregaten, während Hsp70 in wt Linsen kaum nachweisbar ist (Abb. 4.8). Der starke Anstieg in der Hsp70 Proteinmenge konnte durch Immunoblot auch in Linsenextrakten transgener Mäuse nachgewiesen werden (Abb. 4.7 E).

Es wurde zuvor gezeigt, daß die gesteigerte Expression von Hsp70 oft mit einem verstärkten Abbau des fehlgefalteten Proteins durch die Proteasom-Maschinerie einhergeht (Brehmer et al., 2001). Um diesen Zusammenhang zu analysieren, wurde die Ubiquitylierung von Vimentin in VimR113C Linsen untersucht. Dazu wurde mit Linsenextrakten eine Immunpräzipitation gegen Vimentin durchgeführt und anschließend die Ubiquitylierung durch Immunoblot nachgewiesen. Es konnte eine verstärkte Ubiquitylierung von Vimentin in VimR113C Linsen gezeigt werden (Abb. 4.7 D). Als Nächstes wurde die Proteasomenaktivität in den Faserzellen transgener VimR113C Mäuse sowie in stabil mit VimR113C transfizierten 3T3-L1 Fibroblasten

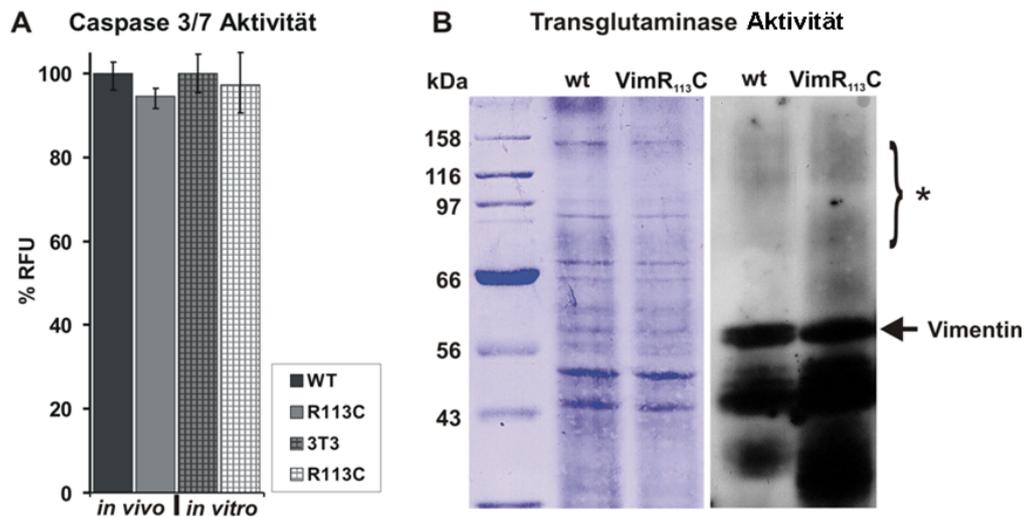


Abb. 4.9: Unveränderte Caspaseaktivität und keine Transglutaminaseaktivität in Linsen und Zellen mit wt Vimentin sowie Vimentin-Punktmutanten.

(A) Mit Hilfe eines Lumineszenz-gekoppelten Substrates wurde die Caspase-3 und -7 Aktivität in Extrakten von Linsen und stabil transfizierten 3T3-L1 Fibroblasten analysiert. In beiden Experimenten wurden keine signifikanten Änderungen in der Caspase-3 und -7 Aktivität nachgewiesen. (B) Transglutaminase Aktivität. Linsen mutanter und wt Mäuse wurden bei 37°C in der Gegenwart von 2 mM Leupeptin ÜN inkubiert. Die für IF-Proteine angereicherten Zellfraktionen wurden mit Hilfe von SDS-PAGE und Immunoblot analysiert. Die Coomassie Färbung der einzelnen Fraktionen und der Immunoblot mit einem Vimentin Antikörper sind abgebildet. Kein quervernetztes Vimentin wurde detektiert. Die erwartete Position von quervernetztem Vimentin ist mit einem Sternchen markiert.

untersucht. In beiden Zellsystemen war die Proteasomenaktivität um 30 % im Vergleich zum wt erhöht (Abb. 4.7 C). Dies zeigt, zusammen mit der erhöhten Ubiquitinylierung von Vimentin, eine Beteiligung des Proteasomensystems am Abbau der Vimentinaggregate in der Linse transgener Mäuse.

Ein weiterer potentieller Abbauweg der Vimentinaggregate ist die proteolytische Spaltung durch Caspasen. In Zellkulturexperimenten wurde demonstriert, daß Vimentin während der Apoptose ein Ziel der Caspasen 3, 6 und 7 ist (Byun et al., 2001). Die Analyse der Caspaseaktivität in Lysaten von Faserzellen transgener VimR113C Mäuse sowie von stabil mit VimR113C transfizierten 3T3-L1 Fibroblasten ergab keinen Unterschied zu wt Zellen (Abb. 4.9 A). Da die Caspasen 3 und 7 "Schlüsseleffektoren" des Apoptose-Signalweges sind, kann aus diesem Experiment geschlossen werden, daß die beobachtete Pathologie der Linse nicht durch verstärkte Apoptose verursacht wurde.

In einem weiteren Experiment sollte geklärt werden, ob der Abbau der Vimentinaggregate durch Quervernetzung beeinträchtigt wird. In Rinderlinsenzellen ist Vimentin als Ziel der Transglutaminase beschrieben worden (Clement et al., 1998). Eine kovalente Quervernetzung sollte zu hochmolekularen Vimentinspezies führen. Es konnte kein quervernetztes Vimentin in der Linse von VimR113C transgenen Mäusen nachgewiesen werden (Abb. 4.9 B).

4.1.5 Unveränderte Expression und Organisation von 'beaded-filament'-Proteinen

CP49 und Filensin bilden zusammen mit α B-Kristallin die sogenannten 'beaded'-Filamente der Linse. Sie sind, basierend auf Studien an 'knock-out'-Mäusen und menschlichen Erkrankungen, essentiell für die strukturelle Integrität und die optische Kapazität der Linse (Perng et al., 2004; Perng et al., 2007). In wt Linsen zeigen Vimentin und Filensin eine ähnliche Verteilung (Abb. 4.10 A). Um zu untersuchen, ob die in den Linsen VimR113C transgener Mäuse beobachtete Pathologie auf eine Zerstörung der 'beaded'-Filamente zurückzuführen ist, wurden Linsenschnitte mit Antikörpern gegen Vimentin, Filensin und CP49 gefärbt. Es konnte keine Veränderung in der Menge und Lokalisation von Filensin und CP49 festgestellt werden (Abb. 4.10 B,C). Desweiteren wurde keine Kolo­kalisierung mit Vimentin gefunden, d.h. die Proteinaggregate enthalten kein Filensin und CP49 und stören die Ausbildung von 'beaded-filaments' nicht (Abb. 4.10 B,C). Im Immunoblot konnten für die beiden Proteine keine Unterschiede in der Expression oder der proteolytischen Prozessierung, während der Differenzierung der Linse (Sandilands et al., 1995b), gezeigt werden (Abb. 4.10 D,E).

Das Typ IV IF-Protein Synemin, das in der Linse in geringen Mengen exprimiert wird und mit Vimentin Heteropolymere bilden kann (Granger and Lazarides, 1984; Jing et al., 2007; Tawk et al., 2003), wurde in vielen Aggregaten detektiert (Abb. 4.11 F). In Kontrollschnitten kolo­kalisiert Synemin mit Vimentin an der Zellmembran (Abb. 4.11 E). Zusätzlich wurde die Verteilung und Expression des Adapterproteins Plectin, das an Vimentin, Synemin und Aktin binden kann, untersucht (Straub et al., 2003; Wiche, 1998). Plectin zeigte eine unveränderte Verteilung an den Zelladhäsionskomplexen entlang des Linsenkortex (Abb. 4.11 C,D). Auch die Verteilung von F-Aktin war identisch im Vergleich mit Kontrolllinsen (Abb. 4.11 A,B). Sehr wahrscheinlich ist die Interaktion von Vimentin und Synemin stärker als die Interaktion zwischen Plectin und diesen beiden Proteinen. Die strukturellen Änderungen in der Linse von VimR113C transgenen Mäusen werden höchstwahrscheinlich durch die Zerstörung des endogenen Vimentin Zytoskeletts, in Analogie zu dominanten Mutationen in anderen IF-Krankheiten, verursacht. Dies wirft die Frage auf, in wie weit ein funktionelles Vimentin Zytoskelett, zusätzlich zu 'beaded-filaments', für die Integrität der Linse notwendig ist (siehe auch Abb. 5.1).

Um zu verstehen, wie Vimentinpunktmutationen zu strukturellen Veränderungen und ultimativ zum Katarakt der Linse führen, wurden die Organisation und die Verteilung

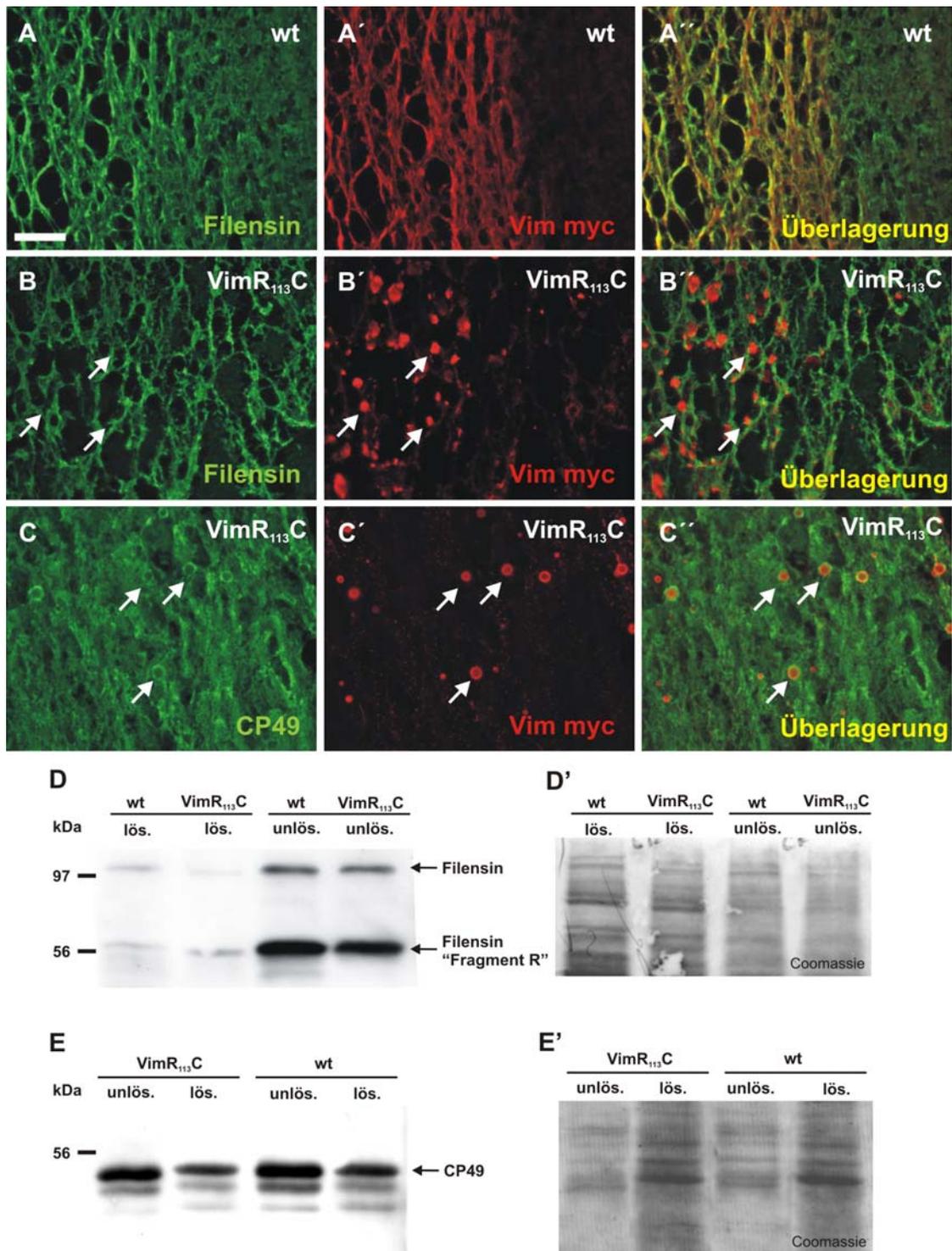


Abb. 4.10: Unveränderte Verteilung und Expression von 'beaded filament'-Proteinen in Mauslinsen. (A-C) Immunfluoreszenzanalyse an Kryoschnitten von 5-Monate alten, VimR113C und wt transgenen Mauslinsen. Gewebeschnitte wurden mit Antikörpern gegen Filensin, CP49 (beide grün) und Myc-markiertes, transgenes Vimentin (rot) gefärbt. Die Expression und Lokalisation von Filensin und mutiertem Vimentin ist in wt (A) und in VimR113C Mäusen (B) dargestellt. (C) zeigt CP49. Überlagerte Bilder dokumentieren die unveränderte Expression und Lokalisation der wichtigsten Linsenproteine in der Gegenwart von Vimentinaggregaten, die keine Kolo-kalisation zeigen. (D,E) Nachweis von Filensin und CP49 in der löslichen (lös.) und unlöslichen (unlös.) Fraktion von Linsenextrakten von wt und VimR113C Mäusen mittels Immunoblot. (D',E') Gleiche Beladung des entsprechenden Coomassie-gefärbten SDS-Gels. In der Menge und in der Prozessierung der wichtigsten Linsenproteine wurde keine Veränderung festgestellt. 'Fragment R' Filensin markiert ein bevorzugtes proteolytisches Spaltprodukt von Filensin, in Übereinstimmung mit früheren Studien (Sandilands et al., 1995b). Maßstabsbalken: 20 μ m.

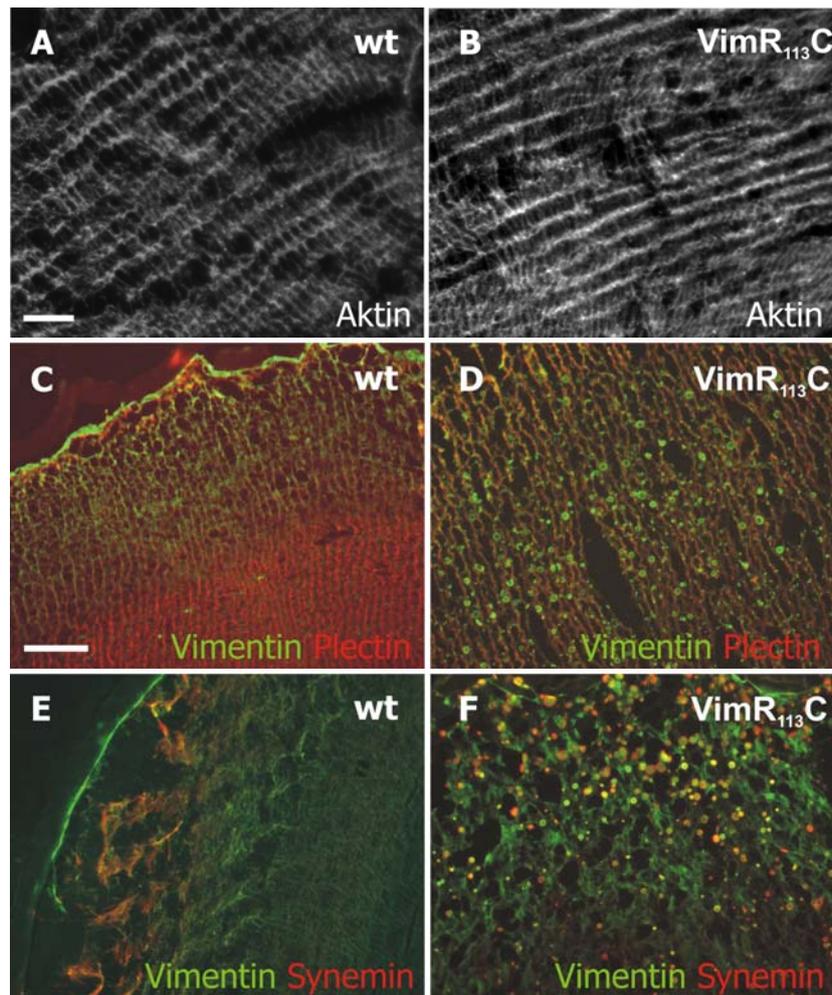


Abb. 4.11: Verteilung von Zytoskelett- und Vimentin-assoziierten Proteinen in Mauslinsen. (A,B) Immunfluoreszenzanalyse an Linsen-Kryoschnitten von (A) wt und (B) VimR113C Mäusen. Um F-Aktin darzustellen, wurden die Gewebeschnitte mit Phalloidin gefärbt. Die Aktin Verteilung ist in den Linsen mutanter Mäuse unverändert. (C,D) Doppelimmunfluoreszenz an Linsenschnitten mit Plectin (rot) und Vimentin (grün). In Kontrollschnitten sind beide Proteine unter der Zellmembran verteilt. In VimR113C Linsenschnitten bleibt die submembrane Lokalisation von Plectin erhalten, wohingegen Vimentin große Aggregate bildet. (E,F) Doppelimmunfluoreszenz von Synemin (rot) und Vimentin (grün). Synemin, das mit Vimentin Heteropolymere bilden kann, wurde in einige, aber nicht alle, Vimentin Proteinaggregate relokalisiert. Das legt die Hypothese nahe, daß die Interaktion von Vimentin und Synemin erhalten bleibt, wohingegen ihre Bindung zum Membranadhäsionskomplex gestört ist. Maßstabsbalken: (A,B) 10 µm, (C-F) 20 µm.

von Fokalkontakten in stabil transfizierten 3T3-L1 Fibroblasten untersucht. In den Sternzellen der Leber ist Synemin an Fokalkontakten lokalisiert und verbindet wahrscheinlich Vimentin mit diesen (Uyama et al., 2006). In Übereinstimmung damit wurde mit Immunfluoreszenz in wt 3T3-L1 Zellen eine partielle Kolokalisation von Vimentin mit Talin und Vinculin an Fokalkontakten detektiert (Abb. 4.12 A,C,E,G) (Tsuruta and Jones, 2003; Uyama et al., 2006). Fibroblasten die VimR113C exprimieren, zeigen eine unveränderte Lokalisation von Talin und Vinculin (Abb. 4.12 B,D) sowie eine intakte Interaktion mit β 1-Integrinen (Abb. 4.12 F,H). Die Interaktion von Talin und Vinculin mit Vimentin ist zerstört. Vimentin bildet im gesamten

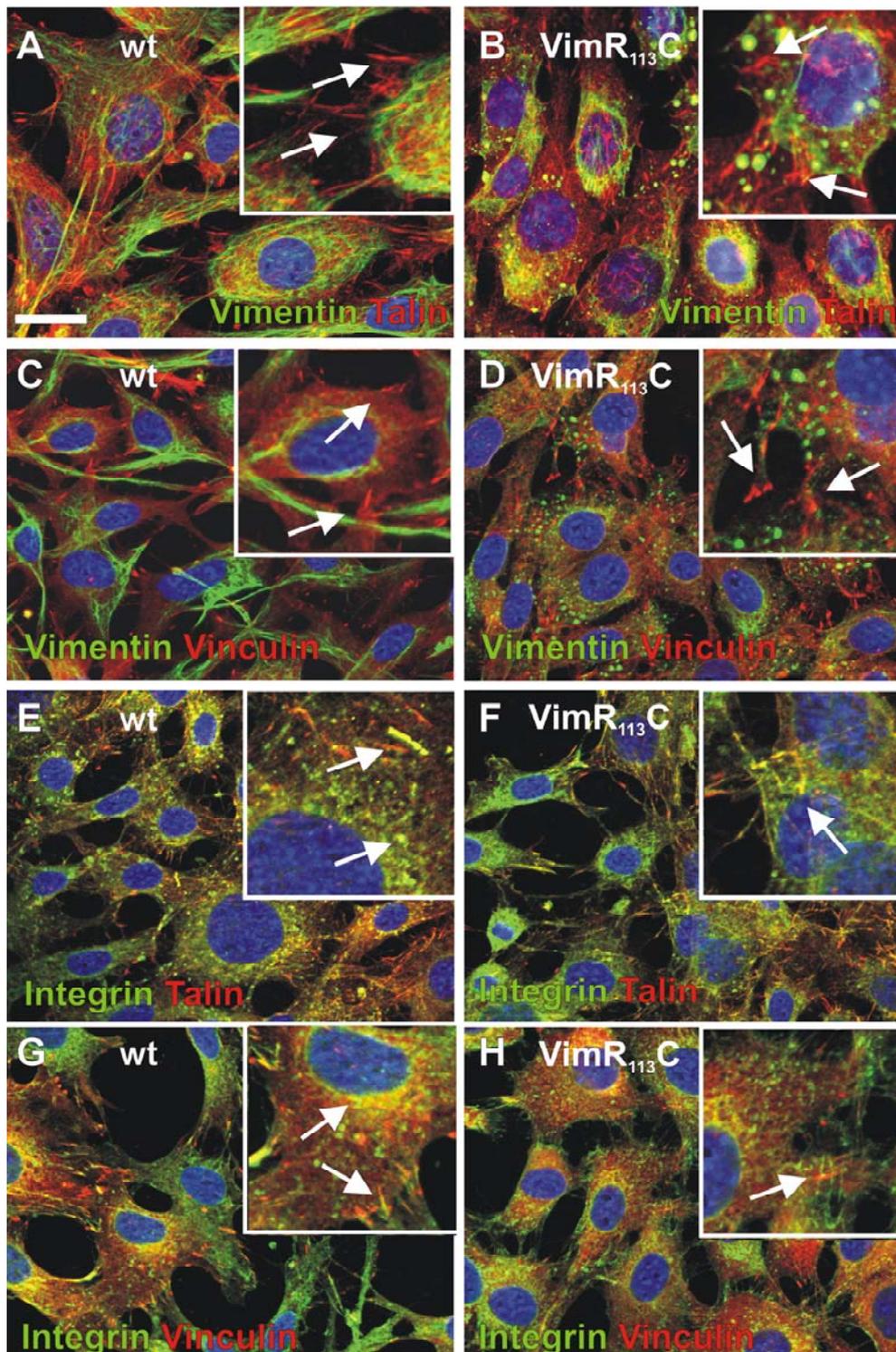


Abb. 4.12: Normale Fokalkontakte in VimR113C Fibroblasten.

Doppelimmunfluoreszenz von Fokalkontakt-Proteinen in wt und VimR113C 3T3-L1 Fibroblasten. (A,C) Interaktion von Vimentin mit Talin und Vinculin an Fokalkontakten (Pfeil in Vergrößerung). (B,D) Unveränderte Verteilung von Talin und Vinculin in der Gegenwart von zytosolischen Vimentin Proteinaggregaten (Pfeile). (E,G) Kolokalisation von Vinculin und Talin mit β 1-Integrin an Fokalkontakten. (F,H) Die Verteilung von Talin und Vinculin an Fokalkontakten, analysiert durch β 1-Integrin Färbung, ist in VimR113C Fibroblasten unverändert. Diese Daten legen nahe, daß Intermediärfilamente, die VimR113C enthalten, nicht stabil mit Fokalkontakten interagieren können. Maßstabsbalken: 20 μ m.

Zytoplasma Aggregate (Abb. 4.12 B,D,F,H). Obwohl die Verbindung zwischen Vimentinfilamenten und Fokalkontakten gestört ist, beeinflussen in Zellkultur-experimenten die Vimentinaggregate die Verteilung der Fokalkontakte nicht. In Linsenfaserzellen, die auch Synemin exprimieren, verursacht die Expression von VimR113C eine verringerte Bindung an Synemin- und Talin-enthaltende Fokalkontakte und führt zur Ablagerung von Synemin in zytoplasmatischen Aggregaten (siehe auch Abb. 5.1). Die Vimentinpunktmutante R113C zerstört die Integrität der Faserzellen durch Störung der Bindung von Vimentin und / oder Synemin mit Proteinen der Fokalkontakte. Außerdem verursacht VimR113C Expression *in vivo* die Hochregulation von Hsp70 und die Ausbildung von zytoplasmatischen Aggregaten, die altersabhängig zu einem Katarakt der Linse führen (Abb. 4.1, 4.4, 4.6).

4.2 Vimentin Antikörper Generierung und Charakterisierung

Ein neuer anti-Vimentin Antikörper sollte generiert werden, um insbesondere in der Immunfluoreszenz an Gewebeschnitten verbesserte Spezifität und dadurch reduzierten Hintergrund im Vergleich zum Serum GP53 und dem Klon 3B4 zu erreichen. Dazu wurden zwei Kaninchen mit dem Peptid (CGQVINETSQHHDDLE), das dem Vimentin C-Terminus entspricht, immunisiert und es wurden insgesamt 200 ml Serum gewonnen. Das Serum wurde in Aliquots bei -80°C gelagert und wurde im Folgenden im Immunoblot und in Immunfluoreszenzreaktionen getestet.

Die anti-Vimentin Immunfluoreszenz wurde auf 3T3-L1 Fibroblasten (Abb. 4.13), wt und vim ko^{-/-} MEF Zellen (Abb. 4.23) und auf Mausleber Kryoschnitten (Abb. 4.15) getestet. 3T3-L1 Zellen und wt MEF exprimieren Vimentin und zeigen eine filamentöse Verteilung im gesamten Zytoplasma. Vim ko^{-/-} MEF und Leberschnitte von vim ko^{-/-} Mäusen sind dagegen wie erwartet Vimentin-negativ. Die Färbung auf ko^{-/-} Schnitten gleicht der Kontrolle ohne Primärantikörper auf wt Gewebe (Abb. 4.15 A,B). Dies demonstriert die Spezifität des Antikörpers und er weist auch keine Kreuzreaktion mit anderen Typ III IF-Proteinen, wie z.B. GFAP oder Desmin, auf. Leberfärbungen von C57Bl/6 wt Tieren zeigen eine typische Vimentinverteilung in Sternzellen, Epithelzellen der Gallengänge und in den Endothelzellen der Kapillaren (Abb. 4.15 C,D). Im Vergleich zu den Vimentinantikörpern GP53 (Meerschwein) und 3B4 (Maus) ist der neugenerierte vim_CT Antikörper (Kaninchen) auf Gewebe-

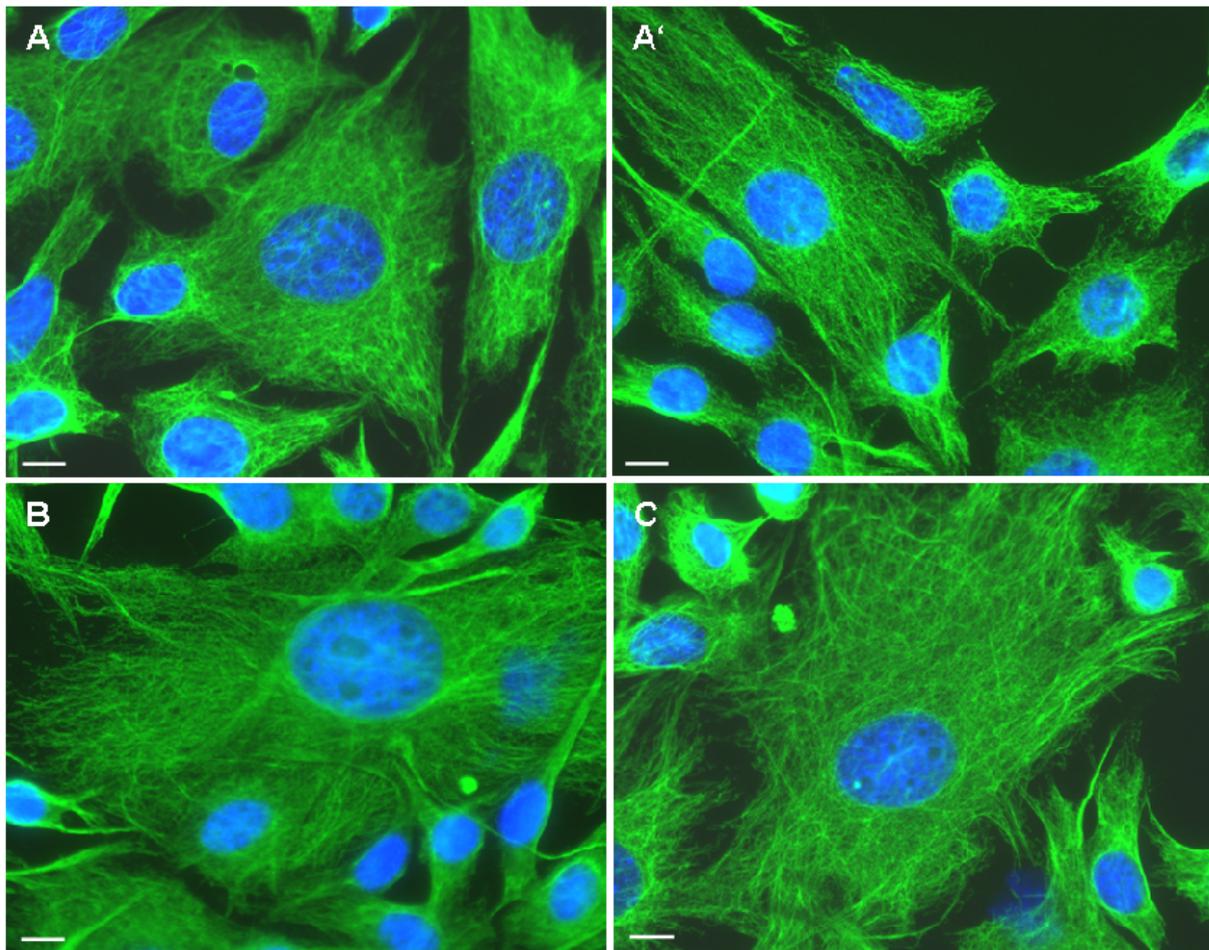


Abb. 4.13: Immunfluoreszenz α -Vimentin auf 3T3-L1 Zellen.

Der neu generierte α -Vimentin Antikörper wurde in verschiedenen Verdünnungen auf Spezifität an fixierten Zellen getestet. (A) und (A') 1/100. (B) 1/1000. (C) 1/2500. Maßstabsbalken: 10 μ m.

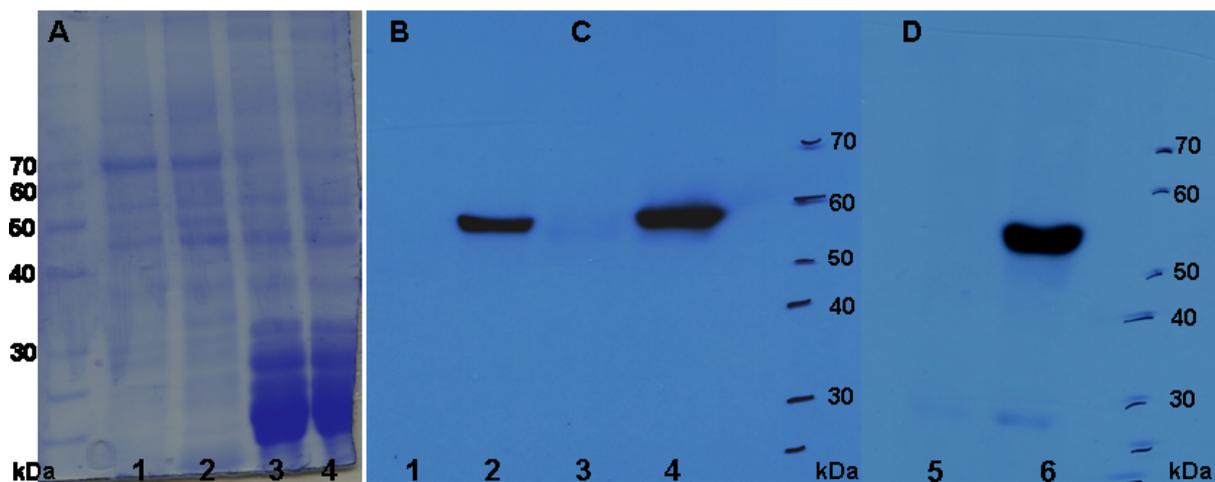


Abb. 4.14: Immunoblot α -Vimentin.

Der neu generierte α -Vimentin Antikörper wurde in verschiedenen Verdünnungen auf Spezifität im Immunoblot getestet. (A) Coomassiefärbung der Spuren 1-4 zeigt in etwa gleiche Proteinbeladung. (B) bis (D) Immunoblot α -Vimentin mit verschiedenen Lysaten. (B) Zelllysate. (1) MCF 7. (2) 3T3-L1. (C) Maus Augenlysate. (3) *vim ko^{-/-}*. (4) C57Bl/6. (D) Maus Leberlysate. (5) *vim ko^{-/-}*. (6) C57Bl/6.

schnitten der Maus spezifischer. Für Mehrfach-Immunfluoreszenzreaktionen steht nun ein Vimentinantikörper aus einer weiteren Spezies zur Verfügung. Der neue

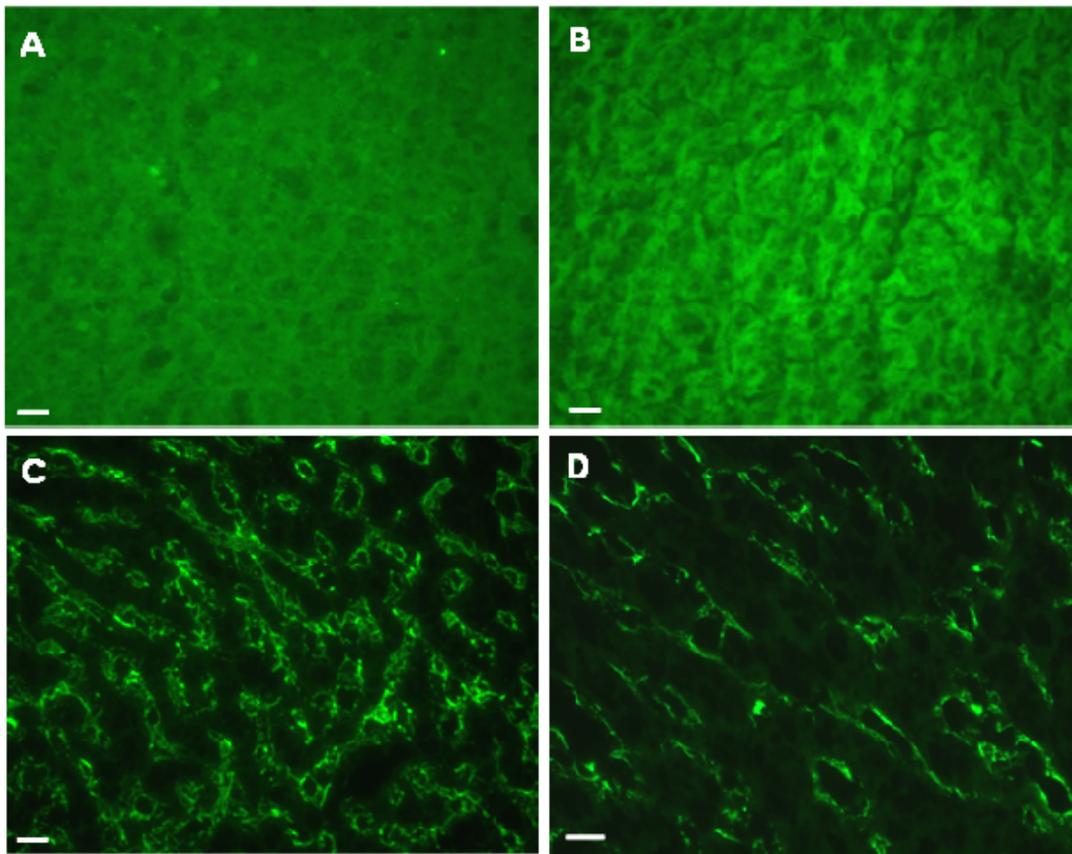


Abb. 4.15: Immunfluoreszenz α -Vimentin auf Maus Leber Kryoschnitten. Der neu generierte α -Vimentin Antikörper wurde in verschiedenen Verdünnungen auf Spezifität an Gewebeschnitten getestet. Als Negativkontrolle dienten Gewebe von Vimentin $ko^{-/-}$ -Tieren. (A) Vim $ko^{-/-}$ Leber. (B-D) C57Bl/6 Leber zeigt eine typische Vimentinverteilung in Sternzellen, Epithelzellen der Gallengänge und in den Endothelzellen der Kapillaren. (B) Kontrolle ohne Primärantikörper. Maßstabsbalken: A-C) 20 μ m, D) 10 μ m.

Vimentin Antikörper wurde auch im Immunoblot getestet. Dazu wurden Zelllysate sowie Augen- und Leberlysate von wt und $ko^{-/-}$ Mäusen genutzt. In etwa gleiche Proteinbeladung der einzelnen Spuren wurde durch Coomassiefärbung sichergestellt (Abb. 4.14 A). In Zelllysaten konnte Vimentin nur in 3T3-L1 Fibroblasten nachgewiesen werden (Abb. 4.14 B). MCF-7 Zellen exprimieren kein Vimentin. In Augen- und Leberlysaten (Abb. 4.14 C, D) ist Vimentin nur in wt Proben nachzuweisen, die Spuren mit vim $ko^{-/-}$ Lysat (3,5) sind wie erwartet Vimentin-negativ. Folgende Verdünnungen wurden als optimal bestimmt: Immunfluoreszenz auf Gewebeschnitten 1:500, Immunfluoreszenz auf fixierten Zellen 1:1000, Immunoblot 1:30.000.

In weiteren Versuchen wurde die Spezifität und optimale Verdünnung eines GFAP Antikörpers in Immunfluoreszenzreaktionen bestimmt. GFAP-Färbungen des Gehirns von wt NMRI Mäusen zeigen eine typische Verteilung in Gliazellen (Abb. 4.16 A,B). Um Doppeltransfektionen in Zellkultur nachweisen zu können, mußten Antikörperreaktionen gegen Protein-Tags etabliert werden. In (Abb. 4.16, C) ist ein

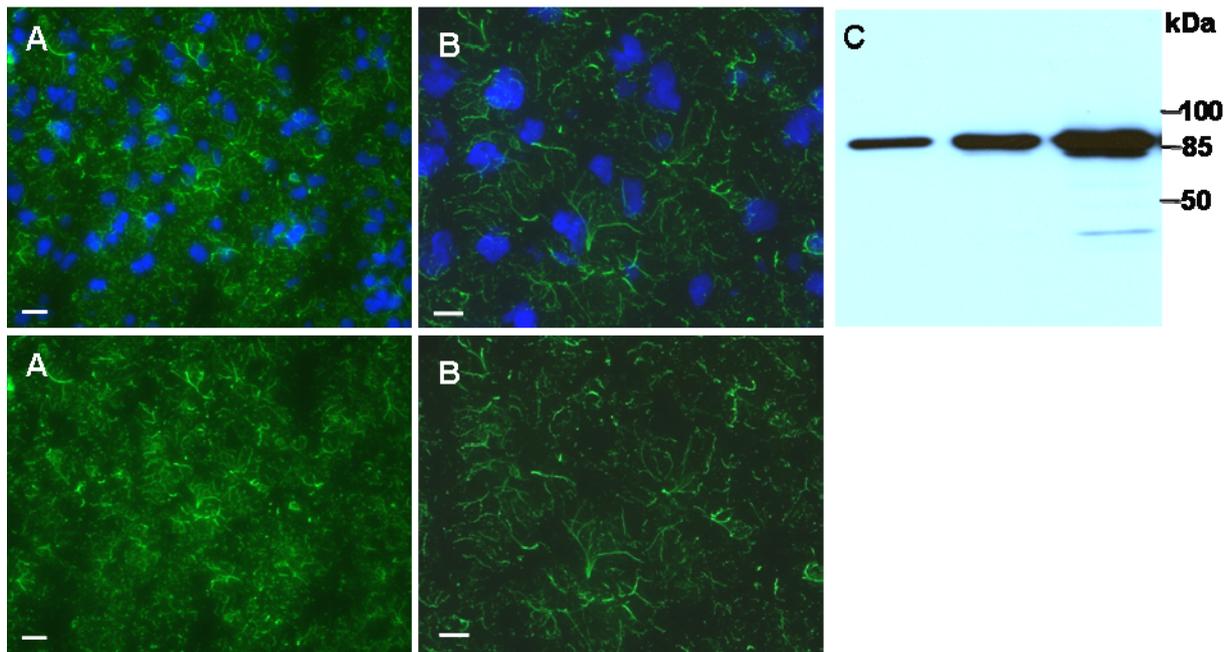


Abb. 4.16: Etablierung der α -GFAP Immunfluoreszenz und des Immunoblots α -HA. (A-B) Test der Spezifität des α -GFAP Antikörpers in Immunfluoreszenzreaktionen. NMRI Maus, Gehirn. 8 μ m Kryoschnitte, horizontal. Maßstabsbalken: A) 20 μ m, B) 10 μ m. (C) Test der Spezifität eines α -HA Antikörpers im Immunoblot. Lysat von MCF-7 Zellen, transient transfiziert mit HA-Stat3 (90,5 kDa). Aufgetragen sind 1, 2 und 5 μ l.

Immunoblot gegen den HA-Tag abgebildet. Verwendet wurde dabei ein Lysat von MCF-7 Zellen, die transient mit einem HA-Stat3 Konstrukt transfiziert waren. Gut zu erkennen ist der Anstieg der Signalintensität in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinmenge.

4.3 Vimentinmutation und humane Erkrankungen

4.3.1 Identifikation einer humanen Vimentinmutation

Vimentin ist eines der wenigen IF-Gene, die noch nicht mit einer humanen Erkrankung verknüpft werden konnten (Magin et al., 2004; Magin et al., 2007; Omary et al., 2004). In einem reversen genetischen Experiment wurde der hohe Grad an Sequenzidentität zwischen Vimentin und anderen IF-Proteinen, vor allem in den sogenannten IF-Konsensusmotiven in den α -helikalen Enden der 'rod'-Domäne (Herrmann and Aebi, 2004) genutzt, um transgene Mäuse, welche die dominante Vimentinmutation R113C in der 1A-Domäne exprimieren, zu generieren. Als Konsequenz entwickeln die Mäuse einen Katarakt (Bornheim et al., 2008). Die analoge Mutation in Keratin 14, R125C, ist die häufigste genetische Veränderung in Keratinen und führt zu einer schweren EBS-Erkrankung (Uitto et al., 2007).

Basierend auf diesem Ansatz wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. S. Bhattacharya, University College of London, das humane Vimentin in 90 Kataraktpatienten auf Unterschiede zur veröffentlichten DNS-Sequenz untersucht (Ferrari et al., 1986). In einer 45jährigen Patientin mit einem zonularen 'staubartigen' Katarakt wurde die Substitution G596A in Exon 1 gefunden (Abb. 4.17 A). Auch die Mutter der Patientin litt unter einem Katarakt, wodurch eine autosomale dominante Vererbung etabliert ist. Unglücklicherweise konnte von den Familienmitgliedern kein biologisches Material erhalten werden, um diesen Zusammenhang durch DNS-

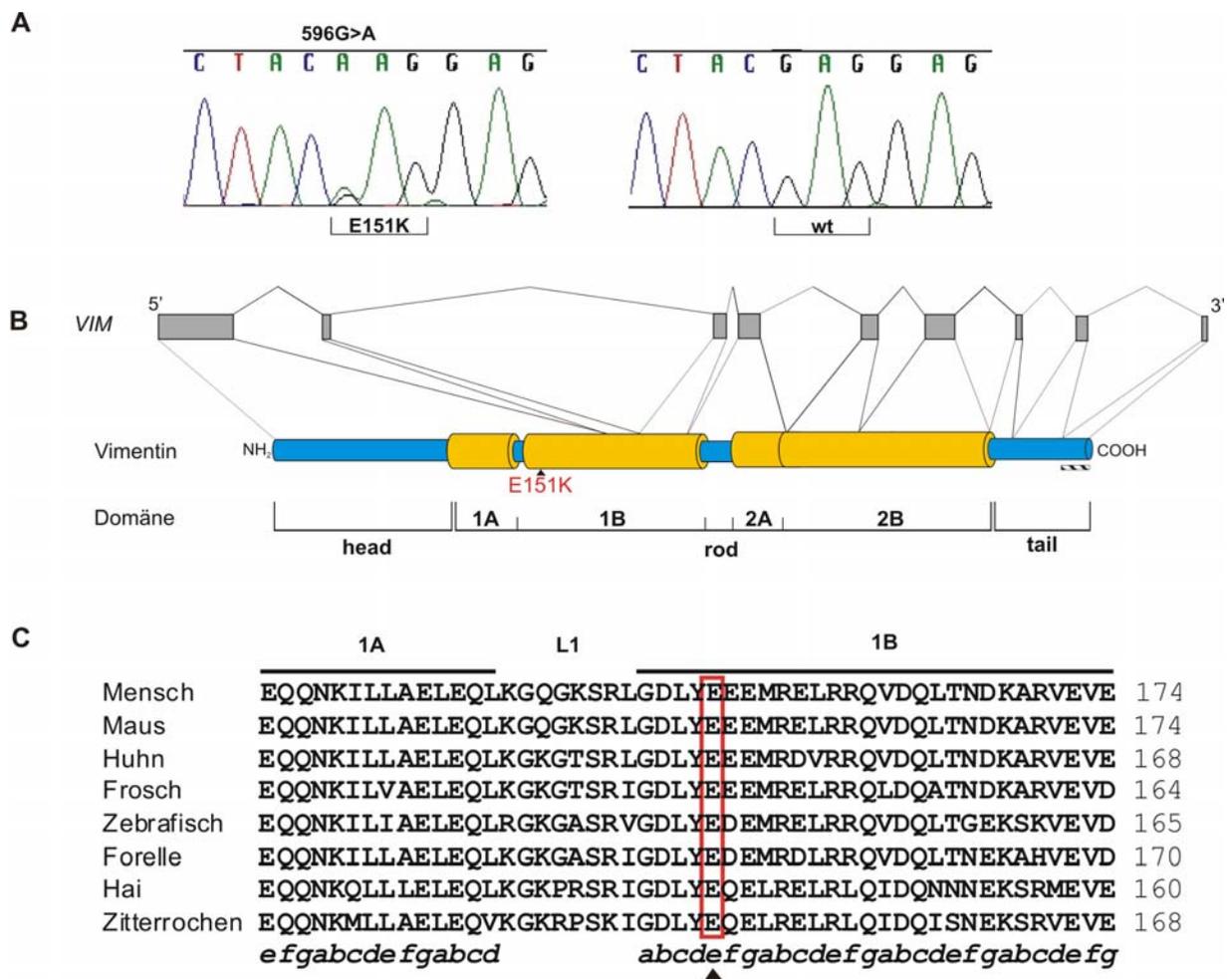


Abb. 4.17: Vimentin Struktur und Mutation.

(A) Identifikation einer *VIM* Mutation in einem Kataraktpatienten durch DNS-Sequenzierung. Die veränderten Nukleotide in der mutierten Sequenz sind über dem Chromatogram dargestellt, die entsprechend geänderte Aminosäure darunter. (B) Schematische Darstellung der Vimentin Gen- und Protein-Domänenorganisation. Die Lage der Mutation E151K im coil 1B von humanem Vimentin ist durch ein schwarzes Dreieck hervorgehoben. Gestrichelte Linien kennzeichnen das Peptid (CGQVINETSQHDDLE), das benutzt wurde, um ein hochspezifisches α -Vimentinserum zu generieren. (C) Alignment von partiellen Vimentin Proteinsequenzen aus verschiedenen Spezies. 1A, L1 und 1B markieren coil 1A, linker und coil 1B Domänen von Vimentin. Die Position der rod-Domäne ist über der Sequenz dargestellt. Buchstaben unter der Sequenz kennzeichnen die relative Position in der α -Helix. Bemerkenswert ist die Konservierung der Aminosäure E151 zwischen den Spezies. Diese Aminosäure ist im Kataraktpatienten mutiert (rote Box). Zahlen markieren die Aminosäurepositionen in den entsprechenden Spezies.

Sequenzierung zu unterstützen. Die entdeckte Mutation ist in den 192 Kontrollsequenzen der europäischen Zellkultursammlung von gesunden Probanden (human random control DNA panels) nicht enthalten. Die Mutation G596A ist auch keiner der 51 bekannten Nukleotidpolymorphismen (SNPs) im Vimentingen (NCBI), von denen 3 im Exon 1 liegen. Die Substitution verursacht einen Wechsel der Aminosäure von Glutaminsäure zu Lysin in der 'e'-Position der ersten Heptadenwiederholung in der 1B-Domäne (Abb. 4.17 B). Die Glutaminsäure ist in dieser Position der Vimentinsequenz evolutionär von Knorpelfischen bis zum Menschen konserviert (Abb. 4.17 C). Außerdem ist die Glutaminsäure in Desmin und neuronalen IF-Proteinen, die mit Vimentin während der Embryonalentwicklung Heteropolymere bilden, konserviert (Herrmann and Aebi, 2004; Schaffeld et al., 2001) (Abb. 4.29), was eine wichtige funktionale Rolle dieser Aminosäure unterstreicht. Eine analoge Mutation ist bis jetzt noch für kein anderes IF-Gen entdeckt worden. Die Vimentin 'rod'-Domäne ist für die Dimerbildung essentiell und ist bei der Zusammenlagerung zu langen Filamenten entscheidend beteiligt (Herrmann et al., 2007; Herrmann et al., 1996; Parry et al., 2007). Daher stellen wir die Hypothese auf, daß die Mutation der konservierten Aminosäure mit einer Zerstörung von intra- und interhelikalen ionischen Interaktionen, und dadurch mit einer Veränderung der Vimentin Filamentstruktur und Funktion, einhergeht.

4.3.2 *In vitro* Charakterisierung der Vimentinmutation

Um die biologischen und biochemischen Folgen der Mutation zu untersuchen, wurde cDNS der E151K Mutation und der R113C Mutation, die zur Zerstörung der Vimentinfilamente und zum Katarakt in der Maus führt (Bornheim et al., 2008), transient in MCF-7 Zellen transfiziert. Etwa 19 % der VimE151K transfizierten Zellen zeigt zytoplasmatische Vimentinaggregate unterschiedlicher Größe, was darauf hinweist, daß die Vimentinmutation einen Einfluß auf die Struktur des Vimentinpolymers und auf die Filamentorganisation ausübt (Abb. 4.18 A-E). Die restlichen transfizierten Zellen enthielten Filamente, die von kurzen Stücken bis zu wildtypartigen, langen Filamenten reichten. Diese veränderte Vimentinorganisation erinnert an die zuvor analysierte dominant negative Punktmutante R113C (Bornheim et al., 2008; Schietke et al., 2006) (siehe auch 4.1), wenn auch in weniger starker Ausprägung (Abb. 4.18 F). Die Transfektion von wt Vimentin in MCF-7 Zellen führt zur Ausbildung von extensiven Filamenten im gesamten Zytoplasma und

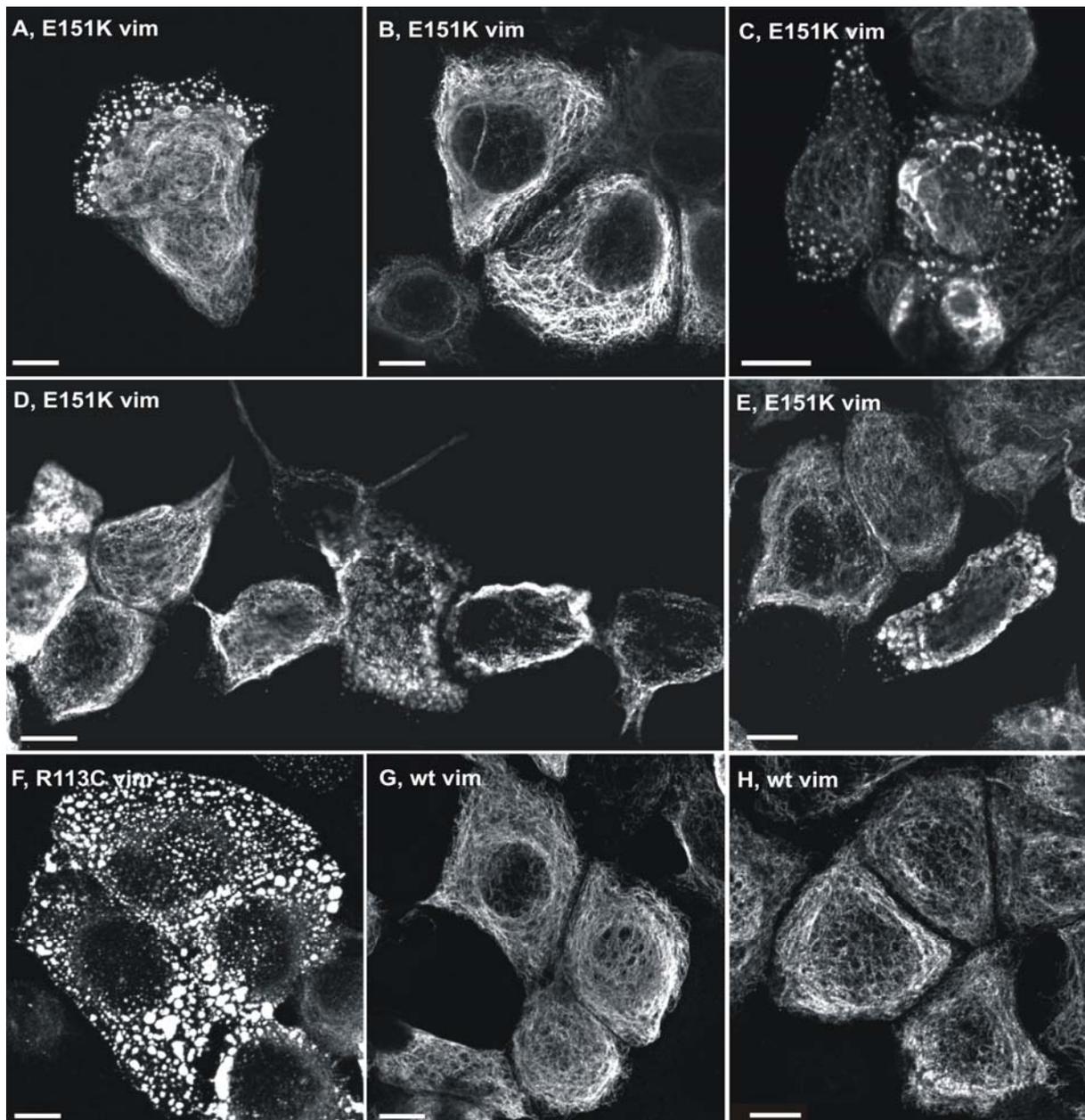


Abb. 4.18: Immunfluoreszenzanalyse von transient transfizierten MCF-7 Zellen.

Die Expression der Vimentin E151K Punktmutante verursacht eine veränderte Organisation des Vimentin Zytoskeletts. (A) bis (E) zeigen einen Bereich von Vimentin E151K Phänotypen, die von zerstörten Vimentinfilamenten, organisiert in dichten zytosolischen Aggregaten (A), bis zu beinahe normal erscheinenden Vimentinfilamenten (B) reichen. (F) Die zuvor charakterisierte, dominante Vimentin R113C Punktmutante verursacht eine stärkere Zerstörung des Zytoskeletts (Bornheim et al., 2008; Schietke et al., 2006) als die Mutante E151K. (G) und (H) Ausbildung eines extensiven, filamentösen Zytoskeletts nach Transfektion mit wt Vimentin. Maßstabsbalken: 10 μ m.

demonstriert die generelle Fähigkeit der Zellen zur Filamentbildung (Abb. 4.18 G,H). Da im R113C *in vivo*-Modell eine erhöhte Proteasomenaktivität, die zum Kataraktphänotyp beiträgt, festgestellt wurde (4.1 und (Bornheim et al., 2008), wurde die Konservierung des Pathomechanismus in E151K transfizierten Zellen untersucht. In Zellextrakten von R113C und E151K transfizierten Zellen war die Proteasomenaktivität jeweils um etwa 60 % erhöht Vergleich zu MOCK-transfizierten

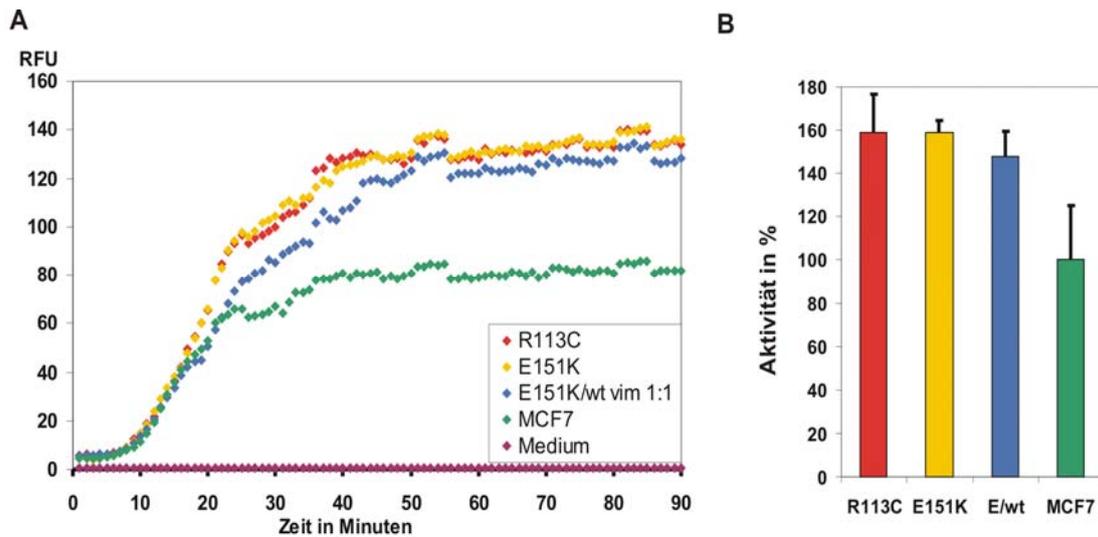


Abb. 4.19: Die missense Mutation E151K verursacht eine erhöhte Proteasomenaktivität in transient transfizierten MCF-7 Zellen.

(A) In transfizierten MCF-7 Zellen verursachen beide Mutanten, E151K und R113C, einen starken Anstieg der Proteasomenaktivität. Mock-transfizierte Zellen zeigen einen geringen Anstieg. (B) Stellt die relative Proteasomenaktivität von (A) zum Zeitpunkt 45 min dar. Im Vergleich zu mock-transfizierten Zellen zeigen einzeln- und doppelt-transfizierte Zellen einen Anstieg der Proteasomenaktivität von 60 % bzw. 50 %.

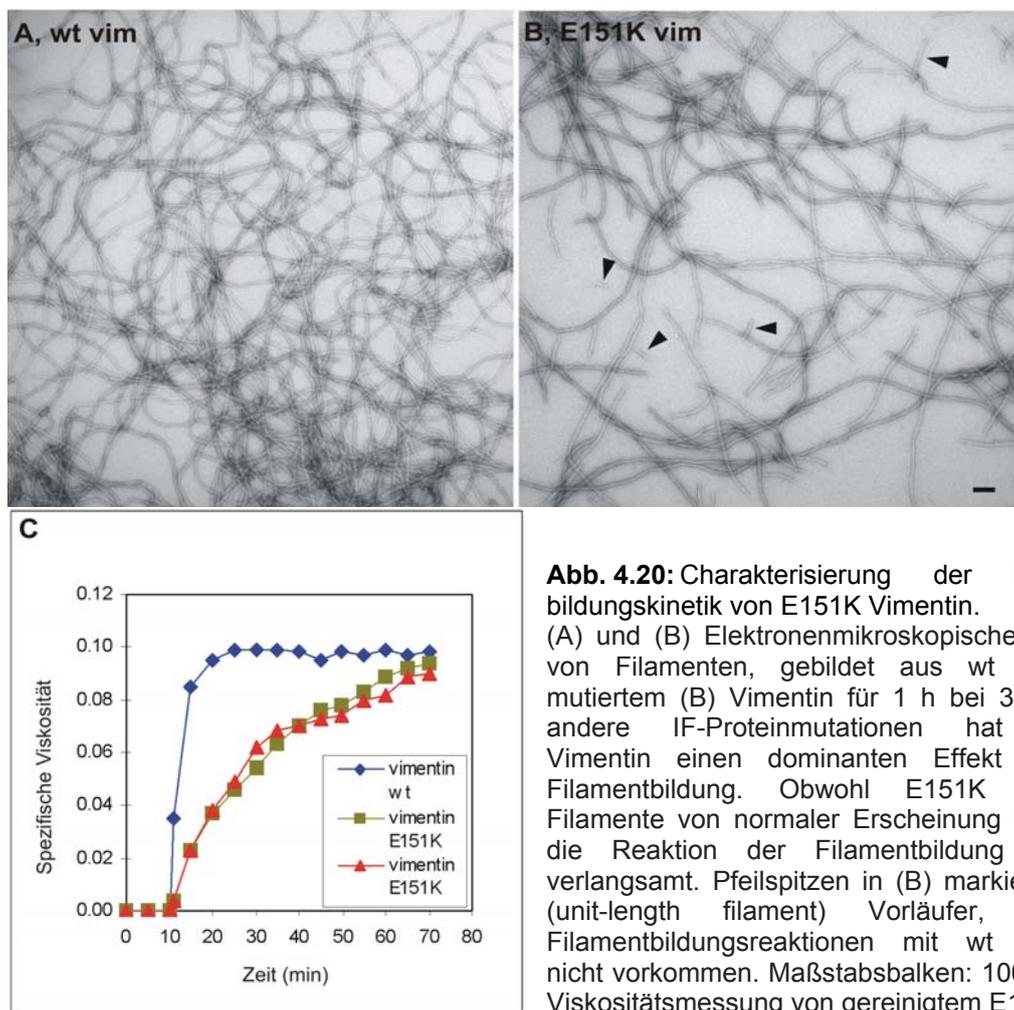


Abb. 4.20: Charakterisierung der Filamentbildungskinetik von E151K Vimentin.

(A) und (B) Elektronenmikroskopische Analyse von Filamenten, gebildet aus wt (A) und mutiertem (B) Vimentin für 1 h bei 37°C. Wie andere IF-Proteinmutationen hat E151K Vimentin einen dominanten Effekt auf die Filamentbildung. Obwohl E151K Vimentin Filamente von normaler Erscheinung bildet, ist die Reaktion der Filamentbildung deutlich verlangsamt. Pfeilspitzen in (B) markieren ULF (unit-length filament) Vorläufer, die in Filamentbildungsreaktionen mit wt Vimentin nicht vorkommen. Maßstabsbalken: 100 nm. (C) Viskositätsmessung von gereinigtem E151K und

wt Vimentin. Beide Proteine zeigen ein ähnliches Viskositätsprofil, wobei die Vimentin Punktmutante E151K eine sehr geringe Geschwindigkeit der Filamentbildung aufweist. Die Viskosität von Vimentin E151K Protein ist aus zwei unabhängigen Experimenten gezeigt.

MCF-7 Zellen (Abb. 4.19). Kotransfektion von E151K und wt Vimentin resultierte immer noch in einer Erhöhung der Proteasomenaktivität um etwa 50 %. Dies demonstriert ein dominantes Verhalten der E151K Vimentinmutation in diesem Experiment und stimmt mit den genetischen Daten überein.

Um die Vimentinmutation weiter zu charakterisieren, wurde ein etabliertes *in vitro* Assemblierungsexperiment mit gereinigtem Vimentin genutzt (Schieter et al., 2006). *In vitro* Assemblierung von wt Vimentin ergab lange und verzweigte Filamente, wohingegen E151K Vimentin deutlich kürzere und weniger verzweigte Filamente, selbst nach verlängerter Inkubationszeit, bildet (Abb. 4.20 A,B). E151K Vimentin zeigt auch unvollständige Filamente, die im wt nicht vorkommen (Pfeile in Abb. 4.20 B). An frühen Zeitpunkten (10 sek.) der Filamentbildung mit E151K Vimentin waren ULFs (unit length filaments) vorhanden, allerdings war die Zusammenlagerung der ULFs zu langen Filamenten im Vergleich zu wt Vimentin deutlich verlangsamt. Diese Daten wurden durch Viskositätsexperimente unterstützt. E151K Vimentin erreichte dabei nur sehr langsam eine erhöhte Viskosität (Abb. 4.20 C). Wt Vimentin erreichte nach 10 min ein Plateau, während E151K Vimentin erst nach 1 h langsam einen Maximalwert der relativen Viskosität η erreicht. So ergibt wt Vimentin z.B. nach einer Minute einen η Wert von 0,035, das entspricht 36 % des Wertes nach 1 h, E151K dagegen nur 0,004, was 4 % des Wertes nach 1 h entspricht. Zusammen unterstützen die *in vitro* Experimente die Hypothese, daß die E151K Mutation nicht die Filamentbildung an sich inhibiert, aber zu einem starken kinetischen Defekt, sowohl zu frühen als auch späten Stadien der Filamentbildung, führt.

4.3.3 Erzeugung und Charakterisierung von stabil transfizierten Fibroblastenzelllinien

Um den Effekt von Vimentinmutationen in einem gut manipulierbaren Zellkulturmodell zu analysieren, wurden 3 Plasmide generiert, die N-terminal FLAG-markiertes wt, R113C und E151K Vimentin kodieren. Diese Plasmide wurden in 3T3 F442A Fibroblasten transfiziert und mit G418 auf stabile Integration selektiert. Das FLAG-Epitop ermöglicht eine Unterscheidung von endogenem und transgenem Vimentin. Die Expression des Vimentin Transgens wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenz in mehreren Klonen analysiert (Abb. 4.21). Es wurden ausschließlich Zellklone weiterverwendet, die in mindestens 90 % der Zellen transgenes Vimentin aufwiesen. Wildtyp Vimentin und die E151K Vimentinpunkt-

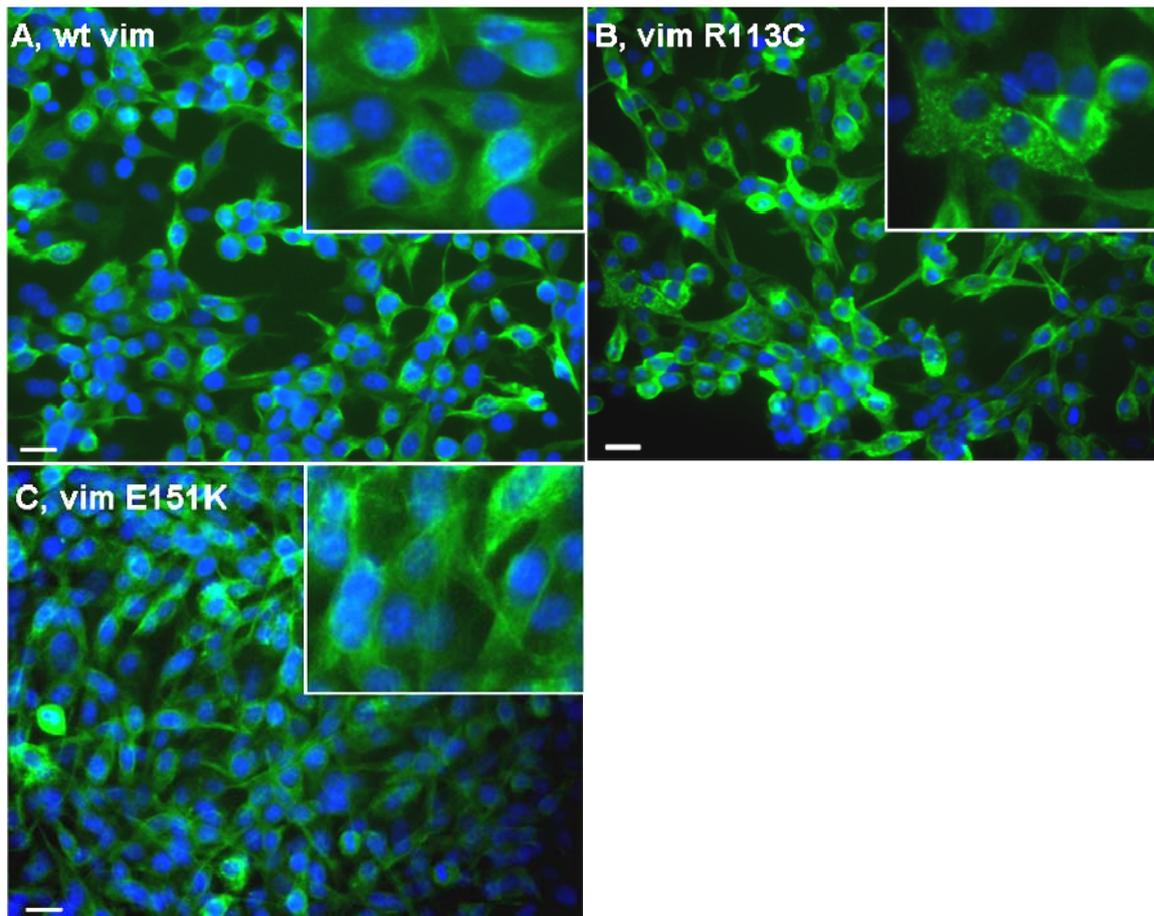


Abb. 4.21: Immunfluoreszenzanalyse stabil transfizierter 3T3 F442A Fibroblasten. Immunfluoreszenz α -FLAG von stabil transfizierten 3T3 F442A Fibroblasten Zellen. (A) wt Vimentin exprimierende Fibroblasten. (B) Vim R113C. (C) Vim E151K. Mehr als 95 % der Zellen sind positiv für das Vimentin-Transgen. Das Inset zeigt jeweils einen vergrößerten Ausschnitt. Maßstabsbalken: 20 μ m.

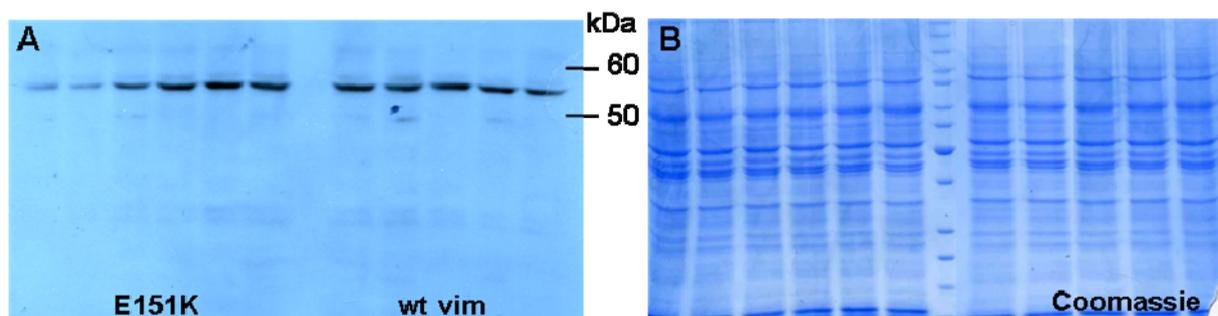


Abb. 4.22: Immunoblotanalyse stabil transfizierter 3T3 F442A Fibroblasten. (A) Immunoblot α -FLAG. Bei gleicher Proteinbeladung des Gels wurde die Expression von transgenem Vimentin in verschiedenen Klonen analysiert. Die stabil transfizierten 3T3 F442A Fibroblasten exprimieren unterschiedliche Mengen an transgenem Vimentin. (B) Coomassiefärbung des entsprechenden PAA-Gels.

mutante bilden in Fibroblasten ein ausgeprägtes Filamentsystem (Abb. 4.21 A,C). Die Expression von R113C Vimentin dagegen führt in einem Großteil der Zellen zur Aggregation von Vimentin (Abb. 4.21 B), in Übereinstimmung mit Untersuchungen von (Schietke et al., 2006). Die so identifizierten Klone wurden weiter durch Immunoblot charakterisiert. Dabei zeigte sich, daß die Klone bei gleicher

eingesetzter Proteinmenge unterschiedliche Mengen an transgenem Vimentin exprimieren (Abb. 4.22). Die unterschiedlichen Verhältnisse von transgenem zu endogenem Vimentin in den analysierten Klonen beeinflussten allerdings die Filamentbildung und Vimentinverteilung innerhalb der Zelle nicht. Da die VimE151K Fibroblasten in der Gegenwart von endogenem Vimentin keinen Effekt auf die Filamentbildung oder Vimentinlokalisierung zeigten, wurden die stabilen Zelllinien nicht weiter zur Analyse der physiologischen Effekte der E151K Punktmutation eingesetzt. Vielmehr sollten für diesen Zweck Vimentin-freie Zellsysteme oder Zellen mit definierten bzw. regulierbaren Mengen von endogenem und transgenem Vimentin verwendet werden.

3T3 F442A Zellen können durch Zugabe von z.B. Insulin zum Medium zu Adipozyten differenziert werden und sind somit als Modell der Differenzierung von Fibroblasten geeignet (Franke et al., 1987; Green and Kehinde, 1976). Dies könnte genutzt werden, um den Zusammenhang zwischen Vimentin und Lipidspeicherung sowie Lipidmetabolismus zu untersuchen (Franke et al., 1987; Lieber and Evans, 1996; Schweitzer and Evans, 1998). Desweiteren könnte durch die generierten stabilen Zelllinien der Einfluß von Vimentinmutationen auf die Vimentin-Lipid-Interaktion und die Lipidspeicherung analysiert werden.

4.3.4 Erzeugung und Charakterisierung einer Vimentin-defizienten Fibroblastenzelllinie

Nur wenige etablierte Zelllinien, wie z.B. SW-13 und MCF-7 Zellen, exprimieren kein Vimentin. Selbst Zelltypen, die *in vivo* kein Vimentin exprimieren, beginnen in Zellkultur häufig die Vimentinexpression. Eine veränderte Expression in Zellkultur wurde auch für Keratine gezeigt (Franke et al., 1982; Franke et al., 1979). Die Grundlage der veränderten Expression ist nicht geklärt, könnte aber auf fehlende 3D-Interaktionen der Zellen oder auf veränderte Signalwege zwischen verschiedenen Zelltypen im *in vivo* Gewebe zurückzuführen sein.

Um mögliche Effekte von Vimentinmutationen auf die Filamentbildung und Protein-Protein-Interaktionen zu analysieren, sollte ein möglichst natives, Vimentin-freies Zellsystem generiert werden. Vimentin-negative Zellen haben den Vorteil, daß kompensatorische Effekte von endogenem Vimentin ausgeschlossen werden können und so auch Mutationen analysiert werden können, die nicht dominant sind. Ein experimentell leicht zugänglicher und *in vivo* Vimentin-exprimierender Zelltyp sind

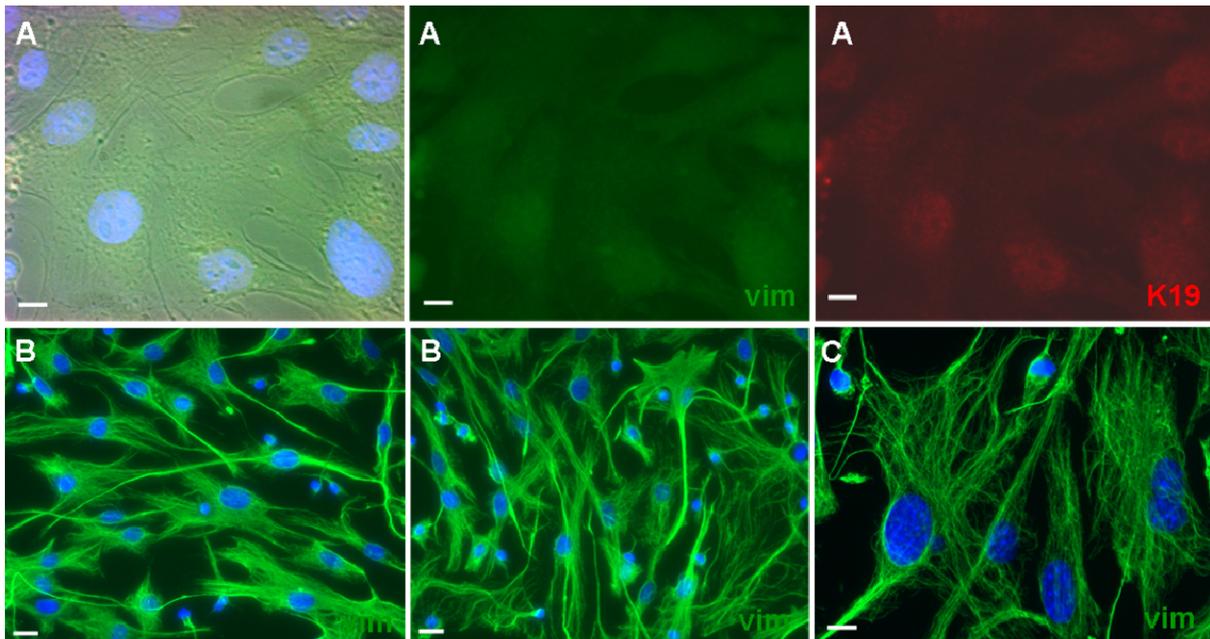


Abb. 4.23: Immunfluoreszenzanalyse von Vimentin und Keratin 19 in wt und vim ko⁻ MEF Zellen. Die Vimentinexpression in MEF Zellen wurde mit einer Immunfluoreszenzreaktion gegen Vimentin (grün) und Keratin 19 (rot) analysiert. (A) vim ko⁻ MEF Zellen exprimieren kein Vimentin und Keratin 19. (B-C) wt MEF Zellen zeigen eine typische Vimentin Verteilung. Maßstabsbalken: A,C) 10 µm, B) 20 µm.

Fibroblasten. Daher wurden aus E14 Embryonen von vim ko⁻ und wt C57Bl/6 Mäusen embryonale Fibroblasten (MEF) Zellen gewonnen. Die Zellen wurden in den ersten 2 Passagen vermehrt und anschließend in Aliquots in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Expression von Vimentin und Keratinen wurde mittels Immunfluoreszenz analysiert und ergab, wie erwartet, extensive Vimentinfilamente im gesamten Zytoplasma von wt MEF Zellen (Abb. 4.23 B,C) und keine Keratinexpression in beiden Zelllinien. Vimentin ko⁻ MEF exprimieren dagegen kein Vimentin (Abb. 4.23 A). Im Vergleich zu wt MEF Zellen konnten im Phasenkontrast keine Unterschiede in der Zellgröße oder Zellmorphologie in Abwesenheit von Vimentin festgestellt werden. Dies impliziert, daß Vimentin in Fibroblasten, ähnlich wie in Vimentin ko⁻ Mäusen (Colucci-Guyon et al., 1994), nicht essentiell für die Integrität der Zellen ist. Es wurde keine induzierte Expression von Keratinen, welche die fehlende Vimentinexpression kompensieren könnten, beobachtet. Die Fähigkeit dieser Zellen zur Aufnahme von Plasmid-DNS wurde mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamin2000 getestet und 2 Tage nach Transfektion wurde die Expression durch Immunfluoreszenz analysiert. Mit dieser Methode konnten nur 10-15 % der Zellen transfiziert werden. Dies sollte mit einem anderen Transfektionsreagenz, wie z.B. FuGENE 6 (persönliche Kommunikation Prof. Dr. H. Herrmann), optimiert werden, da die so erhaltenen Proteinmengen für Immunoblotanalysen zu gering sind.

Somit steht eine neue Vimentin-freie Fibroblastenzelllinie zur Verfügung, die für weitere Experimente genutzt werden kann.

4.3.5 Analyse der Vimentinverteilung innerhalb der Zelle

Vimentinmodifikationen, wie Phosphorylierung oder Glykosylierung, aber auch Interaktion mit Proteinen wie z.B. Chaperonen, führen häufig zu Veränderungen der Filamentstruktur der Zelle (Coulombe and Omary, 2002; Kueper et al., 2007; Sihag et al., 2007). Deshalb wurden mögliche Einflüsse der entdeckten humanen Vimentin-

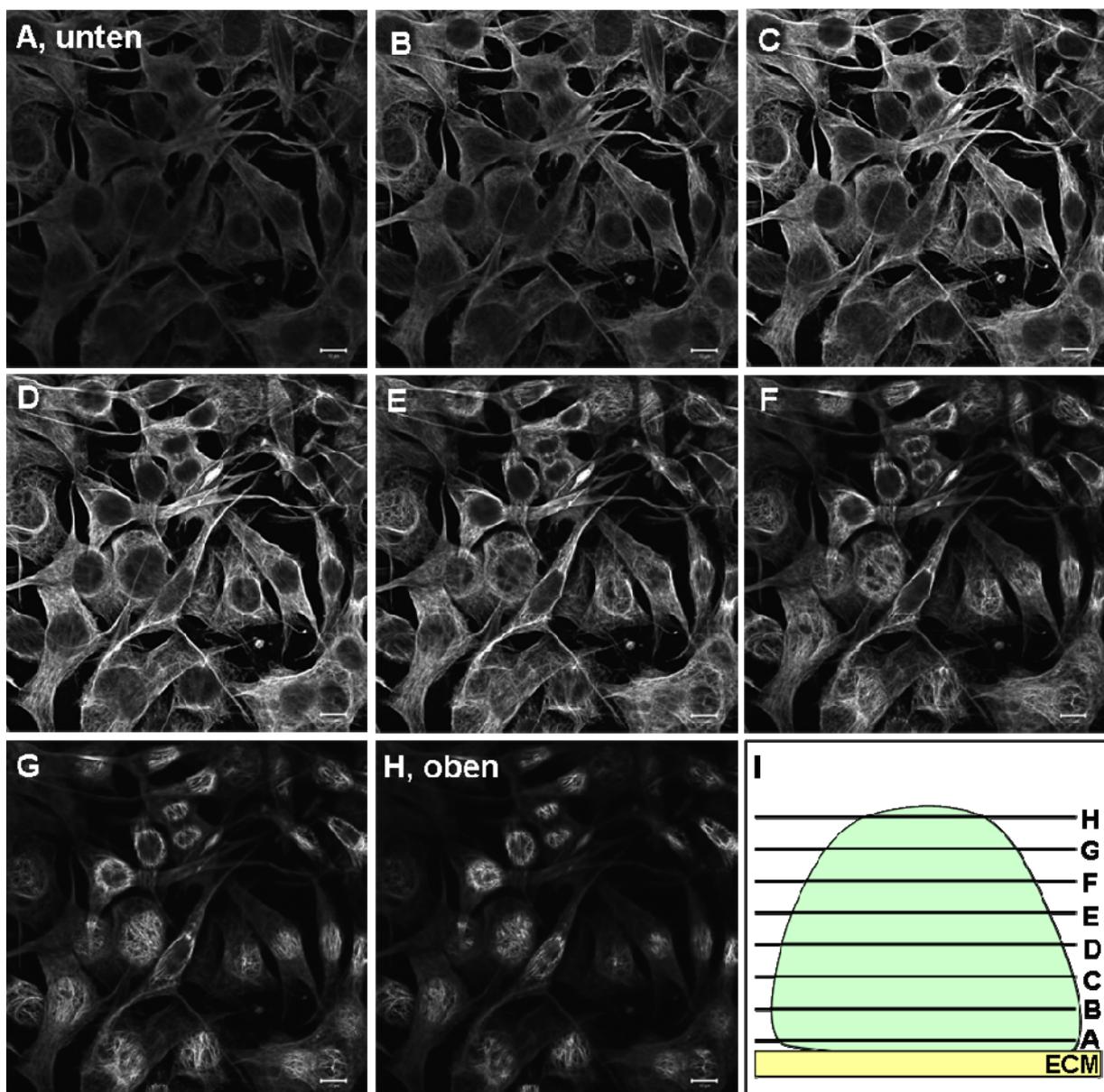


Abb. 4.24: Stapel von α -Vimentin Immunfluoreszenzbildern von 3T3-L1 Zellen.

(A-H) Endogenes Vimentin wurde in Fibroblastenzellen mit einem α -Vimentin Antikörper gefärbt und mit einem konfokalen Mikroskop abgebildet. Vimentin wird im gesamten Zytoplasma exprimiert, nur die Bereiche der Zellkerne enthalten kein Vimentin. (I) Schematische Darstellung der Schnittebenen durch die Zelle. ECM: extrazelluläre Matrix. Schnittstärke: 300 nm. Maßstabsbalken: 10 μ m.

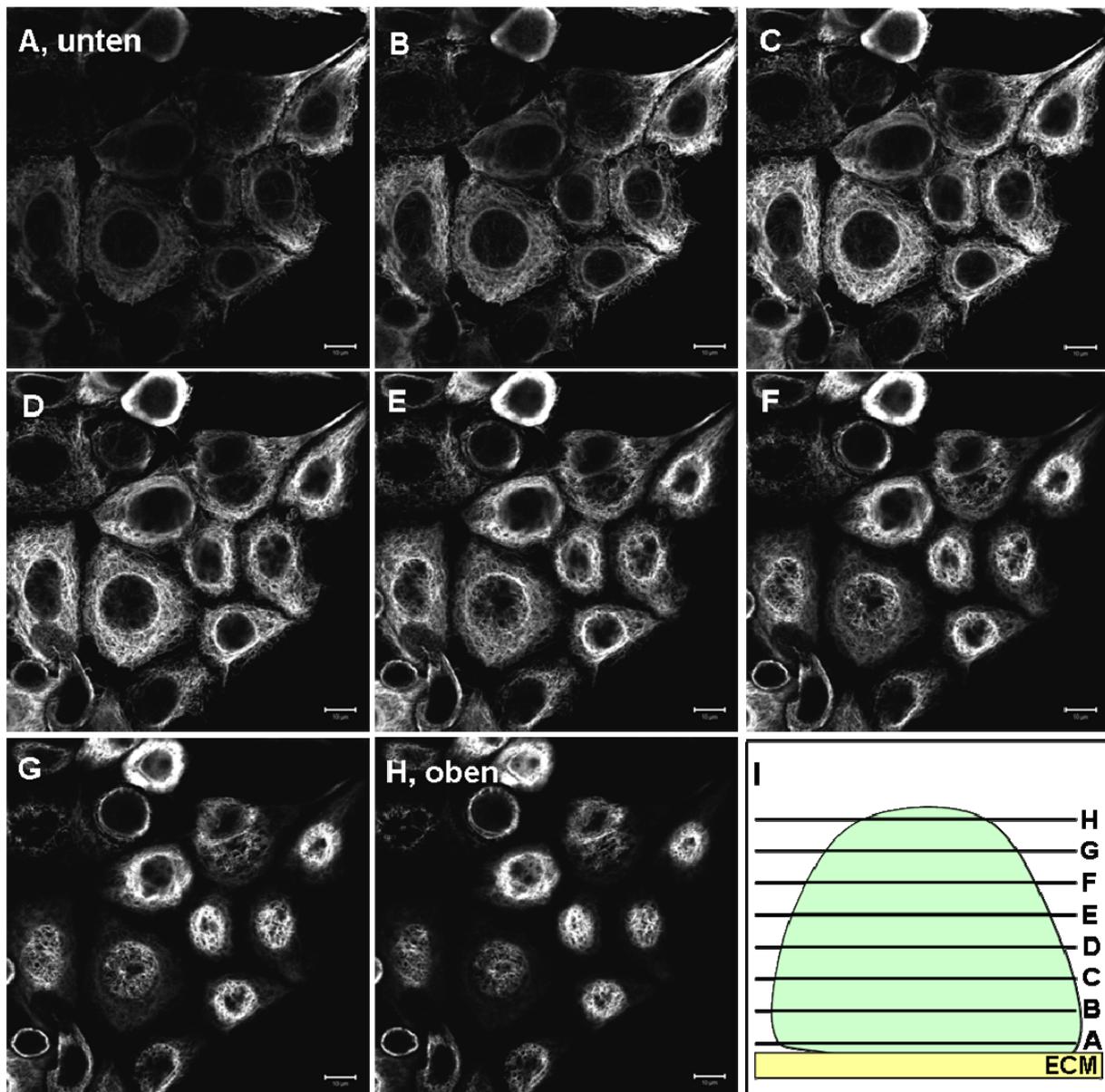


Abb. 4.25: Stapel von α -Vimentin Immunfluoreszenzbildern von MCF-7 Zellen, transient transfiziert mit wt Vimentin.

(A-H) Die Expression von Vimentin in Epithelzellen wurde mit einem α -Vimentin Antikörper analysiert und mit einem konfokalen Mikroskop abgebildet. Vimentin wird im gesamten Zytoplasma exprimiert, nur die Bereiche der Zellkerne enthalten kein Vimentin. Die ektopische Expression von wt Vimentin gleicht der endogenen Vimentinverteilung in Fibroblasten. (I) Schematische Darstellung der Schnittebenen durch die Zelle. ECM: extrazelluläre Matrix. Schnittdicke: 300 nm. Maßstabsbalken: 10 μ m.

punktmutation auf die Vimentinlokalisierung und Organisation innerhalb der Zelle mit Konfokalmikroskopie untersucht. Als wt Kontrolle dienten Vimentin-exprimierende 3T3-L1 Fibroblasten. Immunfluoreszenzfärbungen gegen Vimentin zeigen ein ausgeprägtes Filamentsystem im gesamten Zytoplasma (Abb. 4.24). Vimentin wird in allen Schnittebenen exprimiert, nur die Bereiche des Zellkerns enthalten kein Vimentin. Die Verteilung von E151K Vimentin wurde in MCF-7 Zellen, die kein endogenes Vimentin exprimieren, analysiert, da in Gegenwart von endogenem

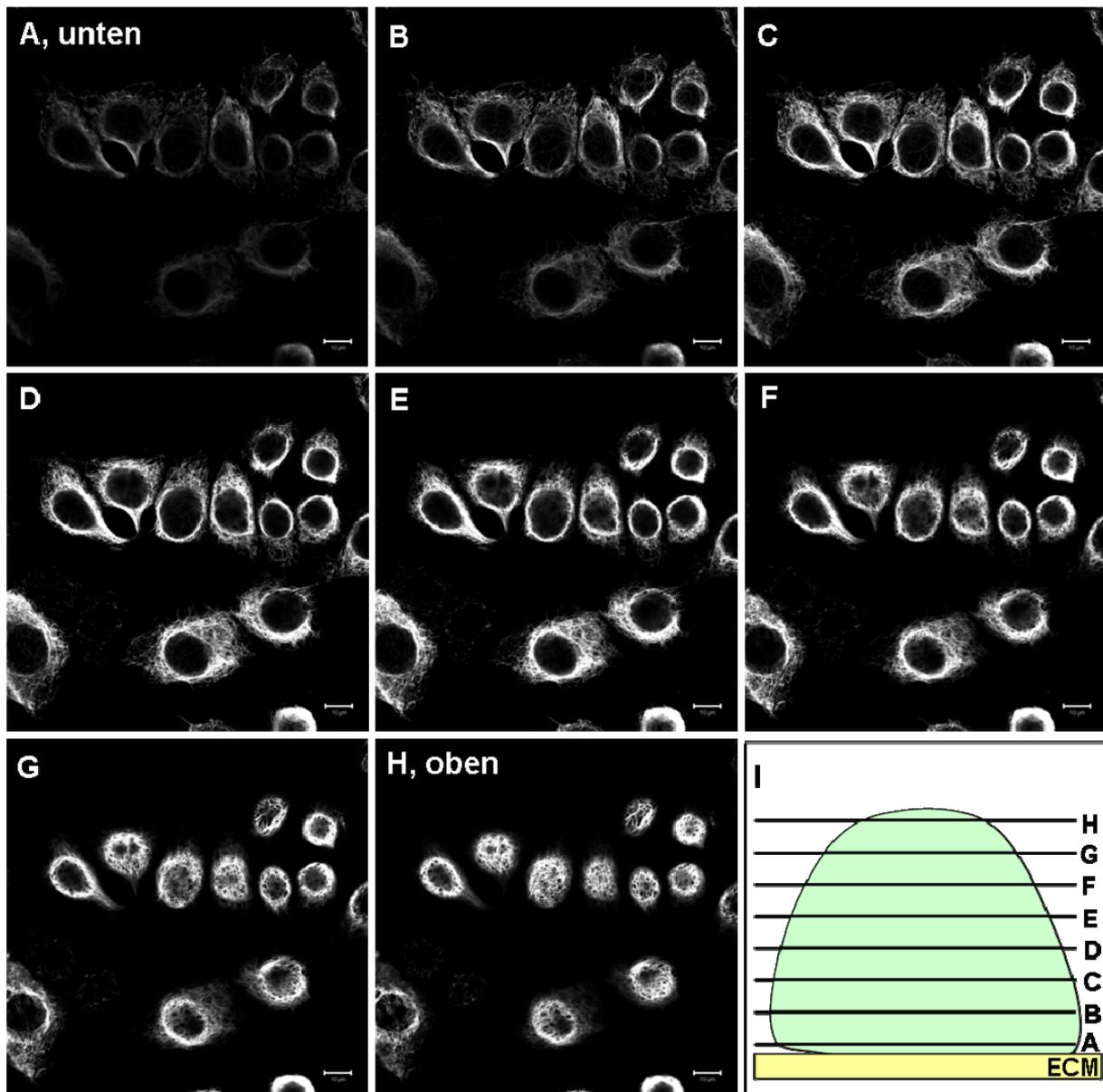


Abb. 4.26: Stapel von α -Vimentin Immunfluoreszenzbildern von MCF-7 Zellen, transient transfiziert mit E151K Vimentin.

(A-H) Die Expression der E151K Vimentinpunktmutation wurde in Epithelzellen mit einem α -Vimentin Antikörper analysiert und mit einem konfokalen Mikroskop abgebildet. Vimentin wird im gesamten Zytoplasma exprimiert, nur die Bereiche der Zellkerne enthalten kein Vimentin. Die ektopische Expression von E151K Vimentin gleicht der endogenen Vimentinverteilung in Fibroblasten. (I) Schematische Darstellung der Schnittebenen durch die Zelle. ECM: extrazelluläre Matrix. Schnittdicke: 300 nm. Maßstabsbalken: 10 μ m.

Vimentin in Fibroblasten der Effekt dieser Mutation nicht sichtbar war (siehe auch 4.3.3.). Als zusätzliche Kontrolle dienten wt Vimentin-transfizierte MCF-7 Zellen. Die ektopische Expression von wt Vimentin in MCF-7 Zellen führt zu einer typischen Verteilung der Vimentinfilamente im Zytoplasma (Abb. 4.25). Diese ist sehr ähnlich der Vimentinverteilung in 3T3-L1 Fibroblasten (Abb. 4.24) und demonstriert die generelle Fähigkeit von MCF-7 Epithelzellen zur Bildung von Vimentinfilamenten. Daher ist diese Epithelzelllinie als Modell für die Analyse der Vimentinfilamentbildung

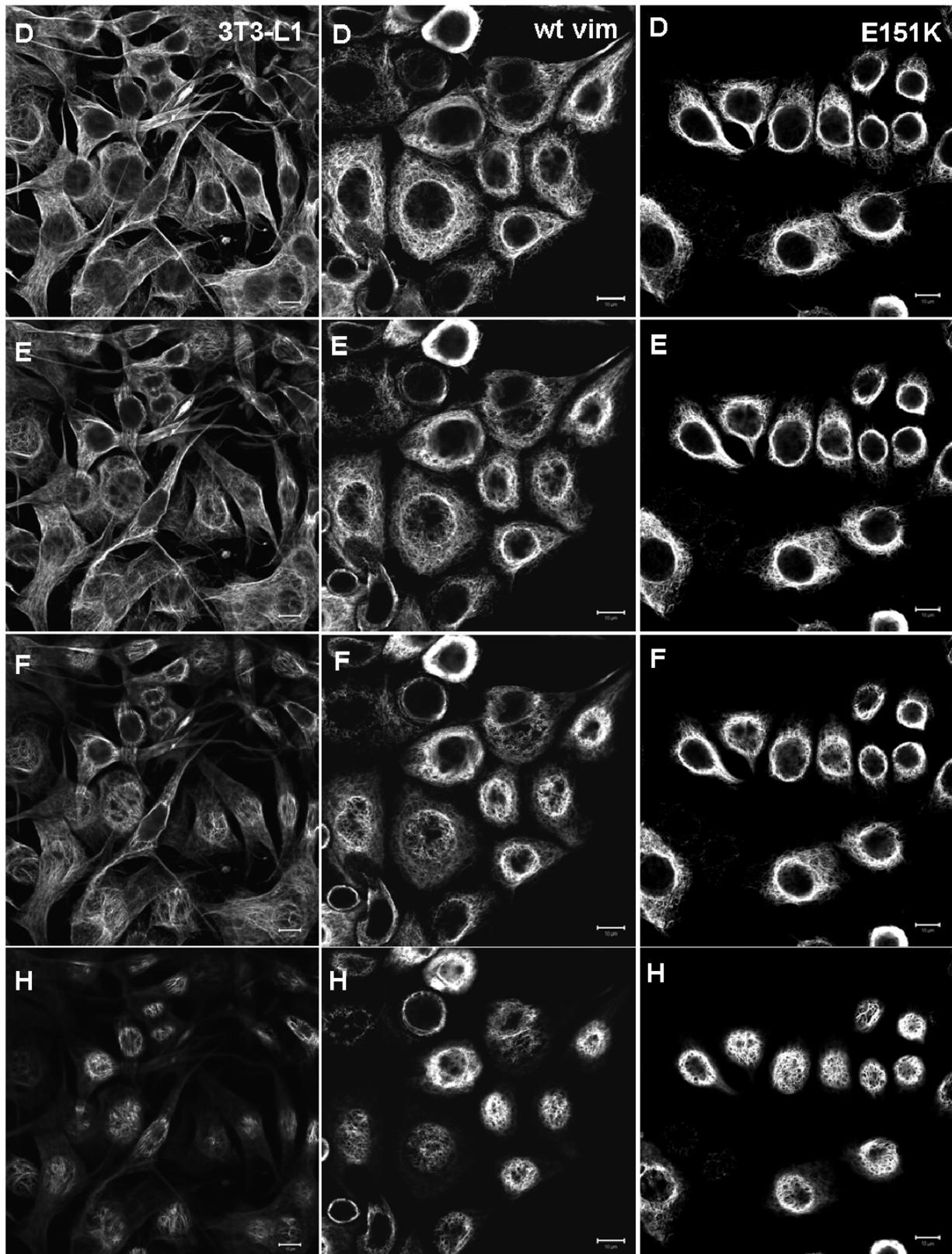


Abb. 4.27: Stapel von α -Vimentin Immunfluoreszenzbildern von 3T3-L1 und MCF-7 Zellen. Zur besseren Vergleichbarkeit sind die Schnittebenen (D-F,H) der Abb. 4.24-4.26 nebeneinander dargestellt. Die Vimentinexpression wurde in Fibroblasten und transient transfizierten Epithelzellen mit einem anti-Vimentin Antikörper analysiert und mit einem konfokalen Mikroskop abgebildet. Vimentin wird im gesamten Zytoplasma exprimiert, nur die Bereiche der Zellkerne enthalten kein Vimentin. Die ektopische Expression von Vimentin gleicht der endogenen Vimentinverteilung in Fibroblasten, allerdings ist Vimentin in MCF-7 Zellen mehr apikal verteilt. Schnittdicke: 300 nm. Maßstabsbalken: 10 μ m.

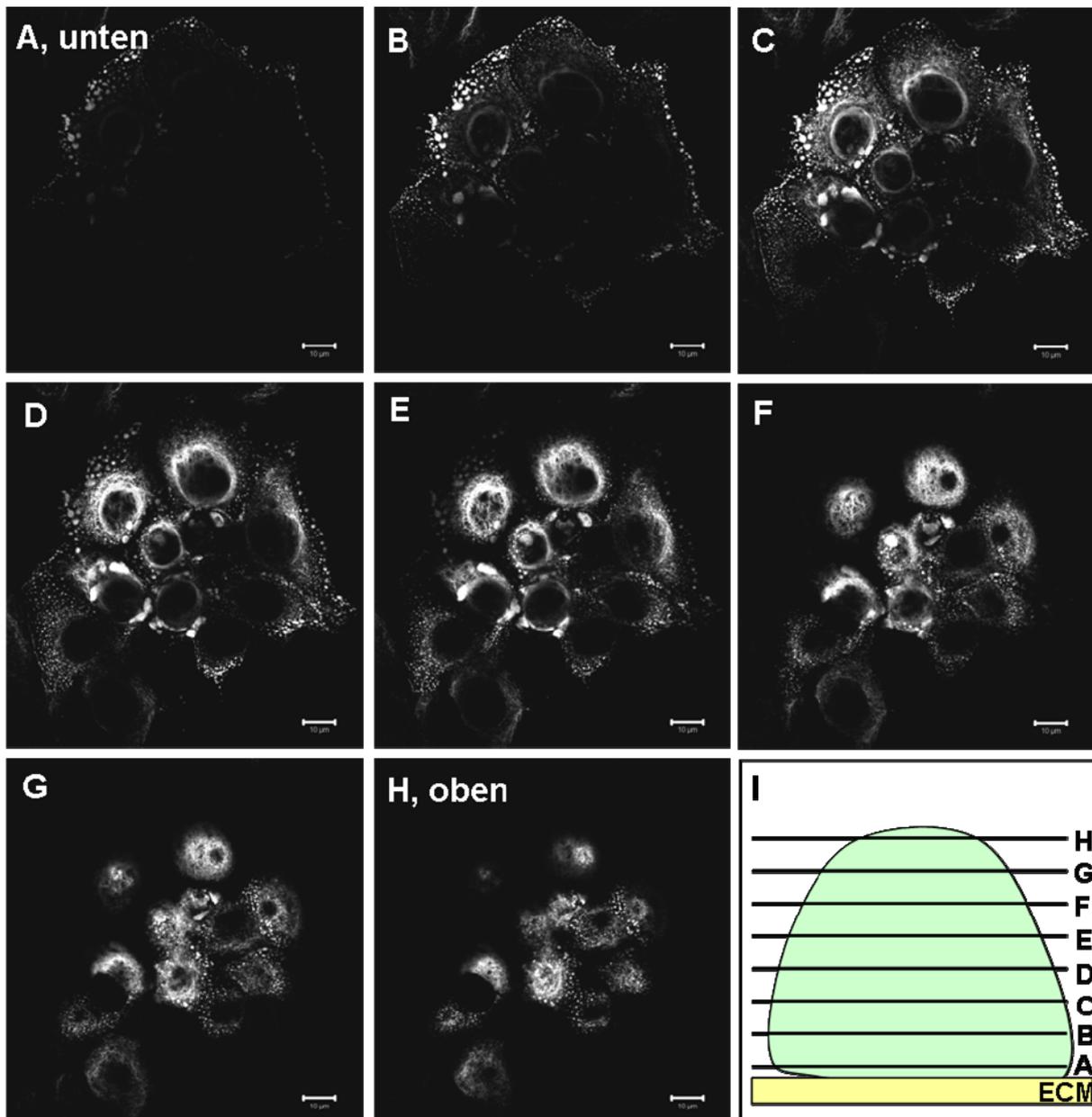


Abb. 4.28: Stapel von α -Vimentin Immunfluoreszenzbildern von MCF-7 Zellen, transient transfiziert mit wt- und R113C Vimentin.

(A-H) Die Expression von Vimentin in Epithelzellen wurde mit einem α -Vimentin und einem α -FLAG Antikörper analysiert und mit einem konfokalen Mikroskop abgebildet. Vimentin wird im gesamten Zytoplasma exprimiert, nur die Bereiche der Zellkerne enthalten kein Vimentin. Die gleichzeitige Expression von wt Vimentin und der dominanten R113C Vimentinpunktmutante im Verhältnis 1:1 verursacht die Bildung von partiellen Filamenten und von massiven zytosolischen Proteinaggregaten. Die Aggregate sind bevorzugt randständig und kommen in allen Schnittebenen vor. Gezeigt ist die Überlagerung der Vimentin und FLAG Färbung. (I) Schematische Darstellung der Schnittebenen durch die Zelle. ECM: extrazelluläre Matrix. Schnittdicke: 300 nm. Maßstabsbalken: 10 μ m.

geeignet. Ähnlich wie wt Vimentin bildet E151K Vimentin im Zytoplasma von MCF-7 Zellen größtenteils Filamente aus (Abb. 4.26). Diese erscheinen aber vor allem in den mittleren Schnittebenen (D-F) mehr membranständig und gebündelt als in wt Zellen. Es wurden auch immer wieder kurze Filamente und Aggregate beobachtet (siehe auch Abb. 4.18). Im Vergleich zu wt Vimentin zeigt E151K Vimentin eine mehr

apikale Verteilung (Abb. 4.26, Schnittebenen F, G), möglicherweise in Verbindung mit sekretorischen Strukturen. In Abb. 4.27 sind ausgewählte Schnittebenen der Fibroblasten und transfizierten Epithelzellen nebeneinander dargestellt, um diese besser vergleichen zu können. Die Vimentinmutation R113C verursacht in MCF-7 Zellen Aggregate im gesamten Zytoplasma und bildet keine Filamente (Abb. 4.18). In einer 1:1 Mischung mit wt Vimentin werden vereinzelt kurze Filamente ausgebildet, überwiegend aggregieren aber beide Proteine (Abb. 4.28). Die R113C Mutante wirkt daher dominant, in Übereinstimmung mit Experimenten in stabil transfizierten Fibroblasten (Abb. 4.21) und (Schietke et al., 2006). In den konfokalen Aufnahmen ist zu erkennen, daß in allen Schnittebenen Aggregate enthalten sind (Abb. 4.28). Besonders ausgeprägt sind die Aggregate in den basalen Schnittebenen A-D.

4.4 Putative Vimentin-Protein-Interaktionen

Wie in 4.1 gezeigt wurde, verursacht die Expression von Vimentinpunktmutanten die Bildung von zytoplasmatischen Aggregaten und führt im Mausmodell zum Katarakt der Linse (Bornheim et al., 2008). Dabei enthalten die Aggregate nicht nur endogenes und transgenes Vimentin, sondern auch Hsp70, Synemin und sehr wahrscheinlich noch weitere Proteine. Daher ist eine mögliche Ursache der Pathologie in der Linse eine gestörte Vimentin-Protein-Interaktion.

Um zu klären, wie Vimentinaggregate einen Katarakt in der Linse verursachen, und somit mehr über den zugrunde liegenden Pathomechanismus zu verstehen, wurde die humane Vimentin Proteinsequenz mit Hilfe von Datenbanken auf Protein-Interaktionsdomänen untersucht. Abb. 4.29 zeigt eine Auswahl der detektierten Vimentin-bindenden Proteine bzw. Proteindomänen sowie schematisch die Lage der Interaktionsmotive im Vimentinmolekül. Enthalten sind dabei Proteine wie z.B. 14-3-3, für die in Zellkulturexperimenten schon eine Interaktion mit Vimentin gezeigt wurde, und auch Vimentin-modifizierende Enzyme wie z.B. PKA (Eriksson et al., 2004; Satoh et al., 2004; Tzivion et al., 2000). Die Datenbanksuche ergab auch ein besonders interessantes und bisher unbekanntes Vimentin-bindendes Protein, den Transkriptionsfaktor Stat3, mit einer einzelnen putativen Bindungsstelle in der 2B-Domäne (Abb. 4.29). Da bisher keine Interaktion von IF-Proteinen mit Signalproteinen, und speziell mit zytosolischen Transkriptionsfaktoren, beschrieben ist, wurde an dieser Stelle auf Stat3 fokussiert. Um die Konservierung der

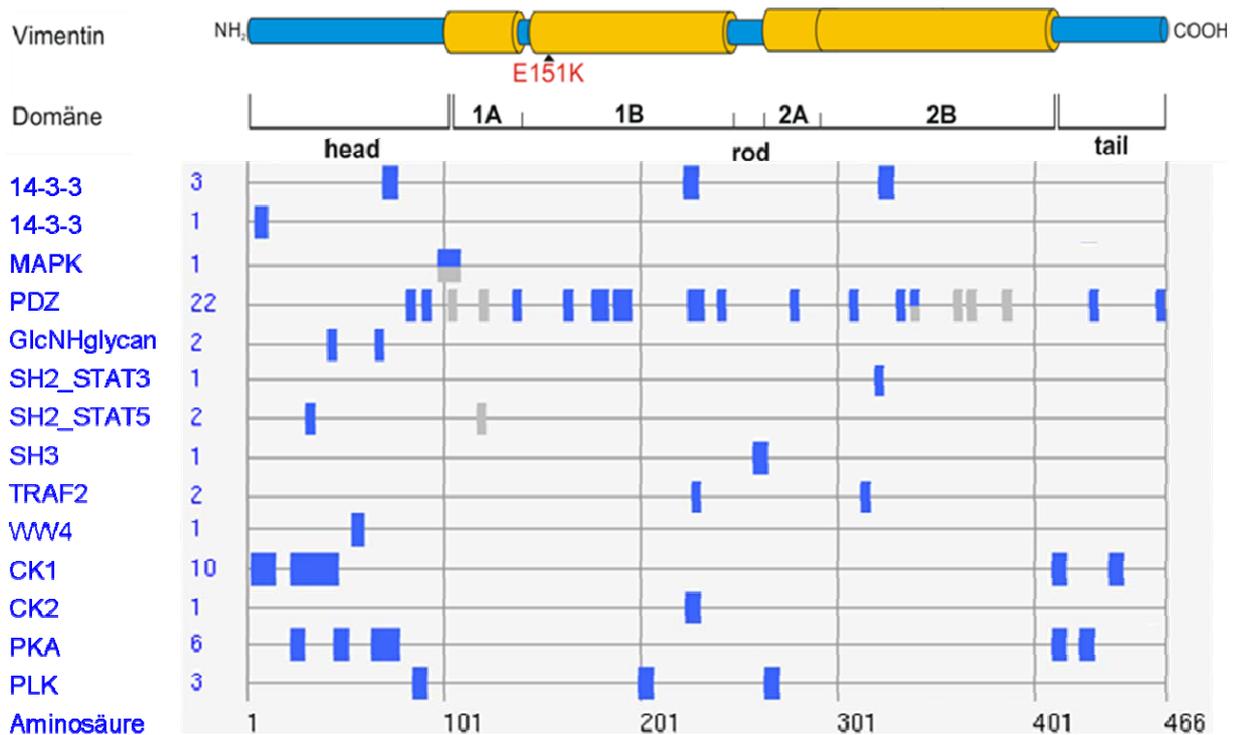


Abb. 4.29: Vorhersage Vimentin-bindender Proteindomänen.

Die humane Vimentin Proteinsequenz wurde mit Algorithmen der ELM Datenbank auf potentielle Proteininteraktionsmotive untersucht. Dargestellt sind die Vimentin Domänen- und Proteinstruktur sowie die Lage und Anzahl der vorhergesagten Proteindomänen.

vorhergesagten Bindungsstelle zu untersuchen, und damit eine potentiell funktionelle Relevanz der Interaktion zu unterstreichen, wurde ein Alignment der bekannten Vimentinproteinsequenzen verschiedener Spezies angefertigt (Abb. 4.31). Dabei zeigt sich eine Konservierung der Stat3-Interaktionsdomäne in der Vimentinproteinsequenz vom Menschen über die Maus bis hin zu Knorpelfischen. Nur im Frosch ist der Tyrosinrest der Stat3-Konsensussequenz (Levy and Darnell, 2002; Stahl et al., 1995) zu Phenylalanin mutiert. Desweiteren wurde die Konservierung der vorhergesagten Stat3-Bindungsstelle in der humanen Typ III IF-Proteinfamilie untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die Bindungsstelle nicht nur in humanem Vimentin sondern auch in GFAP, dem IF-Protein in Gliazellen, und dem Muskel-IF Protein Desmin konserviert ist (Abb. 4.30). Die weite Konservierung, sowohl innerhalb der humanen Typ III IF-Proteine als auch zwischen den Vimentinsequenzen unterschiedlicher Spezies, spricht für eine physiologische Bedeutung der potentiellen Vimentin-Stat3-Interaktion oder auch für eine strukturelle Bedeutung dieser Sequenz.

Um die potentielle Vimentin-Stat3-Interaktion in Zellkultur zu untersuchen, wurden Stat3 und ein Plasmid, das die humane Vimentin 2B-Domäne kodiert, in MCF-7

GFAP	-----MERRRITSAARRSYVSSGEMM
Vimentin	----MSTRSVSSSSYRNMFGGEGTASRPSSSSRSYVTTSTRYSLGSALRPTSRSLYAS
Desmin	MSQAYSSSQRVSSYRRTFGGAPCFPLGSPLSSPVFPRAGFGSKGSSSVTSRVYQVSRFS
Peripherin	-----MSHHPGSLRAGFSSTSYRRTFGPPPSLSPGAFSYSSSRFSSSRLLGSA
GFAP	VGGLAPGRRLGPGTRLSLARMPPPLPTRVDFSLAGALNAGFKETRASERAEMMELNDRFA
Vimentin	SPGGVYATRSSAVRLRSVPGVRLQLQDSVDFSLADAINTEPKNRTNEKVELQELNDRFA
Desmin	GGAGGLGSLRASRLGTTTPSSYGAGELLDPSLADAVNQEFLTRTNEKVELQELNDRFA
Peripherin	SPSSSVRLGSPRS PRAGAGALLRPSERLDFSNAEALNQEFLATRSNEKQELQELNDRFA
	R113C
GFAP	SYIEKVRFLQEQNKALAAELNQLRAKEPTKLADVYQAELELRLRLDQLTANSARLEVER
Vimentin	NYIDKVRFLQEQNKILLAELEQLKGGKSRGLDLYEEMRELRRQVDQLTNDKARVEVER
Desmin	NYIEKVRFLQEQNAALAAEVNRLKGREPTRVAELYEELRELRRQVEVLTNQRARVQVER
Peripherin	NFIEKVRFLQEQNAALRGELSQARGQEPARADQLCQELRELRFRELLGRRERDRVQVER
	STAT5 E151K
GFAP	DNLAQDLATVRQKLQDETMLRLEAENNLAAAYRQEADEATLARLDLERKIESLEEIEIRFLR
Vimentin	DNLAEDIMRLREKLQEQNLQREAEENTLQSPRQVDNASLARLDLERKVESLQEEIAFLK
Desmin	DNLLDDLQRLKAKLQEEIQLKEEAENLAAPRADVDAATLARIDLERRIESLNEIEIAFLK
Peripherin	DGLAEDLAALKQRLQEEETRKREDAEHNLVLFKRDVDDATLSRLELERKIESLNDEIEFLK
	TRAF2
GFAP	KIHHEEVRELQEQLARQQVHVLDVA--KPDLTAAALKEIRTQYEAASSNMHEAEENYRS
Vimentin	KLHEEEIQELQEQIQEQVQIDVDVS--KPDLTAAALRDVRRQYVESVAANKLQEAENYKS
Desmin	KVHEEEIRELQEQEQEQVQVENDMS--KPDLTAAALD IRAQYETIAAKNISAEENYKS
Peripherin	KLHEEELRDLQVSVESQQVQVQVEVATVKPELTAALRD IRAQYESIAAKNISAEENYKS
GFAP	KFADLTDAARNMAELLRQAKHEANDYRRQLQSLTCDLES LRGTNESLERQMRQEERHVR
Vimentin	KFADLSEAMRNNDALRQAKQESTYRQRQVQSLTCEVDALKGTTNESLERQMRMEENFAV
Desmin	KVSDLTQAANKMNDALRQAKQEMMEYRHQIQSYTCEIDALKGTTNDSLMRQMRLEDRFAS
Peripherin	KYADLSDAARNHEALRQAKQEMNESRRQIQSLTCEVDGLRGTNEALLRQLRELEEQFAL
	TRAF2 STAT3
GFAP	EAASYQEARLQEEGGSLKDEMARHLQEQDLLNVKALDIEIATYRKLLEGEENRITI
Vimentin	EAANYQDTIGRLQEQIQNMKEEMARHLREYQDLLNVKALDIEIATYRKLLEGEESRISL
Desmin	EASGYQDNARLEEEIRHLKDEMARHLREYQDLLNVKALDVEIATYRKLLEGEESRINL
Peripherin	EAGGYQAGAARLEELRQLKEEMARHLREYQELLNVKALDIEIATYRKLLEGEESRISV
GFAP	PVQTFSNLQIRETSLDTKSVSEGHKRNIVKTVEMRQGEVIKESKQEHKDMV-----
Vimentin	PLPMFSSIMLRETNLDSLPLVDTHSKRTLLIKTVETRDGQVINETSQHDDLE-----
Desmin	PIQTYSALNFRETSPEQR-GSEVHTKTKVMIKTIETRDGEVWSEATQQQHEVL-----
Peripherin	PVHSFASLNKTTVPEVEPPQDSSHRSKTVLKIETIRNGEVVTSQEQRSSELDKSSAHS

Abb. 4.30: Alignment der Aminosäuresequenzen der menschlichen Typ III IF-Proteine.

Schwarz unterlegt sind die einzelnen Bereiche (1A, 1B, 2A, 2B) der rod-Domäne. Die potentiellen Interaktionsstellen und die Lage der Vimentin Punktmutationen sind farbig markiert.

Zellen transfiziert. Die 2B-Domäne wurde anstatt des kompletten Vimentinkonstruktes verwendet, da die vorhergesagte Stat3-Bindungsstelle in diesem Bereich des Vimentinmoleküls liegt (Abb. 4.29) und dadurch die Lokalisation einer möglichen Interaktionsstelle eingegrenzt werden sollte. Die Expression und Lokalisation beider Proteine wurde mit Immunfluoreszenz analysiert. Es zeigte sich in 60 % der Zellen eine partielle Kolokalisation im Zytoplasma (Abb. 4.32). Beide Proteine liegen dabei in kleinen Partikeln und auch in großen Aggregaten im gesamten Zytoplasma vor. Die Vimentin 2B-Domäne kann in MCF-7 Zellen ohne endogenes Vimentin keine Filamente ausbilden. Stattdessen bilden sich kurze, diffus erscheinende Vimentinpartikel sowie zytoplasmatische Aggregate (Abb. 4.33).

Mensch	---MSTRS-VSSSYRRMFGGPGTASRPSSSRSYVTTSTRYSLGSLALRPSSTRSLYA-S	55	Mensch	KLHEEIIQELQAIQIQEQHVQIDVDVSKPDLTAALRDVRCQYVESVAAKNLQEAEEWYKSKF	295
Chimpanse	---MSIRS-VSSSYRRMFGGPGTASRPSSSRSYVTTSTRYSLGSLALRPSSTRSLYA-S	55	Chimpanse	KLHEEIIQELQAIQIQEQHVQIDVDVSKPDLTAALRDVRCQYVESVAAKNLQEAEEWYKSKF	295
Rind	---MSTRS-VSSSYRRMFGGPGTASRPSSTRS YVTTSTRYSLGSLALRPTSTRLYT-S	55	Rind	KLHDAEIQELQAIQIQEQHVQIDVDVSKPDLTAALRDVRCQYVESVAAKNLQEAEEWYKSKF	295
Maus	---MSTRS-VSSSYRRMFGGPGTASRPSSTRS YVTTSTRYSLGSLALRPSSTRSLY-S	55	Maus	KLHDEEIQELQAIQIQEQHVQIDVDVSKPDLTAALRDVRCQYVESVAAKNLQEAEEWYKSKF	295
Huhn	---MSFTS-SKNSSYRRMFGG---GSRPSSTRYITSSSTR-YSLGSLALRPSSTR-YVS-A	50	Huhn	KLHDEEIRELQAIQIQEQHVQIDVDVSKPDLTAALRDVRCQYVESVAAKNLQEAEEWYKSKF	289
Frosch	-----MA-TTKSSYRRIFGG---NPRSSSGNRYATSSSTR-YTLGSAAMRPSSTRSMVYS-T	49	Frosch	KLHDEEIRELQAIQIQEQHVQIDVDVSKPDLTAALRDVRCQYVESVAAKNLQEAEEWYKSKF	283
Zitterrochen	---MEKGYKMRSSVYRNMFAEK----FVRVSSIRRSYTAGRNFGQSLIIPSSSSRSRVS--	52	Zitterrochen	KLHEEIIELQAIQIRDSQFKVEMDVVRPDLTAALQDVRSDFKLASKNIAETEEELYKSKL	289
Hai	-----MSTSTSYRRMFAEA----FFQRASSSSRYATRQQPR---IVSVSRTSY-S	44	Hai	KLHEEIRELQAIQIQDSQMKVEMDVARPDLSSALHEVRSQDFKLAASKNIAETEEELYKSKL	281
Goldfisch	---MSSR--TSTSYKRMFGAE----RQ--AMVRSYSSR--QYSSPGRTTS-RVSYSSA	46	Goldfisch	KLHDEELAEIQAIQIQEQHVQIDMEVAKPDLTAALRDVRCQYETLASRNLQESSEWYKSKF	281
Zebrafisch	---MASR--TSTSYKRMFGGE----RP--AAARSTSSR--QYSSFVRVSSSRTSYN-Y	46	Zebrafisch	KLHDEELAEIQAIQIQEQHVQIDMEVAKPDLTAALRDVRCQYETLASRNLQESSEWYKSKF	286
Forelle	MNRTTSRQPTSSSSYKRMFGGEG---RPSVGMARSTLSSR--QYSSFVRSR--MSYS--	51	Forelle	KLHDEEVAELQAIQIQEQHVQIDMEVAKPDLTAALRDVRCQYETLASRNLQESSEWYKSKF	291
Mensch	SPGGVYATRSSAVRLRSVFGVRLQDSVDFSLADAINTEFKNTRTNEKVELQELNDFFA	115	Mensch	ADLSEAAANRNDALRQAKQESTEYRRQVQSLTCEVDALKGTNESLERQMRMEENFAVEA	355
Chimpanse	SPGGVYATRSSAVRLRSVFGVRLQDSVDFSLADAINTEFKNTRTNEKVELQELNDFFA	115	Chimpanse	ADLSEAAANRNDALRQAKQESTEYRRQVQSP TCEVDALKGTNESLERQMRMEENFAVEA	355
Rind	SPGGVYATRSSAVRLRSVFGVRLQDSVDFSLADAINTEFKNTRTNEKVELQELNDFFA	115	Rind	ADLSEAAANRNDALRQAKQESNEYRRQVQTLTCEVDALKGTNESLERQMRMEENFAVEA	355
Maus	SPGGAVYTRSSAVRLRSVFGVRLQDSVDFSLADAINTEFKNTRTNEKVELQELNDFFA	115	Maus	ADLSEAAANRNDALRQAKQESNEYRRQVQSLTCEVDALKGTNESLERQMRMEENFAVEA	355
Huhn	SPGGVYRTKATSVRLRSVMPFMR-MHDAVDFTLADAINTEFKANRTNEKVELQELNDFFA	109	Huhn	ADLSEAAANRNDALRQAKQESNEYRRQIQSLTCEVDALKGTNESLERQMRMEENFAVEA	349
Frosch	SSS-PAVFKSSVRLRSVLPFAR-MADSVDFALADAVNLEFKANRTNEKAEMIE-NDFFA	106	Frosch	ADLSEAAANRNDALRQAKQESDFRRQIQTLTCEIDAMKGSNESYE-QMRMEENFAVEA	342
Zitterrochen	---YVTPISRSVRLVRSVAPVSSSNLDFTLVDAMNSEFKVNRTEKAEMIELNDFLA	109	Zitterrochen	ADITDSASRNDALRLAKQENNEYRRQVQSLTCEIDALKGTNESLERQMDVEDRYNMET	349
Hai	---QPSMIKRRSVRVNRSAPGLAMGNSLNFSLVDAMNSEFKVNRSEKAEMIELNDFLA	101	Hai	ADVDSVSRNNDSLRTAKQENGEYRRQIQTLTCDIDALKGTNESLERQMRMEERYIVEA	341
Goldfisch	SSTSPSLYMSKARSAT-----RLATETLDFGLADAINTEFKANRTNEKAEMQHVNDFFA	101	Goldfisch	ADLSEAAATRSNBAVRLAKHEANDYRRQLQSLTCDLEALRGTNESLERQMRMEDNFSIEA	341
Zebrafisch	SSAPPVSYASKGLRVRSGAELPRLATD TLDFGLAEAINTEFKANRTNEKAEMQHLNDFFA	106	Zebrafisch	ADLSEAAARNNEAIRLAKQEANERYRRQLQAL TCDLEALRGTNESLERQMRLEDSFSMEA	346
Forelle	VSAPPSIYASKNVRRLRSBAEMFRLSSD TVDFALSDAINSEFKANRTNEKAEMQHLNDFFA	111	Forelle	ADLSEAAANRNTDAIRQAKQEANERYRRQVQAL TCEVDSLKGTNESMERQMRLEESFGCEA	351
Mensch	NYIDKVRFLBQGNKILLAELEQLKGGKSRGLGDLYEEMRELRRQVDQLTNDKARVEVER	175	Mensch	ANYQDTIGRLQDEIQMKKEEMARHLREYQDL LNVKALDIEIATYRKLLGEESSRISLPL	415
Chimpanse	NYIDKVRFLBQGNKILLAELEQLKGGKSRGLGDLYEEMRELRRQVDQLTNDKARVEVER	175	Chimpanse	ANYQDTIGRLQDEIQMKKEEMARHLREYQDL LNVKALDIEIATYRKLLGEESSRISLPL	415
Rind	NYIDKVRFLBQGNKILLAELEQLKGGKSRGLGDLYEEMRELRRQVDQLTNDKARVEVER	175	Rind	ANYQDTIGRLQDEIQMKKEEMARHLREYQDL LNVKMA-DIEIATYRKLLGEESSRISLPL	414
Maus	NYIDKVRFLBQGNKILLAELEQLKGGKSRGLGDLYEEMRELRRQVDQLTNDKARVEVER	175	Maus	ANYQDTIGRLQDEIQMKKEEMARHLREYQDL LNVKALDIEIATYRKLLGEESSRISLPL	415
Huhn	NYIDKVRFLBQGNKILLAELEQLKGGKSRGLGDLYEEMRDVRRQVDQLTNDKARVEVER	169	Huhn	ANYQDTIGRLQDEIQMKKEEMARHLREYQDL LNVKALDIEIATYRKLLGEESSRINMPI	409
Frosch	NFIDKVRFLBQGNKILLVAELEQLKGGKTSRIGDLYEEMRELRRQVDQATND-ARVEVDR	165	Frosch	ANYQDTIGRLQDEIQMKKEEMARHLREYQDL LNVKALDIEIAT-RKLLGEESSRISLPL	401
Zitterrochen	NFLDKVRSLBQGNKMLLAELEQVKGKSPKIGDLYEELRELRLQIDQISNEKS RVEVER	169	Zitterrochen	TNAQDTISHLEDEISHLKDEMTRHLQEQEL LTVKALDVEIATYRKLLGEEENRISLPL	409
Hai	NFLDKVRSLBQGNKMLLAELEQVKGKSPKIGDLYEELRELRLQIDQANNES RVEVER	161	Hai	NNAQDTIGHLEDDIGNLKDDEMARHLQEQEL LTVKALDIEIATYRKLLGEESSRISLPL	401
Goldfisch	SYIEBVRFLBQGNKILLAELEQMRGKSSRVGDLYEEMRELRRQVDQLINEKASVEVDR	161	Goldfisch	SGYQDTIVRLEDDIRNPKDEMARHLREYQDL LNVKALDIEIATYRNLLGEEERYITTFP	401
Zebrafisch	SYIDKVRFLBQGNKILLAELEQLGKGS RVGDLYEEMRELRRQVDQLTGKESRVEVDR	166	Zebrafisch	SGYQDTIGRLEDDIRNPKDEMARHLREYQDL LNVKALDIEIATYRKLLGEESSRITSPF	406
Forelle	SYIDKVRFLBQGNKILLAELEQLKGGKSRIGDLYEEMRDVRRQVDQLTNEKAHVEVDR	171	Forelle	NNFQDTISRLEDDIRNPKDEMARHLREYQDL LNVKALDIEIATYRKLLGEESSRITTFM	411
Mensch	DNLAEDIMRLREKLQEEMLQREEAENTLQSFQDQVDNASLARLDLERRKVESLQEEI AFLK	235	Mensch	PNFSSLNLRRETNLDSLPVDTHSKRTLLIKTVETRDGQVINETSQHDDLE	466
Chimpanse	DNLAEDIMRLREKLQEEMLQREEAENTLQSFQDQVDNASLARLDLERRKVESLQEEI AFLK	235	Chimpanse	PNFSSLNLRRETNLDSLPVDTHSKRTLLIKTVETRDGQVINETSQHDDLE	466
Rind	HNLAEDIMRLREKLQEEMLQREEAESTLQSFQDQVDNASLARLDLERRKVESLQEEI AFLK	235	Rind	PNFSSLNLRRETNLDSLPVDTHSKRTLLIKTVETR-GQVINETSQHDDLE	464
Maus	DNLAEDIMRLREKLQEEMLQREEAESTLQSFQDQVDNASLARLDLERRKVESLQEEI AFLK	235	Maus	PTFSSLNLRRETNLDSLPVDTHSKRTLLIKTVETRDGQVINETSQHDDLE	466
Huhn	DNLAEDIMRLREKLQEEMLQREEAESTLQSFQDQVDNASLAGLDLERRFVESLQEEI VFLK	229	Huhn	PTFASLNLRRETNIESQPIVDTHSKRTLLIKTVETRDGQVINETSQHDDLE	460
Frosch	DNLAEDIMRLREKLQDEMIQREEAENTLQSFQDQVDNASLARLDLERRKVESLQEEI AFLK	224	Frosch	HSFSSLNLRRETNLDSHP-AETHSKRTVLLIKTVETRDGQVINE-SQHDDLE	450
Zitterrochen	DNLAEDIMRLREKLQDEMIQREDAENLAARFQDQVDDACLARLDLERRKVESLQEEI MFLK	229	Zitterrochen	PSFGMSLS DAMFEQPPFNRTSSKKKIVIKTVETS GGDDVSETTQKIED--	458
Hai	DNLAEDIMRLREKLQDEMIQREEAENLAARFQDQVDDACLARLDLERRKVESLQEEI MFLK	221	Hai	VSFGSLSLSDAMYEQOPTDVHMSRKNVLIKTIESRGGD IISETTQRIED--	450
Goldfisch	DNLAEDIMRLREKLQDEMIQREDAENSLRSFRQDQVDNASLARLDLERRKVESLQEEI AFLK	221	Goldfisch	PNLSSLSLRESMKEIRPAMDSLSKK-VVIKTETRDGHINQSTQK-DNLE	450
Zebrafisch	DNLAEDIMRLREKLQDEMIQREDAENSLRSFRQDQVDNASLARLDLERRKVESLQEEI AFLK	226	Zebrafisch	PNFSSLSLRESMKEIRPAMDSLSKK-VVIKTETRDGHINQSTQK-EDLE	455
Forelle	DNLAEDIMRLREKLQDEMIQREDAENSLRSFRQDQVDNASLARLDLERRKVESLQEEI AFLK	231	Forelle	PNFSSPNLRESMKEIRPAMDSLSKK-VVIKTETRDGHINQSTQK-EDLE	461

Abb. 4.31: Alignment der Vimentin-Aminosäuresequenzen verschiedener Spezies. Gelb unterlegt sind die potentiellen Stat3 und Stat5-bindenden Regionen. Der Tyrosinrest wird dabei entsprechend phosphoryliert. Die Lage der Punktmutationen ist rot markiert. Schwarz unterlegt sind die 1A, 1B, 2A und 2B Regionen der 'rod'-Domäne. Zahlen markieren die Aminosäureposition in den entsprechenden Spezies.

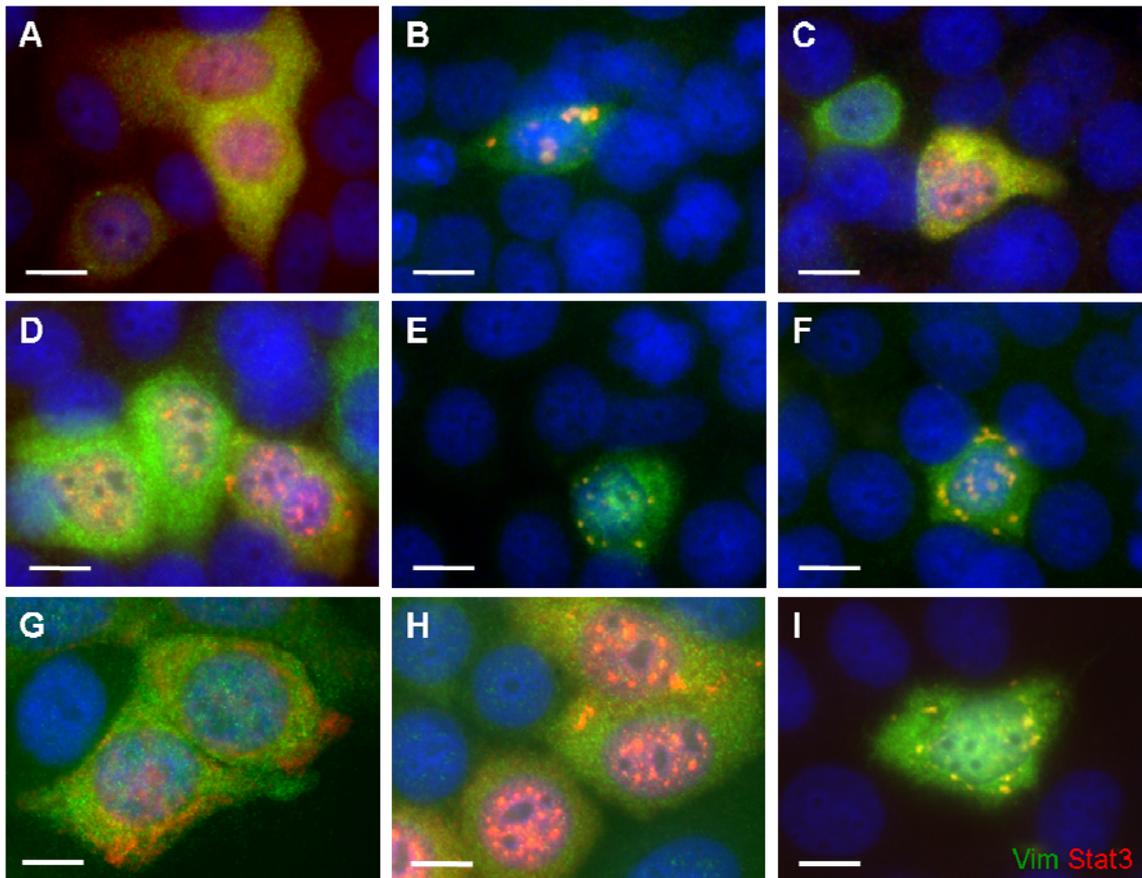


Abb. 4.32: Immunfluoreszenzanalyse der Vimentin 2B-Domäne und Stat3 in MCF-7 Zellen. (A-I) Die Expression der Vimentin 2B-Domäne in transient transfizierten MCF-7 Zellen wurde mit einer Immunfluoreszenzreaktion gegen Vimentin (grün) und HA-Stat3 (rot) analysiert. Stat3 und die Vimentin 2B-Domäne zeigen eine partielle Kolokalisation im Zytoplasma. Maßstabsbalken: 10 μm .

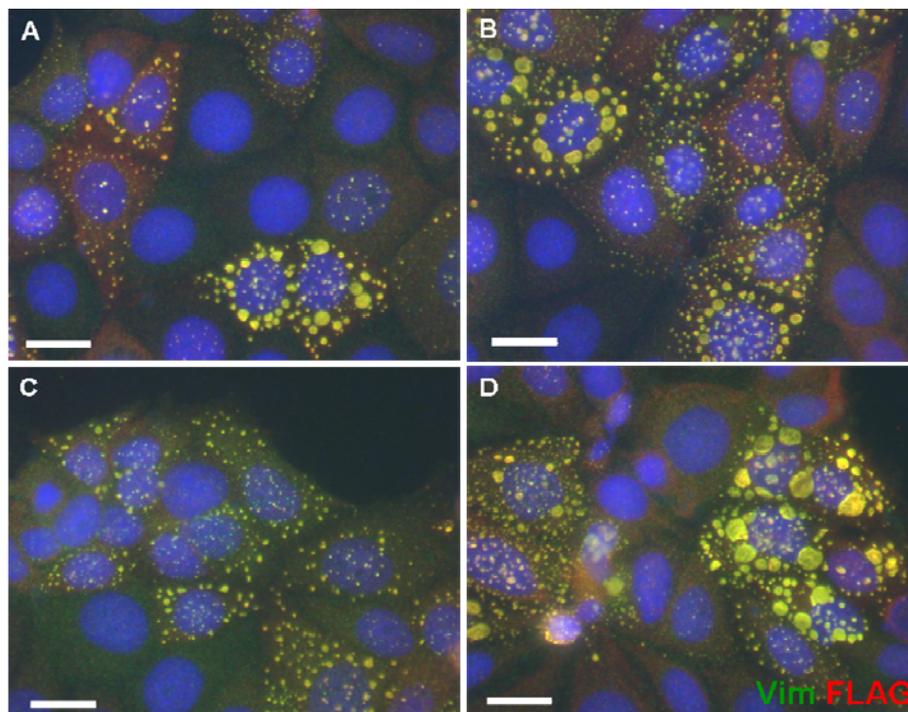


Abb. 4.33: Immunfluoreszenzanalyse der Vimentin 2B-Domäne in MCF-7 Zellen. (A-D) Die transiente Expression der Vimentin 2B-Domäne in MCF-7 Zellen wurde mit einer Immunfluoreszenzreaktion gegen Vimentin (grün) und FLAG (rot) analysiert. Die Vimentin 2B-Domäne zeigt eine Verteilung sowohl diffus im Zytoplasma als auch in Aggregaten. Maßstabsbalken: 20 μm .

Im Vimentin Mausmodell manifestiert sich trotz Proteinaggregaten in allen Vimentin-exprimierenden Geweben nur im Auge ein Phänotyp (4.1). Es war bekannt, daß in den Epithelzellen der Linse GFAP, neben Vimentin ein weiteres Typ III IF-Protein, exprimiert wird und daß GFAP ein Stat3-reguliertes Gen ist (Hatfield et al., 1984; Herrmann et al., 2008; Sriram et al., 2004). Außerdem wurde in Vimentin und GFAP 'knock-out'-Mäusen ein Zusammenspiel von Vimentin und GFAP, speziell unter Streß und bei Verletzung des ZNS, beschrieben (Pekny and Lane, 2007). Deshalb wurde in der Arbeit von R. Meier-Bornheim ein potentieller Einfluß der

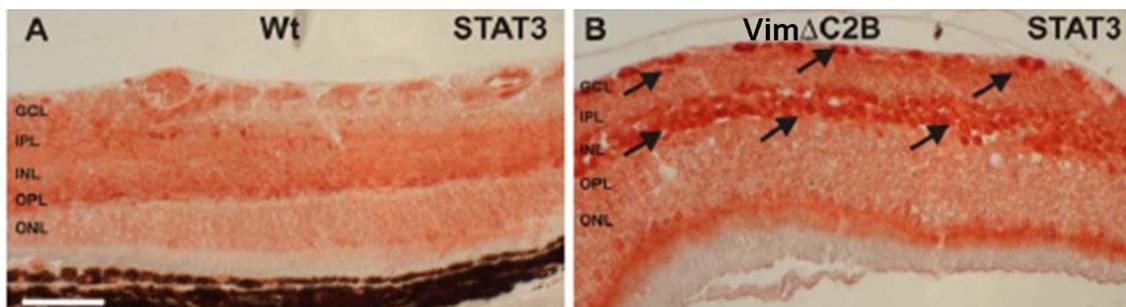


Abb. 4.34: Immunhistochemische Detektion von Stat3 in der Retina transgener Mäuse. (A-B) Die Stat3-Expression in der Retina wurde mit einer Immunfluoreszenzreaktion analysiert. Der Nachweis erfolgt über das AEC-Cromagen, welches in einen roten Niederschlag resultiert. (A) vim wt Maus. (B) Vim Δ C2B Maus. (A) zeigt eine geringe zytoplasmatische Verteilung von Stat3 in der Retina von vim wt Mäusen. (B) deutlich ist die starke Aktivierung mit einhergehender Lokalisation von Stat3 in den Zellkernen von Müller-Zellen und Astrozyten zu erkennen (Pfeile). Maßstabsbalken: 50 μ m. Adaptiert nach (Meier-Bornheim, 2006).

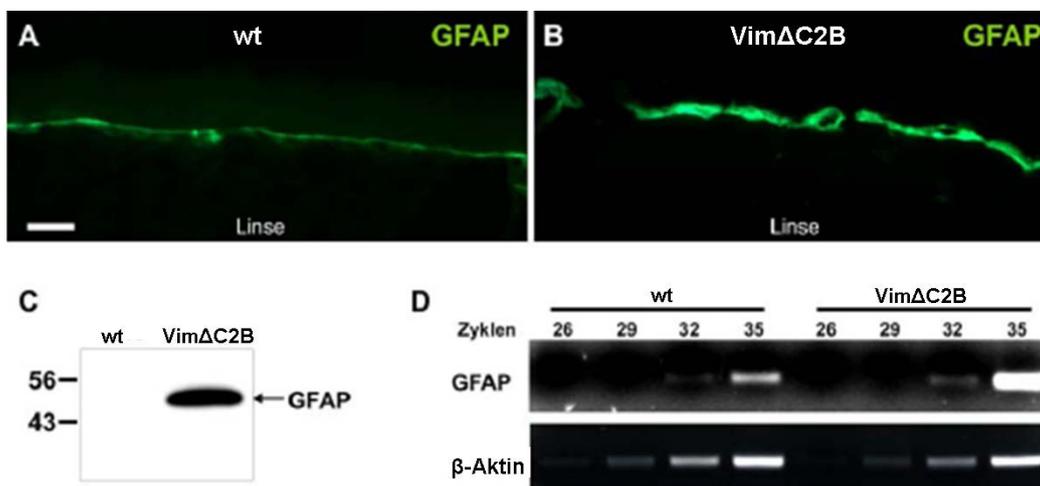


Abb. 4.35: Erhöhte GFAP-Expression im Linsenepithel transgener Mäuse. Die Expression von GFAP im Linsenepithel wurde durch Immunfluoreszenz, Immunoblot sowie semiquantitative RT-PCR bestimmt. (A) und (B) zeigen die Immunfluoreszenzreaktion mit einem Antikörper gegen GFAP (grün) in der Epithelschicht der Linse. In (B) ist die intensivere Fluoreszenz bei gleicher Belichtungszeit im Epithel der Vim Δ C2B Mäuse zu erkennen. Maßstabsbalken: 20 μ m. (C) zeigt die Immunoblotanalyse von Linsenlysaten. Es wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen. Vim Δ C2B Linsenextrakte enthalten erhöhte Mengen an GFAP. (D) semiquantitative RT-PCR Analyse von mRNS-Mengen in transgenen Mauslinsen und anschließender Agarose-Gelelektrophorese. Ein für die mRNS von GFAP spezifisches Amplikon von 179 Bp war in Vim wt Linsen nach 35 Zyklen nur schwach detektierbar, während es in Vim Δ C2B Linsen reichlich vorhanden war. Die Kontrolle der eingesetzten RNS-Menge erfolgte über das β -Aktin Amplikon. Adaptiert nach (Meier-Bornheim, 2006).

Expression von transgenem Vimentin auf GFAP im Linseneithel von R113C und Vim Δ C2B Mäusen untersucht (Meier-Bornheim, 2006). Dabei konnte durch Immunfluoreszenz, Immunoblot sowie semiquantitative RT-PCR gezeigt werden, daß die Menge an GFAP sowohl auf mRNA als auch Proteinebene im Vergleich zu wt Tieren erhöht war (Abb. 4.35). Dies deutet auf eine Beteiligung des mutierten, transgenen Vimentins an der transkriptionellen Regulation der GFAP-Expression hin. Desweiteren wurde mit einer immunhistochemischen Farbreaktion eine verstärkte Lokalisation von Stat3 in Müller-Zellen und Astrozyten nachgewiesen (Abb. 4.34). Zusammen mit den Zellkulturexperimenten läßt sich daraus ein neues Modell ableiten, wie Vimentinmutationen die GFAP-Expression im Linseneithel beeinflussen. Vimentin sequestriert Stat3 im Zytoplasma, limitiert dadurch die im Zellkern verfügbare Menge an Stat3 und die GFAP-Expression ist gering. Ist aufgrund von Mutation oder fehlender Vimentinphosphorylierung keine Stat3-Bindung mehr möglich, erhöht sich die Menge an aktivierbarem Stat3 und die GFAP-

```

CTGGGGAGGA GGCAGACAGC CAGGCCTTGT CTGCAAGCAG ACCTGGCAGC ATTGGGCTGG
CCGCCCCCA GGGCCTCCTC TTCATGCCCA GTGAATGACT CACCTTGGCA CAGACACAAT
GTTCCGGGGTG GGCACAGTGC CTGCTTCCCG CCGCACCCCA GCCCCCTCA AATGCCTTC (-1450)
GAGAAGCCCA TTGAGCAGGG GGCTTGCAAT GCACCCAGC CTGACAGCCT GGCATCTTGG
GATAAAAGCA GCACAGCCCC CTAGGGGCTG CCCTTGCTGT GTGGCGCCAC CGGCGTGGA
GAACAAGGCT CTATTCAGCC TGTGCCAGG AAAGGGGATC AGGGGATGCC CAGGCATGGA
CAGTGGGTGG CAGGGGGGGA GAGGAGGGCT GTCTGCTTC CAGAAGTCCA AGGACACAAA (-1230)
TGGGTAGGG GACTGGGCAG GGTTCAGACC CTGTGGGACC AGAGTGGAGG GCGTAGATGG
ACCTGAAGTC TCCAGGGACA ACAGGGCCCA GGTCTCAGGC TCCTAGTTGG GCCCAGTGGC
TCCAGCGTTT CCAAACCCAT CCATCCCAG AGGTCTTCC CATCTCTCCA GGCTGATGTG
TGGGAACTCG AGGAAATAAA TCTCCAGTGG GAGACGGAGG GGTGGCCAGG GAAACGGGC
GCTGCAGGAA TAAAGACGAG CCAGCACAGC CAGCTCATGT GTAACGGCTT TGTGGAGCTG
TCAAGGCTG GTCTCTGGGA GAGAGGCACA GGGAGGCCAG ACAAGGAAGG GGTGACCTGG
AGGGACAGAT CCAGGGGCTA AAGTCCTGAT AAGGCAAGAG AGTGCCGCC CCCTCTTGCC
CTATCAGGAC CTCCACTGCC ACATAGAGGC CATGATGAC CCTTAGACAA AGGGCTGGTG
TCCAATCCA GCCCCAGCC CCAGAACTCC AGGGAATGAA TGGGCAGAGA GCAGGAATGT
GGGACATCTG TGTTCAGGG AAGGACTCCA GGAGTCTGCT GGAATGAGG CCTAGTAGGA
AATGAGGTGG CCCTTGAGGG TACAGAACAG GTTCATCTT CGCCAAATTC CCAGCAGCTT
GCAGGCACTT ACAGCTGAGT GAGATAATGC CTGGGTATG AAATCAAAAA GTTGGAAAAGC
AGGTCAGAGG TCATCTGGTA CAGCCCTTCC TTCCCTTTTT TTTTTTTTTT TTTGTGAGAC
AAGGTCTCTC TCTGTTGCC AGGCTGGAGT GGCGCAAACA CAGCTCACTG CAGCCTCAAC
CTACTGGGCT CAAGCAATCC TCCAGCCTCA GCCTCCAAA GTGCTGGGAT TACAAGCATG
AGCCACCCCA CTCAGCCCTT TCCTTCCTTT TTAATTGATG CATAATAATT GTAAGTATTC
ATCATGGTCC AACCAACCCT TTCTTGACCC ACCTTCCTAG AGAGAGGGTC CTCTTGCTTC
AGCGGTCAAG GCCCCAGACC CATGGTCTGG CTCCAGGTAC CACCTGCCTC ATGCAGGAGT
TGGCGTGCC AGGAAGCTCT GCCTCTGGGC ACAGTGACCT CAGTGGGGTG AGGGGAGCTC
TCCCATAGC TGGGCTGCGG CCCAACCCCA CCCCTCAGG CTATGCCAGG GGGTGTGTC
AGGGGCACCC GGCATCGCC AGTCTAGCCC ACTCCTTCAT AAAGCCCTCG CATCCAGGA
GCGAGCAGGAG CCAGAGCAGG ATGGAGAGGA GACGCATCAC CTCCGTGCT CGCCGCTCCT
ACGTCCTCTC AGGGGAGATG ATGGTGGGG GCCTGGCTCC TGGCCGCGT CTGGTCTCTG
GCACCCGCTT CTCCCTGGCT CGAATGCCCC CTCCACTCCC GACCCGGGTG GATTTCTCCC
TGGCTGGGGC ACTCAATGCT GGCTTCAAGG AGACCCGGGC CAGTGAGCGG GCAGAGATGA
TGGAGCTCAA TGACCGCTTT GCCAGCTACA TCGAGAAGGT TCGCTTCCTG GAACAGCAAA (+338)
ACAAGCGCT GGCTGCTGAG CTGAACCAGC TGCGGGCCAA GGAGCCACC AAGCTGCCAG

```

Abb. 4.36: Partielle DNS-Sequenz des humanen GFAP-Lokus.

Dargestellt ist der Teil der humanen genomischen DNS-Sequenz, der auf Chromosom 17 das GFAP-Gen enthält. Die potentiell Stat3-bindende Sequenz (TTCN₃₋₄GAA) ist gelb hervorgehoben, der Transkriptionsstart pink, der Translationsstart grün, und die TATA-Box blau. Die Zahlen in Klammern markieren die Position relativ zum Transkriptionsstart. Pro Zeile sind 60 Nukleotide abgebildet.

Expression wird erhöht (siehe auch Abb. 5.5). Um diese Theorie zu unterstützen, wurden Stat3-Bindungsstellen in der humanen chromosomalen GFAP DNS-Sequenz analysiert (Abb. 4.36). Es wurden 3 mögliche Stat3-Bindungsstellen, die der beschriebenen Konsensussequenz entsprechen, gefunden (Ehret et al., 2001). Davon liegen die DNS-Bindungsstellen bei -1230 und -1450 im Bereich des durch den ProScan Algorithmus vorhergesagten GFAP-Promoters. Die Regulation der GFAP-Transkription durch eine Vimentin-Stat3-Interaktion ist also prinzipiell möglich und sollte durch weitere Experimente bestätigt werden. Falls dies zutrifft, ist hier zum ersten Mal eine Rolle von Vimentin in der Regulation von Stat3 im Prozeß der reaktiven Gliose, und damit indirekt in der Regulation eines Genprogramms der Regeneration, aufgezeigt worden.

5 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zum einen die Charakterisierung der Expression von Vimentinmutationen in transgenen Mäusen durchgeführt. Die Mutation führte nur im Auge zu einem Phänotyp in Form eines Katarakts. Zum anderen wurde in Kataraktpatienten das Vimentin auf Mutationen untersucht. Die gefundene Mutation in der Vimentin 1B-Domäne wurde *in vitro* und in Zellkultur charakterisiert und zeigt zum ersten Mal einen Zusammenhang zwischen Vimentinmutation und humanem Katarakt.

5.1 Vimentinfunktion in der Maus

Vimentin wird in allen Zellen mesenchymalen Ursprungs exprimiert und ist in seiner Aminosäuresequenz und Expressionsmuster stark konserviert (Schaffeld et al., 2001). Obwohl Vimentin *in vitro* und in Zellkultur mit vielen essentiellen Prozessen wie Streßantwort, intrazellulärer Transport oder Zellbewegung verknüpft werden konnte, ist bis jetzt noch kein Bezug zu einer Erkrankung bekannt (Colucci-Guyon et al., 1994; Herrmann and Aebi, 2004). Nur eine Studie, in der Hühnervimentin in der Linse von Mäusen überexprimiert wurde, ergab einen Katarakt und Differenzierungsstörungen der Linse (Capetanaki et al., 1989). Der Phänotyp scheint aber unspezifisch zu sein, da auch die ektopische Expression von anderen Proteinen wie SV40 T-Antigen kann in der Linse zum Katarakt führen (Gotz et al., 1991).

Um die Vimentinfunktion *in vivo* zu untersuchen, wurde ein Ansatz, der zur Identifikation von Keratinmutationen in EBS-Patienten und GFAP-Mutationen in der Alexanderschen Krankheit geführt hat, verwendet (Li et al., 2002; Messing et al., 1998; Vassar et al., 1991). Dabei konnte eine wichtige Funktion von Vimentin in der Linse gezeigt werden (Bornheim et al., 2008). Mutiertes Vimentin bildete in allen Zellen Aggregate, verursachte aber nur in der Linse einen Phänotyp in Form eines Katarakts. Da Vimentin nur in der Linse, aber nicht in anderen Vimentin-exprimierenden Geweben eine Pathologie verursacht, sind Vimentinaggregate nicht an sich toxisch für die Zelle. Mutantes Vimentin verursachte in Linsenfaserzellen eine Hochregulation von Hsp70 und dessen Kolokalisation in Vimentinaggregaten. Im Gegensatz zu Desminopathien und Alexanderschen Erkrankung sind Vimentinaggregate nicht terminale sondern transiente Strukturen, die sogar in

postmitotischen Zellen abgebaut werden (Li et al., 2002; Omary et al., 2004). Dies ist in Übereinstimmung mit Zellkulturexperimenten der Keratin14 Mutation R125C, die eine Halbwertszeit von weniger als 15 Minuten hat und schnell abgebaut wird (Werner et al., 2004). Ein potentiell ähnlicher Mechanismus in der Linse wurde untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die dominante Vimentinmutation eine Stressantwort der Zelle induziert, für die eine verstärkte Hsp70 Expression und eine erhöhte Proteasomenaktivität typisch sind. Die um 30 % erhöhte Proteasomenaktivität trägt zum beobachteten Abbau der Aggregate und möglicherweise zur Kataraktpathologie bei (Bornheim et al., 2008). Die Aggregate kolokalisieren mit Synemin, aber nicht mit den 'beaded-filament'-Proteinen CP49 und Filensin, oder mit anderen Proteinen des Zytoskeletts und bestehen daher vorrangig aus Vimentin, Synemin und Chaperonen. In weiteren Experimenten muß gezeigt werden, ob Ko-Chaperone, wie z.B. CHIP, in den Abbau involviert sind (Arndt et al., 2007).

Mechanistisch gesehen verursacht die Vimentinmutation wahrscheinlich eine Fehlfaltung von Vimentin, welche die Assemblierung beeinflusst. Polymere, die mutierte Untereinheiten enthalten, lagern sich mit der Zeit dann zu Aggregaten zusammen. Die Mutation R113C liegt im 1A-Bereich der 'rod'-Domäne, für den schon eine Kristallstruktur vorliegt. In Abb. 5.1 ist dieser Teil der Vimentinstruktur für wt und mutiertes Vimentin dargestellt. Deutlich ist der Größenunterschied zwischen Cystein und Arginin in der nach außen gerichteten Seitenkette zu erkennen. Außerdem enthält die Vimentinmutante eine positive Ladung weniger als der wt. Sehr wahrscheinlich verhindern die veränderte Ladung und räumliche Struktur der Aminosäure die korrekte Ausbildung von Filamenten.

Wie kann trotz Vimentinexpression in verschiedenen Geweben ein spezifischer Phänotyp nur in der Linse erklärt werden? In der Linse wird Vimentin sowohl im einschichtigen Epithel als auch in Linsenfaserzellen exprimiert. Im Linsenepithel wird Vimentin mit GFAP koexprimiert und bildet keine Aggregate. Dies liegt wahrscheinlich an den im Vergleich zu GFAP geringen Vimentinproteinmengen (Hatfield et al., 1984), der Fähigkeit von Vimentin mit GFAP Heteropolymere auszubilden, und am Proteinabbau im regenerativen Linsenepithel. In anderen Geweben sind auch Vimentinaggregate vorhanden, bilden aber keinen pathologischen Phänotyp aus. Dies liegt möglicherweise am sehr geringen Proteinumsatz der Linse und an der Notwendigkeit für den Erhalt der Transparenz keine Fehlfaltung der Linsenproteine, z.B. durch detoxifizierende Enzyme und hohe

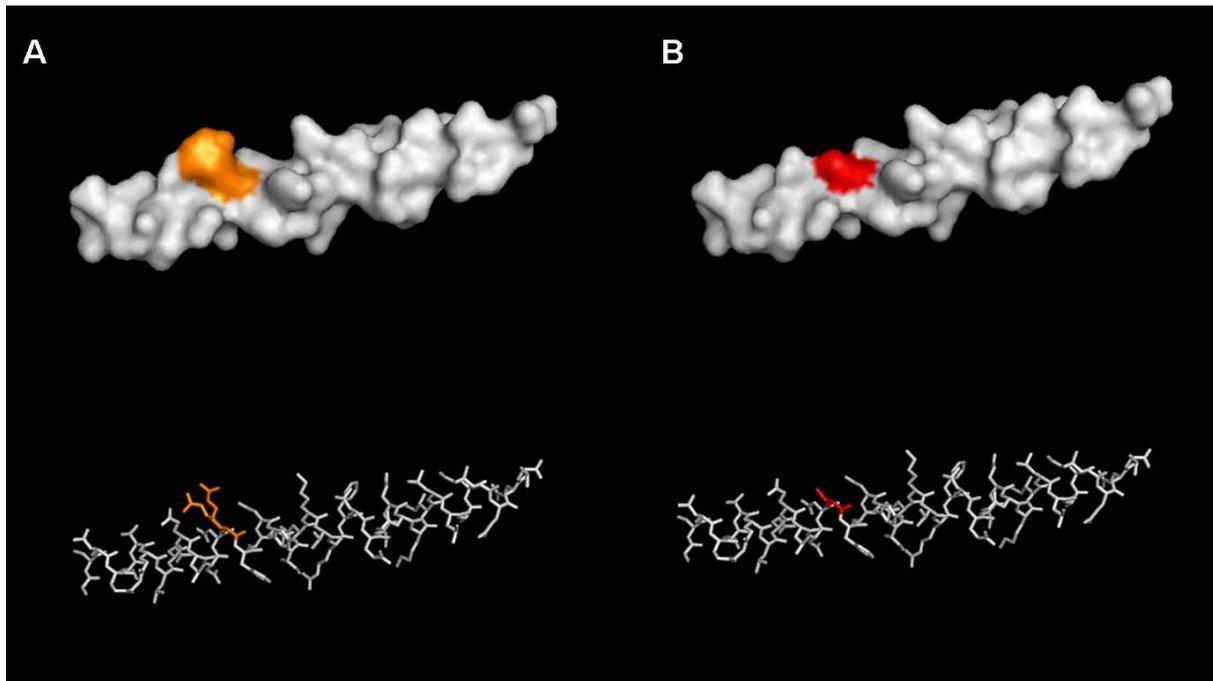


Abb. 5.1: Modell der Proteinsekundärstruktur der 1A Domäne von humanem Vimentin. (A) wt Vimentin. (B) R113C Vimentin. Die Lage der Vimentin Punktmutation ist farbig markiert. Dargestellt sind jeweils ein Oberflächen- und ein Stabmodell, basierend auf der partiellen humanen Vimentin Kristallstruktur (Strelkov et al., 2002).

Konzentrationen von α -Kristallinen, zu erlauben. Desweiteren wird Vimentin im Gewebe oft nur in speziellen Zelltypen exprimiert, so daß eventuell die Menge an transgenem Vimentin nicht ausreicht, um Effekte wie in Linse zu zeigen.

In Linsenfaserzellen gibt es 2 Arten von Adhäsionskomplexen, die mit dem Zytoskelett verbunden sind. Der eine besteht aus N-Cadherin und Cadherin 11 und ist mit den Adapter-Proteinen α - und β -Catenin, Plakoglobin, p120ctn und Vinculin assoziiert. Der Zweite befindet sich vor allem an der Längsseite der Linsenfaserzellen und wird von Ezrin, Periplakin, Periaxin und Desmoyokin, zusammen mit Plectin, Spectrin und Moesin gebildet (Straub et al., 2003). Im Gegensatz zur Keratininteraktion mit Desmosomen, die durch Mutationsstudien und korrelierte Erkrankungen sehr gut untersucht ist, ist für Vimentin und andere IF-Proteine wenig über deren Verknüpfung mit Adhäsionskomplexen bekannt (Fuchs and Cleveland, 1998; Getsios et al., 2004). In Zellkultur wird Vimentin in Fibroblasten durch p120ctn mit N-Cadherin verknüpft (Kim et al., 2005), in Endothelzellen dagegen durch Plakoglobin und Desmoplakin mit VE-Cadherin (Kowalczyk et al., 1998; Lampugnani and Dejana, 1997). Da Mutationen in Keratinen und den Proteinen der Desmosomen sowohl die Integrität der Desmosomen als auch des Keratinzytoskeletts beeinflussen (Magin et al., 2004; Omary et al., 2004), ist es denkbar, daß die Vimentinmutation R113C die Verbindung der Vimentinfilamente mit

den Adhäsionskomplexen der Linse verringert. Dies könnte letztendlich unter mechanischer Belastung durch die Akkommodation zum Riß der Linsenkapsel führen. Unterstützt wird diese Hypothese durch die elektronenmikroskopische Analyse transgener Linsenschnitte, die eine Plasmamembran mit starken Einstülpungen und eine stark verminderte Interaktion der dorsalen Linsenzellen zeigt. Durch Immunfluoreszenzanalyse wurde in Gegenwart von Vimentinaggregaten eine unveränderte Lokalisation von Plectin und Aktin demonstriert, was eine direkte Schädigung der Adhäsionskomplexe oder der Verbindung zum Aktinzytoskelett ausschließt. Trotzdem kann die mechanische Stabilität der Linse nicht aufrecht erhalten werden. Dies verdeutlicht die essentielle Funktion von Vimentin für die Interaktion zwischen Fokalkontakten und Zytoskelett sowie für die Struktur der Linsenfaserzellen. Das Modell der Interaktionen von Vimentin-IF mit den Membranadhäsionskomplexen ist in Abb. 5.2 dargestellt. Dabei wird durch die Vimentinmutation und die resultierende Aggregation die Verbindung zu den Fokalkontakten gestört und Vimentin kann die Zellen nicht mehr vor mechanischem

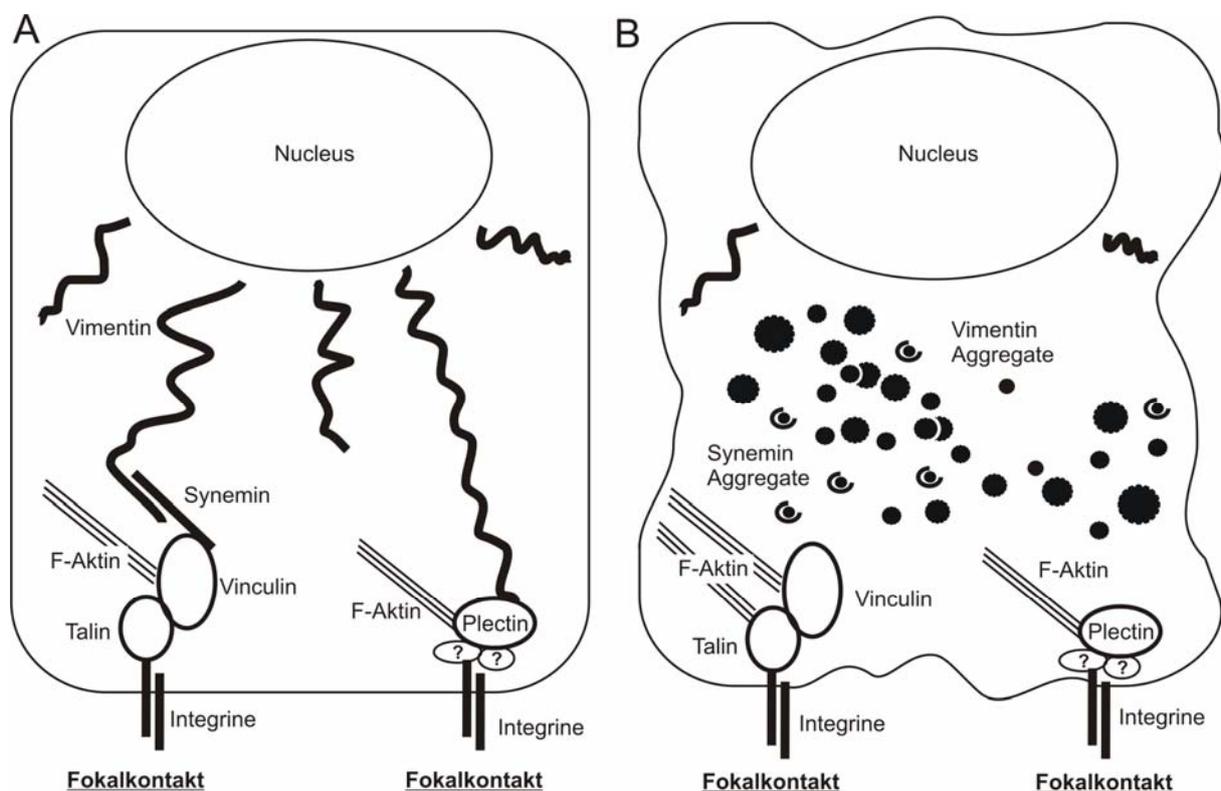


Abb. 5.2: Modell der Interaktion von Vimentin mit Fokalkontakt-Proteinen.

(A) In Fibroblasten ist das Vimentinnetzwerk durch Interaktionen mit Synemin und Vinculin oder durch Plectin mit Integrinen verbunden. (B) Die Expression von Vimentinpunktmutanten in Fibroblasten verursacht die Bildung von Proteinaggregaten und zerstört die Verbindung von Intermediärfilamenten zu Fokalkontakten. Die Anwesenheit von Synemin in Vimentinaggregaten und die unveränderte Verteilung von Vinculin und Plectin an Fokalkontakten legt eine stärkere Bindung mit Vimentin, verglichen mit anderen Proteinen des Fokalkontaktes, nahe.

Streß schützen. Welche anderen Mechanismen sind in die Bildung von Katarakten involviert und wie können sie zum Verständnis des Pathomechanismus der Vimentinmutation in der Maus beitragen? Mutationen in den Genen der Connexine, Kristalline, aber auch der IF-Proteine CP49 und Filensin sowie Transkriptionsfaktoren können Katarakte verursachen (Graw, 2004; Perng et al., 2007) (siehe auch 1.5). Es wurde demonstriert, daß die Inaktivierung des Connexin 46 Gens einen erhöhten Kalziumeinstrom in Linsenfaserzellen verursacht, dadurch die proteolytische Prozessierung von γ -Kristallin stört und somit zur Aggregation führt (Baruch et al., 2001). Die Mechanismen, durch die CP49 und Filensin Mutationen zum Katarakt führen sind noch nicht bekannt. Die Analyse der CP49 und Filensin 'knock-out'-Mäuse unterstützt die Hypothese, daß diese linsenspezifischen IF-Proteine für die Transparenz der Linse entscheidend sind (Alizadeh et al., 2003; Alizadeh et al., 2002; Perng and Quinlan, 2005). Im Gegensatz dazu sind die 'beaded-filament'-Proteine in der Linse von VimR113C und Vim Δ C2B Mäusen völlig unverändert und somit nicht mit der Kataraktbildung verbunden. Anscheinend sind 'beaded-filament'-Proteine allein nicht in der Lage, die Integrität der Linse aufrecht zu erhalten. Mutationen in γ -Kristallinen der Maus und des Menschen verursachen deren Aggregation im Zellkern von primären Linsenfaserzellen und dadurch die Bildung von Katarakten (Sandilands et al., 2002). Möglicherweise geschieht dies durch die Depletion von Transkriptionsfaktoren, in Analogie zu Mechanismen, die für die Aggregationskrankheit Huntington postuliert wurden. Es wurde keine veränderte Differenzierung der Linsenfaserzellen in transgenen VimR113C und Vim Δ C2B Mäusen detektiert, was diesen Mechanismus für die Kataraktentwicklung unwahrscheinlich macht. Eine weitere Gruppe von Kristallinen, die α A- und α B-Kristalline, sind eng mit dem IF-Zytoskelett assoziiert und sind an der Reorganisation von Vimentin, durch Modulation der Löslichkeit, beteiligt (Nicholl and Quinlan, 1994). So führen Mutationen von α B-Kristallin zu Katarakten in der Linse und Myopathie, die phänotypisch Ähnlichkeit zu Desminopathien aufweist. Diese Pathologie wird verursacht von zytoplasmatischen Proteinaggregaten aus IF-Protein und α B-Kristallin, und zeigt die enge Protein-Protein-Interaktion und ihre gegenseitige Regulation (Litt et al., 1998; Vicart et al., 1998). Durch ihre Chaperonaktivität wirken α -Kristalline der Proteinschädigung in der Linse entgegen, die aufgrund des stark verminderten Stoffwechsels der Zellen nicht kompensierbar wäre (Sun and MacRae, 2005). In den Proteinaggregaten der Vim Δ C2B und VimR113C transgenen Mäusen konnte

allerdings keine Koloalisation von Vimentin mit α B-Kristallin detektiert werden. Dies spricht für einen Mechanismus der Kataraktentstehung unabhängig von α B-Kristallin. Weiterhin scheint α B-Kristallin die Proteinaggregate nicht durch seine Chaperonaktivität zu modulieren. Zudem ist zu erwähnen, daß Mutationen im α B-Kristallinen zu polaren Katarakten führen, während mutiertes Vimentin in der Maus einen hauptsächlich posterioren Katarakt verursacht (Bornheim et al., 2008). Das könnte mit der leicht unterschiedlichen Architektur der Linse oder den Expressionsmustern in Mensch und Maus erklärt werden.

5.2 Vimentin und Katarakt im Menschen

In den Genen von Typ III IF-Proteinen wurden Mutationen identifiziert, die zu gestörter Filamentbildung führen und eine humane Erkrankung auslösen. So sind zahlreiche Mutationen in Desmin der Auslöser von Desminopathien (Bär et al., 2004; Goldfarb and Dalakas, 2009). Mutationen im GFAP-Gen verursachen die Bildung von Rosenthalfasern in Gliazellen, die zur neurodegenerativen Alexanderschen Erkrankung führen (Li et al., 2002; Liem and Messing, 2009). Für Vimentin war bisher keine humane Erkrankung bekannt. Ein transgenes Mausmodell, das in Analogie zu Keratinmutationen in EBS-Erkrankungen eine Vimentinmutante exprimiert, entwickelte einen Katarakt (Bornheim et al., 2008). Um einen Zusammenhang zwischen Vimentinmutation und humaner Erkrankung zu etablieren, wurden 90 Kataraktpatienten auf Veränderungen im Vimentingen untersucht. In einer 45jährigen Frau mit einem zonularen 'staubartigen' Katarakt wurde die Vimentinmutation E151K identifiziert und damit zum ersten Mal Vimentin mit humaner Erkrankung assoziiert (Müller et al., 2009).

5.2.1 Vimentinstruktur und Pathologie

Vimentin hat wie alle IF-Proteine eine coiled-coil Struktur. Coiled-coil Strukturen bestehen aus α -Helices und haben eine geschätzte Häufigkeit von etwa 10 % in allen Proteinsequenzen. Sie weisen eine charakteristische Heptadenwiederholung (abcdefg)_n der Aminosäuren auf (Grigoryan and Keating, 2008). Die Positionen a und d sind vorrangig mit apolaren Aminosäuren besetzt und die Positionen e und g mit geladenen und hydrophilen Aminosäuren (Burkhard et al., 2001). Strukturelle Spezifität im coiled-coil wird hauptsächlich durch die Aminosäuren in den Positionen

a, d, e und g bestimmt (Mason and Arndt, 2004). Die elektrostatischen Interaktionen zwischen den Aminosäuren in e und g Positionen sind entscheidend für die Ausrichtung der Helices im coiled-coil. Aminosäuren in a und d Position bestimmen durch Komplementarität die enge Packung der Helices (Abb. 5.3) (Grigoryan and Keating, 2008).

Mutationen können auf molekularer Ebene die Anzahl und Art der ionischen inter- und intramolekularen Interaktionen, die Wasserstoffbrückenbindungen, die Stabilität und Biegung der α -Helices sowie das Helixpotential verändern (Smith et al., 2004). In einer vergleichenden Studie wurden von 22 EBS-verursachenden Keratin5 und 14 Mutationen im 1A-Bereich der 'rod'-Domäne die strukturellen Effekte analysiert (Smith et al., 2004). Dabei lagen 11 der 22 Mutationen in den Heptadenpositionen a und d sowie 7 in e und g Position. Mutationen bewirken unterschiedlich starke Konformationsänderung im α -Helix. Allerdings kann das Ausmaß der lokalen Strukturveränderung an der Stelle der Mutation nicht mit der Position in der Heptadenwiederholung korreliert werden (Smith et al., 2004). Die strukturellen Effekte eine Mutation können daher schwer vorausgesagt werden und sind abhängig von der lokalen Umgebung (Grigoryan and Keating, 2008). Der Effekt von humanen Krankheit-verursachenden Mutationen im Typ III IF-Protein Desmin auf die Filamentbildung wurde *in vitro* systematisch untersucht. Punktmutationen in Desmin können *in vitro* unterschiedliche Schritte der Filamentbildung stören, z.B. die Bildung von ULFs, deren Anlagerung zu langen Filamenten und die radiale Komprimierung. Auch die Interaktion mit bestehenden Filamenten kann beeinflusst sein (Bär et al., 2005). Als möglicher Mechanismus wurde eine Konkurrenz zwischen mutierten und wt IF-Proteinen um Bindungsstellen an den Zelladhäsionskomplexen postuliert (Herrmann et al., 2009). Punktmutationen können sowohl inter- als auch intramolekulare Interaktionen in den Filamenten modifizieren. Dabei liegen die meisten Krankheit-assoziierten Desminmutationen in der 2B-Region der 'rod'-Domäne (Goldfarb and Dalakas, 2009). Ebenso liegen die meisten Mutationen in Keratinenen, die zu EBS führen, in den IF-Konsensusmotiven an beiden Enden der 'rod'-Domäne (Fuchs and Weber, 1994). Im Vimentinmolekül sind diese Bereiche entscheidend für die Dimer-Dimer-Interaktionen (Herrmann and Aebi, 2004). Durch *in vitro* Assemblierungsexperimente wurden neben den IF-Konsensusmotiven der Beginn des 2A-Bereichs der 'rod'-Domäne sowie die 'Kopf'-Domäne als essentielle Strukturen für die Vimentin Filamentbildung identifiziert. Außerdem können artifizielle

Mutationen in den Linkerbereichen der 'rod'-Domäne *in vitro* die Fähigkeit zur Filamentbildung blockieren, wahrscheinlich indem sie deren Flexibilität reduzieren (Herrmann and Aebi, 2004; Herrmann et al., 1996). Einige Desminmutanten können *in vitro* perfekte Filamente ausbilden, während andere Mutanten gar keine Filamente mehr bilden können. Trotzdem verursachen beide den gleichen Phänotyp *in vivo*, d.h. die Schwere einer Erkrankung und der Grad eines Assemblierungsdefektes *in vitro* nicht direkt miteinander korrelieren. Umgekehrt verursachen aber bisher alle Mutationen in IF-Proteinen, die *in vitro* die Assemblierung beeinflussen, auch *in vivo* eine gestörte Filamentbildung (Herrmann et al., 2009). Zusätzlich zu den strukturellen Eigenschaften von Desminmutationen spielt der genetische Hintergrund des Patienten eine Rolle (Bär et al., 2005). Die Ausprägung des Phänotyps einer Desminmutation wird *in vivo* auch durch die Interaktion mit anderen Proteinen und die Aktivität der Chaperone und Proteinabbaumechanismen beeinflusst (Goldfarb and Dalakas, 2009).

Ein weiterer Ansatz ist, daß Mutationen zusätzlich zu strukturellen Veränderungen zu veränderten biophysikalischen Eigenschaften des IF-Proteins und dadurch zu erhöhtem Abbau und/ oder zu Aggregation führen. IF-Mutationen können auch die Flexibilität während mechanischer Verformung der Zelle, die Interaktion mit anderen Bestandteilen des Zytoskeletts und mit Bindungspartnern, wie Kinasen und Phosphatasen, oder die Löslichkeit beeinflussen.

In Abb. 5.3 sind die Positionen der Aminosäuren und die Interaktionen zweier Helices im coiled-coil schematisch dargestellt. Die im Kataraktpatienten identifizierte Vimentinmutation E151K liegt in e Position der Heptadenwiederholung. *In vitro* inhibiert die Vimentin E151K Mutation nicht die Filamentbildung an sich, sondern verursacht einen kinetischen Defekt der frühen und späten Phasen der Assemblierung. Wahrscheinlich werden durch den Aminosäureaustausch die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Helices, die für die laterale Assoziation und die Orientierung zueinander notwendig sind, gestört (Abb. 5.3) (Herrmann et al., 2007). Trotzdem verursacht die Vimentin E151K Mutation nicht so starke Defekte, wie sie für Mutationen des Muskel-spezifischen IF-Proteins Desmin in Myopathien beobachtet werden (Bär et al., 2004; Goldfarb et al., 2004). Ob die Struktur des Vimentinmonomers durch die Mutation beeinflusst wird, kann aufgrund der fehlenden Kristallstruktur der 1B-Subdomäne nicht vorhergesagt werden. Bisher wurde die E151K Mutation nicht in einer humanen Erkrankung oder in den anderen

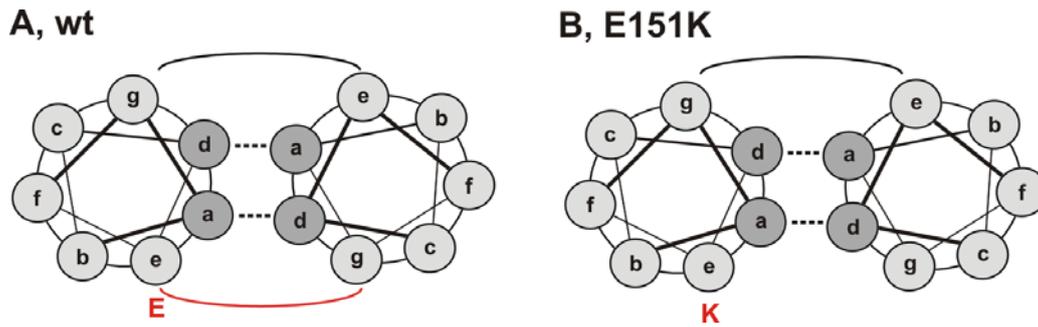


Abb. 5.3: Schematische Darstellung der Vimentin 1B-Domäne als 'wheel'-Projektion. (A) wt Vimentin. (B) E151K Vimentin. Die mutierte Aminosäure ist farbig markiert. Dargestellt sind die Heptaden-Wiederholungen der α -helikalen 'rod'-Domäne als Positionen a-g. Interaktionen zwischen Aminosäuren in a und d, sowie e und g Position sind entscheidend für die Vimentin Dimerbildung und die Ausbildung von Vimentinfilamenten.

Typ III IF-Proteinen gefunden (www.interfil.org) (Szeverenyi et al., 2008).

5.2.2 Proteinaggregation und Mechanismen der Erkrankungen

Die dreidimensionale Struktur eines Proteins ist vollständig bestimmt durch seine Aminosäuresequenz (Anfinsen, 1973). Missense-Mutationen verursachen etwa die Hälfte aller humanen genetischen Erkrankungen (Stenson et al., 2003). Eine besonders wichtige Frage ist daher: wird eine bestimmte Mutation eine Fehlfaltung des Proteins verursachen? Da das Wissen über Proteinfaltungswege noch gering ist, lässt sich dies nicht gut vorhersagen (Gregersen et al., 2006). Proteine falten sich *in vivo* in den nativen Zustand oder in Intermediate, die kinetisch stabile fehlgefaltete Konformationen darstellen (Hartl and Hayer-Hartl, 2009). Teilweise- oder fehlgefaltete Proteine haben eine erhöhte Tendenz zur Aggregation, da sie hydrophobe Aminosäuren und Teile des unstrukturierten Polypeptidrückrates exponieren, die sonst im Molekül verborgen sind. Aggregation wird hauptsächlich durch hydrophobe Interaktionen verursacht und bildet amorphe Strukturen oder fibrilläre Amyloide aus (Hartl and Hayer-Hartl, 2009). Falls die native Konformation eines Proteins durch Mutation oder posttranslationale Veränderung gestört wird, hat die Zelle Schutzmechanismen, die fehlgefaltete Proteine in einer löslichen Konformation hält, sie zur nativen Struktur zurückfaltet oder das Protein hydrolysiert. Dazu gehören die molekularen Chaperone, antioxidative Enzyme und auch die Proteine des Ubiquitin-Proteasom-Weges (Sherman and Goldberg, 2001). Proteinaggregation kann die Expression dieser Proteine aktivieren. Falls die Schutzmechanismen der Rückfaltung, des Abbaus von Proteinen und die Reduktion von Oxidanzien und Radikalen nicht ausreichen, kann Aggregation auch Apoptose

induzieren (Sherman and Goldberg, 2001). Desweiteren können Mutationen und Fehler in den Proteinen des Proteinqualitätskontrollsystems Aggregationskrankheiten verursachen (Macario and Conway de Macario, 2005). Für viele genetische Erkrankungen kann keine Genotyp-Phänotyp-Beziehung etabliert werden, was unter anderem daran liegt, daß Missensevariationen fehlgefaltete Proteine verursachen, deren Schicksal an vielen unterschiedlichen, zwischen Zelltypen und Patienten variierenden, Faktoren liegt (Gregersen et al., 2006). Für die Ausprägung einer Erkrankung scheint die Balance zwischen aggregiertem und nativem Protein, zwischen Proteinabbau und Akkumulation entscheidend zu sein (Gregersen et al., 2006). Die Erkrankung resultiert dabei nicht aus den Proteinaggregaten per se, sondern aus den dadurch gestörten zellulären Prozessen und kann je nach Zelltyp unterschiedlich ausgeprägt sein. In Abb. 5.4 sind in verschiedenen Aggregationskrankheiten und Modellsystemen beobachtete zelluläre Konsequenzen von Proteinaggregaten zusammengefaßt. Insbesondere toxische Effekte von Aggregaten können durch diverse Mechanismen verursacht werden. Proteinaggregate können eine Streßantwort der Zelle und auch Apoptose und Zelltod induzieren. Eine Fehlfunktion der Mitochondrien und der Einstrom von sekundären Signalstoffen kann durch Aggregate verursacht werden. Außerdem werden

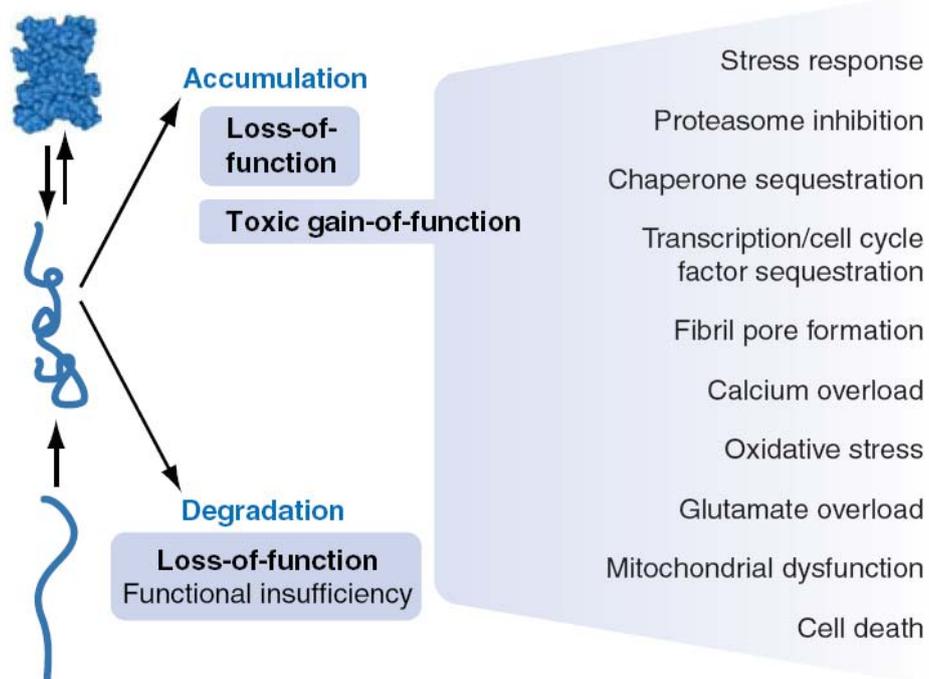


Abb. 5.4: Mechanismen der zellulären Reaktion auf Proteinaggregate. Dargestellt sind schematisch mögliche Konsequenzen der Proteinaggregation und die verursachten Prozesse in der Zelle. Nach (Gregersen et al., 2006).

unterschiedliche Proteine, darunter Chaperone und Transkriptionsfaktoren, in Aggregate sequestriert und der Proteinabbau kann inhibiert werden (Abb. 5.4). So können Aggregate indirekt auch die Transkription modifizieren. Ein weiterer möglicher Mechanismus der Aggregation und daraus resultierender Erkrankung könnte nach (Aguzzi, 2009) das 'Prion Prinzip' sein. Neurodegenerative Erkrankungen, wie die Creutzfeldt-Jakob Erkrankung, entstehen durch aggregierte Proteine, sogenannte Prione. Prione verursachen das Fortschreiten der Erkrankung, indem sie lösliche Proteinmonomere rekrutieren und durch Aufbrechen der Aggregate neue weitere Aggregationsstartpunkte bilden. So konnten Ren und Mitarbeiter zeigen, daß Polyglutaminaggregate von Zellen aufgenommen werden können und in diesen neue Aggregate bilden (Ren et al., 2009). Aggregate können sich demnach in weitere Zellen propagieren. Polyglutaminerkrankungen, eine Gruppe von Proteinaggregationserkrankungen, sind toxisch durch veränderte zelluläre Lokalisation und Proteininteraktionen und durch gestörte Proteinfaltungs- und Proteinabbausignalwege. Polyglutamin allein reicht aber nicht aus, um Krankheit zu verursachen. Dies wurde interpretiert, daß der Funktionsverlust keine signifikanten Konsequenzen hat. Eine weitere Erklärung ist, daß die normale Funktion des Krankheit-verursachenden Gens zwar notwendig ist, der Verlust aber nicht ausreicht, um die Krankheit zu verursachen (Thompson, 2008). Erst die Expression einer dominanten Mutante verursacht den Phänotyp und stellt dadurch einen 'gain of toxic function' dar. Da der Verlust von Vimentin in der Vimentin 'knock-out' Maus keinen pathologischen Effekt zeigt (Colucci-Guyon et al., 1994), aber die transgene Expression von Vimentinpunktmutanten in Gegenwart von wt Protein einen Katarakt verursacht (Bornheim et al., 2008; Müller et al., 2009), handelt es sich bei den R113C und E151K Mutationen um einen 'gain of toxic function'. Die Mutationen sind in ihrer Ausprägung, wie der Aggregation, zwar unterschiedlich, aber genetisch sind beide dominant. Die Vimentin E151K Mutation wurde vorläufig durch Sequenzanalyse charakterisiert. Da allerdings nur ein Kataraktpatient mit einer Vimentinmutation zur Verfügung steht und vom betroffenen Patienten kein Material für histologische Charakterisierung gewonnen werden konnte, sind keine weiteren *in vivo* Untersuchungen möglich. Deshalb wurde *in vitro* weiter untersucht, wie die E151K Mutation mechanistisch die Funktion von Vimentin beeinflusst. In Zellkultur verursacht Vimentin E151K teilweise Aggregation und eine veränderte Filamentbildung. Der Pathomechanismus geht mit einer Erhöhung der

Proteasomenaktivität um 60 % und einem kinetischen Defekt der *in vitro* Filamentbildung einher (Müller et al., 2009). Neben strukturellen Veränderungen im Filament verursacht die Vimentinmutation den pathologischen Phänotyp möglicherweise auch durch veränderte Interaktion mit anderen Bestandteilen des Zytoskeletts und mit Bindungspartnern, wie Kinasen, Phosphatasen und Zelladhäsionskomplexen. Denkbar wäre auch, daß die Vimentinmutation zu veränderten biophysikalischen Eigenschaften, wie z.B. der Löslichkeit oder Halbwertszeit der Vimentinmonomere, und dadurch zu erhöhtem Abbau und/ oder zu Aggregation führt. Die in Zellkultur beobachtete erhöhte Proteasomenaktivität bewirkt möglicherweise einen verstärkten Abbau des fehlgefalteten Vimentins und der assoziierten Proteine. Differenzierte Linsenfasern können keine Proteine synthetisieren und könnten infolge des verstärkten Abbaues von Vimentin-interagierenden Proteinen durch deren Depletion beeinflusst werden. Da sowohl im Mausmodell als auch in Zellkultur Vimentinmutationen zu einer erhöhten Proteasomenaktivität und Hsp70 Expression führen, stellt dies möglicherweise einen generellen Zusammenhang zwischen IF-Erkrankungen und den Proteinfaltungs und Proteinabbauwegen dar. Um den Effekt der E151K Mutation *in vivo* genauer untersuchen und möglicherweise beeinflussen zu können, sollte eine Vimentin E151K transgene Mauslinie generiert werden.

5.2.3 Behandlung von Katarakten und Proteinaggregaten

Ein Großteil der Behandlung von Katarakten befaßt sich mit deren Prävention. Zusätzlich zur Chaperonaktivität von α -Kristallinen enthält die Linse Enzyme wie Katalase, Glutathionperoxidase und Superoxiddismutase, die gegen schädigende Effekte von Wasserstoffperoxid und Sauerstoffradikalen schützen (Toh et al., 2007). Antioxidative Substanzen sollten daher theoretisch die Bildung von Katarakten verhindern. Vitamin C ist im Vergleich zum Plasma in der Linse und im Glaskörper in erhöhter Menge vorhanden und kann freie Radikale binden. Vitamin E kann *in vitro* die Oxidation von Membranlipiden verhindern. Langzeitstudien, die Patienten täglich Vitaminpräparate gaben, konnten allerdings keinen signifikanten Effekt in der Verhinderung von Katarakten feststellen (Toh et al., 2007). Eine weitere Behandlungsstrategie basiert auf der äußeren Anwendung von N-acetylcarnosin (NAC). NAC ist ein starkes Antioxidans und ein Inhibitor der Lipidperoxidase und sollte dadurch Schädigungen der Linsenzellen vermindern. Die bisher untersuchten

Fallzahlen sind trotz positiver Ergebnisse allerdings für eine abschließende Bewertung noch zu gering (Toh et al., 2007). Für die Substanzen Aspirin, Ibuprofen und Paracetamol konnte gezeigt werden, daß sie vor altersbedingtem Katarakt schützen, indem sie die chemische Modifikation von Proteinen verhindern (Harding, 2002). Ein weiteres Konzept der Behandlung basiert darauf, daß nicht alle Proteinmodifikationen zur Aggregation und zum Katarakt führen (Benedek et al., 1999). So soll durch induzierte Proteinmodifikation die Gesamtzahl der zu Aggregation führenden Proteininteraktionen reduziert und dadurch die Kataraktbildung stark vermindert werden. Da die Kinetik der Aggregatbildung stark verlangsamt wird, und Katarakt oft altersbedingt auftritt, kommt es so zu deutlich weniger Katarakterkrankungen. Die Substanzen Glutathion, Dithiodiethanol (DTDE) und Pantethin, ein Coenzym A-Derivat, wurden mit den Thiolgruppen von Cysteinen verknüpft und konnten *in vitro* und im Tiermodell eine Linsentrübung verhindern (Benedek et al., 1999). Entwickelt werden auch neue Systeme zur langfristigen Abgabe von Wirkstoffen an das Auge. Eine interessante Möglichkeit sind dabei Kontaktlinsen, die auf der Innenseite mit Wirkstoff-enthaltenden Gelen beschichtet sind. Die Penetration und Bioverfügbarkeit soll durch Cyclodextrine, Liposomen oder Nanopartikel verbessert werden (Conway, 2008).

Therapeutische Ansätze zur Modifikation von Aggregationskrankheiten haben zwei Hauptbestandteile. Zum einen die Expression, Prozessierung oder Konformation des mutanten Proteins zu beeinflussen, zum anderen die verursachten zellulären Defekte zu revertieren (Shao and Diamond, 2007). Zur Revertierung der Aggregate und der verursachten Phänotypen kann die Stimulation der Proteinabbauwege, durch einen erhöhten Umsatz der fehlgefalteten Proteine, nützlich sein. So wurde mit mTOR-Inhibitoren gezeigt, daß dadurch induzierte Autophagie Polyglutaminaggregate abbauen kann (Shao and Diamond, 2007). In vielen Aggregationskrankheiten sind Caspasen aktiviert, die Proteine proteolytisch spalten und Apoptose induzieren. Der Einsatz von Caspaseinhibitoren scheint daher gewinnbringend zu sein. Die Verhinderung oder Auflösen von Proteinaggregaten ist ein weiterer Schwerpunkt der Forschung und soll durch die Behandlung von Proteinaggregaten mit chemischen und molekularen Chaperonen erreicht werden (Chaudhuri and Paul, 2006). Chemische Chaperone sind Substanzen wie z.B. Glycerol, DMSO, Peptidomimetika, Trimethylamin-N-oxid (TMAO), Porphyrine und Anthracycline. *In vitro* beschleunigen chemische Chaperone die Faltung und Oligomerbildung von Proteinen unter

anderem durch Reduzierung der Lösungsmittel-zugänglichen Oberfläche der Proteine. In Zellkultur wird die Bildung von fehlgefalteten Konformationen verhindert. Allen Substanzen gemeinsam ist ein geringes Molekulargewicht. Ein therapeutischer Einsatz ist durch die mangelnde Spezifität und die benötigten mikromolaren Konzentrationen bisher nicht möglich (Chaudhuri and Paul, 2006). Eine weitere Möglichkeit, die Überexpression von molekularen Chaperonen, zeigt zumindest im Mausmodell einen starken Effekt auf die Aggregatbildung (Sherman and Goldberg, 2001). Auch durch pharmakologische Stoffe wie Geldanamycin konnte Hsp70 induziert, und dadurch verstärkt Aggregate abgebaut werden (Shao and Diamond, 2007). Außerdem wurden kleine Moleküle entwickelt, die direkt Aggregate binden und auflösen. Trotz erfolgreicher Zellkulturexperimente waren die Ergebnisse im Mausmodell nicht so eindeutig, was daran liegen kann, daß zwar Aggregate verhindert werden, aber die initiale pathologische Fehlfaltung des mutanten Proteins nicht verhindert wird. Die Stabilisierung der nativen Konformation ist ein anderes vielversprechendes Konzept. So konnten Polyglutaminaggregate durch die Expression des Polyglutamin-bindenden Peptides (QBP1) beeinflußt werden, durch Verschieben des Gleichgewichts zwischen toxischen und nicht-toxischen Konformationen (Shao and Diamond, 2007). Außerdem wird versucht, die Konformationsänderungen der Proteine zu inhibieren oder revertieren. Durch kurze synthetische Peptide soll eine Destabilisierung des fehlgefalteten Proteins erreicht werden (Soto, 2001). Da in vielen Proteinkonformationserkrankungen das aggregierte Protein reich an β -Faltblattstrukturen ist, wurden speziell Peptide gegen β -Faltblätter entwickelt (Soto, 2001). Um die Konformation von aggregierten Proteinen zu beeinflussen, können auch Aptamere benutzt werden (Lee et al., 2006). Weitere Versuche der Behandlung von Aggregationskrankheiten zielen auf die direkte Modulation der Expression des mutanten Proteins. Im weiteren Sinn werden alle Methoden, die auf dem Weg vom Gen zum Protein regulierend eingreifen, als Gentherapie bezeichnet. Für Keratinmutationen wurde gezeigt, daß der Effekt von Mutationen abhängig vom Mengenverhältnis zum wt Protein ist. Erst bei einem Verhältnis von 1:2 kommt es zur Ausbildung des Phänotyps (Cao et al., 2001). D.h., dominant-negative Mutationen können *in vivo* durch wt Keratin titriert werden. Dies hat auch Bedeutung für mögliche Therapieansätze wie die Gentherapie, da die vollständige Ausschaltung des mutanten Allels nicht notwendig erscheint (Hesse et al., 2007). Therapieansätze, die auf proliferierenden Zellen und Proteinexpression

basieren, sind in den postmitotischen Linsenfaserzellen allerdings nicht geeignet. Die Behandlung bzw. Verhinderung von Katarakten ist besonders schwierig, da die Kataraktbildung von vielen Faktoren bestimmt wird. Auch sind die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen, die auch insbesondere zur Ausprägung der unterschiedlichen Kataraktformen führen, kaum verstanden. Daher bleiben trotz vieler neuer Konzepte und Substanzen zur Behandlung bisher nur die Operation und der Ersatz der Linse.

5.3 Vimentin-Stat3-Interaktion

Signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) ist ein Transkriptionsfaktor, der in unstimulierten Zellen im Zytoplasma lokalisiert ist. Nach Stimulation von Transmembranrezeptoren für Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Hormone, wie z.B. EGFR, FGFR, HGFR, PDGFR und Rezeptoren für Interleukin 6 und 10, wird Stat3 durch deren Rezeptortyrosinkinaseaktivität an Tyrosin705 phosphoryliert. Daraufhin bilden sich Stat-Dimere, die in den Zellkern wandern und dort direkt die Transkription von Zielgenen regulieren (Levy and Darnell, 2002; Schindler et al., 2007) (Abb. 5.5 A). Stat3 hat vielfältige biologische Aktivitäten, die vom jeweiligen Zelltyp und dem exprimierenden Gewebe abhängen (Desrivieres et al., 2006). Auch in vielen Krebsarten wird Stat3 überexprimiert (Deng et al., 2007). Im Gehirn wird Stat3 in allen Gliazellen exprimiert (Gautron et al., 2006) und ist in Zellkultur entscheidend für die Differenzierung von Astrozyten (Sriram et al., 2004). In den letzten Jahren gewann der Jak/Stat-Signalweg zusätzliche Komplexität durch die Entdeckung, daß abweichend von der kanonischen Vorstellung, auch unphosphorylierte Stat-Moleküle in den Zellkern transportiert werden und dort die Transkription von Zielgenen steuern (Sehgal, 2008).

Mit Hilfe bioinformatischer Methoden wurde die humane Vimentin Proteinsequenz auf bekannte Protein-bindende Domänen untersucht. Dabei wurde eine putative Stat3-bindende Sequenz im 2B-Bereich der 'rod'-Domäne identifiziert. Diese Sequenz ist im Vimentinmolekül zwischen den Spezies Mensch, Maus und Fisch konserviert. Außerdem ist die Stat3-bindende Sequenz in den humanen Typ III IF-Proteinen Desmin und GFAP konserviert. In transfizierten MCF-7 Zellen konnte eine partielle Kollokalisierung von Stat3 und Vimentin gezeigt werden. Dies weist auf eine mögliche physiologische Bedeutung der Vimentin-Stat3-Interaktion hin. Vim Δ C2B

transgene Mäuse zeigen zusätzlich zum Kataraktphänotyp der Linse eine erhöhte GFAP-Expression im Linsenepithel und in den Gliazellen der Retina. Im Unterschied zu den Linsenfaserzellen sind in den Epithelzellen aber keine Vimentinaggregate enthalten. Dies könnte daran liegen, daß die Epithelzellen die einzigen proliferierenden Zellen der Linse sind und durch eine erhöhte Metabolismusrate einen verstärkten Proteinumsatz aufweisen. Linsenepithelzellen exprimieren neben Vimentin auch GFAP als weiteres IF-Protein, wobei die Funktion noch nicht verstanden ist (Hatfield et al., 1984). Da Vimentin und GFAP Heteropolymere bilden können und mutantes Vimentin in den Linsenfaserzellen zumindest teilweise in wt Filamente inkorporiert wurde, ist eine weitere Möglichkeit der Einbau von mutantern Vimentin in GFAP-Filamente der Epithelzellen. Eine deutlich erhöhte GFAP-Menge titriert sozusagen die geringere Menge an mutantern Vimentin und verhindert so eine Aggregation.

In den Astrozyten der Retina wurden in Vim Δ C2B transgenen Mäusen ebenfalls Vimentinaggregate und eine erhöhte GFAP-Expression nachgewiesen (Meier-Bornheim, 2006). Erhöhte GFAP-Expression ist in Astrozyten ein Charakteristikum der Astrogliose, einem Prozeß, der im Gehirn bei Alterung, Neurodegeneration und vor allem Verletzung auftritt (Eng and Ghirnikar, 1994; Pekny and Nilsson, 2005). Man spricht auch von aktivierten Astrozyten bzw. von reaktiver Gliose. Reaktive Gliose ist mit verschiedenen Erkrankungen der Retina assoziiert und wird durch Ablösung der Netzhaut, Photorezeptorschädigung, Ischämie oder Trauma induziert (Bringmann et al., 2006). Die erhöhte GFAP-Expression wurde von einer Relokalisation von Stat3 in den Zellkern von Astrozyten begleitet. Allerdings konnten keine morphologischen Veränderungen der Zellen, wie sie in der reaktiven Gliose typischerweise auftreten, nachgewiesen werden. Somit wird zum ersten Mal eine Rolle von Vimentin in der Regulation der Expression eines anderen IF-Proteins *in vivo* gezeigt. Mechanistisch könnte dies wie folgt ablaufen. Vimentin bindet im Zytoplasma Stat3 und reguliert dadurch die Menge an im Zellkern verfügbarem Transkriptionsfaktor. Da jedes Vimentinmolekül eine potentielle Stat3-Bindungsstelle aufweist, könnten theoretisch sehr viele Stat3-Moleküle gebunden, und auch in subzellulären Regionen lokalisiert werden. Kommt es nun aufgrund von Mutationen zur Aggregation von Vimentin oder die postulierte Bindungsstelle ist im Molekül nicht mehr vorhanden, wie in Vim Δ C2B, ist keine Stat3-Interaktion mehr möglich. Als Konsequenz steht mehr Stat3 zur Verfügung und die Expression von GFAP wird

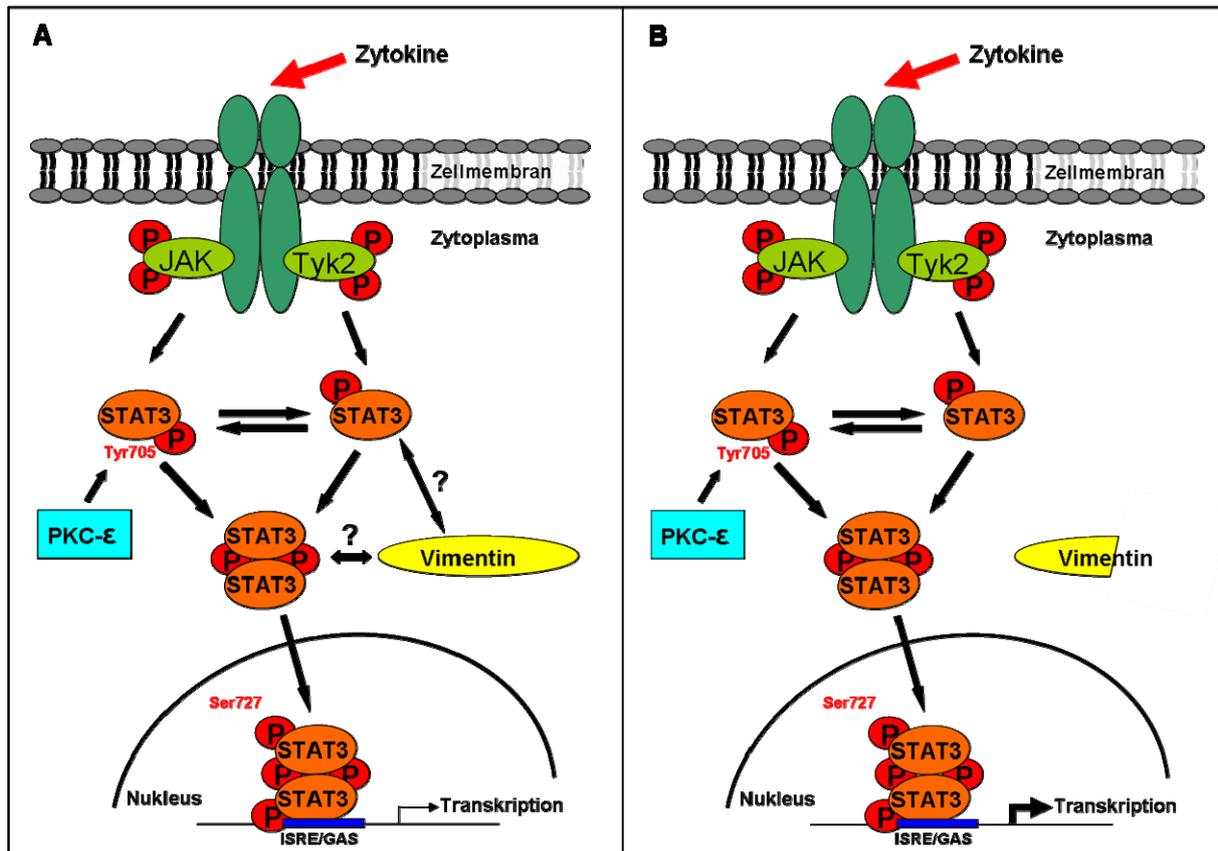


Abb. 5.5: Modell der Vimentin-abhängigen Regulation von Stat3-Zielgenen.

Schematisch ist der Jak/Stat-Signalweg dargestellt. Durch Zytokine wie z.B. IL6, kommt es zur Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen. Diese dimerisieren und autophosphorylieren ihre zytoplasmatische Domäne. Ein mögliches Substrat der Kinase ist ein Tyrosinrest in Stat3. Die Phosphorylierung führt zur Dimerbildung. Die Stat-Dimere werden in den Zellkern transportiert, wo die Transkription von Genen mit entsprechenden regulatorischen Elementen gesteuert wird. Die Stat3-Aktivität kann durch zusätzliche Serinphosphorylierung modifiziert werden. (A) zeigt die Situation in wt Zellen. Vimentin interagiert mit Stat3 Mono- und/ oder Dimeren und reguliert dadurch die Menge an aktiviertem Stat3, die im Zellkern zur Regulation der Zielgene zur Verfügung steht. (B) In Vim Δ C2B exprimierenden Zellen ist aufgrund der fehlenden 2B-Domäne, die das Stat-Bindemotiv enthält, keine Interaktion zwischen Stat3 und Vimentin möglich. Dadurch kann Stat3 nicht im Zytoplasma sequestriert werden und es kommt im Zellkern zu einer erhöhten Transkription von Stat-Zielgenen.

erhöht (Abb. 5.5). Die Vimentin-Stat3-Interaktion reguliert so nach diesem Modell möglicherweise die GFAP-Expression und Vimentin stellt einen neuen Partner in der Stat-Signalkaskade dar. Vimentin muß für die Interaktion mit Stat3 am Tyrosin319 der Stat-bindenden Sequenz YXXQ phosphoryliert werden. Eine Kinase, die diesen Tyrosinrest im Vimentinmolekül phosphoryliert, wurde bisher nicht identifiziert (Izawa and Inagaki, 2006). Die Zugänglichkeit der im Vimentin-Monomer vorhergesagten Stat3-Bindungsstelle in der dreidimensionalen Anordnung der Vimentinmoleküle zum Filament ist entscheidend für die putative Vimentin-Stat3-Interaktion. Aufgrund fehlender Kristallstrukturdaten sind die Zugänglichkeit im Filament und die Anzahl der putativen Stat3-Bindungsstellen nicht geklärt. *In vitro* wurde eine Bindung von Stat3 an den humanen Vimentinpromoter demonstriert (Wu et al., 2004). Zusammen

mit dem beschriebenen Modell der Vimentin-Stat3-Interaktion ergibt sich so ein möglicher Autoregulationsmechanismus der Vimentinexpression.

6 Ausblick

Die Analyse der Vimentin-transgenen Mäuse wurde auf den prominenten Phänotyp in der Linse fokussiert. Ein Aspekt, der bisher nicht untersucht wurde, sind die Vimentin-exprimierenden Zellen des hämatopoetischen Systems. Durch Blutabstriche könnte eine mögliche Veränderung dieser Zellen, sowie eine potentielle Funktion von Vimentin in der Migration und Adhäsion von Immunzellen untersucht werden. Außerdem ist die Interaktion von Vimentin mit Proteinen der Plakinfamilie und dadurch mit membranständigen Adhäsionskomplexen noch nicht genau verstanden. Dazu könnte die Linse mit nur 2 unterschiedlichen Zelltypen als Modell dienen. Die Untersuchungen sollten Aufschluß darüber geben, wie das Vimentinfilamentsystem zusammen mit Adhäsionsstrukturen die mechanische Stabilität der Linsenfaserzellen gewährleistet.

Im Lauf dieser Arbeit wurden Fibroblasten, welche die VimR113C und VimE151K Mutationen stabil exprimieren, sowie Vimentin-defiziente Fibroblasten generiert. Diese Zelllinien können für weitere Funktionsstudien genutzt werden.

Mit der VimR113C Maus steht ein Modell für die Entstehung von Katarakten und damit auch für Proteinaggregationskrankheiten zur Verfügung. Da es bisher keine etablierte Zelllinie von Linsenfaserzellen gibt, könnte eine Organokultur von VimR113C Linsen etabliert werden. Daran könnten dann Möglichkeiten der Behandlung oder Verhinderung von Proteinaggregaten, wie z.B. kleine Moleküle oder im Rahmen des GRK 804 Aptamere, getestet werden. Falls Substanzen topisch aufgebracht werden können, können diese auch direkt am Auge von VimR113C Mäusen getestet werden. In Zellkultur könnte der Mechanismus der Aggregation untersucht werden, und welche Rolle die Chaperonmaschinerie beim Abbau von Proteinaggregaten und in der Entstehung von Katarakten spielt. Dabei könnten auch Zellen verwendet werden, die mutierte Chaperone exprimieren.

Um den Zusammenhang zwischen Vimentinmutationen und der Entwicklung eines menschlichen Katarakts weiter zu verstehen, sollten zusätzliche Kataraktpatienten auf Mutationen im Vimentingen analysiert werden. Dabei ist die Identifikation weiterer Katarakt-assoziiertes Mutationen zu erwarten. Nach Möglichkeit sollte in diesem Zusammenhang der genetische Hintergrund der Familien der Kataraktpatienten mit untersucht werden. Da die Linse bei einer Kataraktoperation zerstört wird, kann der *in vivo* Pathomechanismus in diesem Gewebe nicht analysiert werden. Von der

identifizierten und *in vitro* charakterisierten Vimentin E151K Mutation sollte eine transgene Mauslinie generiert werden, um den postulierten Mechanismus der Kataraktentstehung im *in vivo* Modell zu untersuchen. Die VimE151K transgene Mauslinie könnte auf den genetischen Vimentin 'knock-out' Hintergrund zurückgekreuzt werden. In einer Situation ohne endogenes Vimentin würde man potentiell einen verstärkten Phänotyp der VimE151K Mutation, die in Zellkultur eine geringere Aggregatbildung als die VimR113C Mutante aufwies, erwarten. Desweiteren ist bisher sowohl in Vimentin 'knock-out' als auch transgenen Tieren nicht untersucht, welche Bedeutung Vimentin für die Sehleistung eines Organismus hat.

Um weitere Erkenntnisse über die Vimentin-Stat3-Interaktion zu gewinnen, sollten die Kolokalisationsstudien mit dem kompletten Vimentinmolekül in MCF-7 Zellen wiederholt werden und mittels Konfokalmikroskopie in Stapelaufnahmen analysiert werden. Dabei sollten die Fluoreszenzintensitäten ausgemessen werden, um das Ausmaß der Interaktion zu quantifizieren. Durch dieses Experiment können Erkenntnisse über die Verteilung innerhalb der Zelle und eine mögliche subzelluläre Lokalisation der Interaktion gewonnen werden. Eine zusätzliche Möglichkeit wäre die Generierung einer Vimentinmutante, die nicht phosphoryliert werden kann. Diese sollte dann keine Vimentin-Stat3-Interaktion mehr zeigen. Außerdem sollte die potentielle Interaktion in Zellen wie z.B. Fibroblasten untersucht werden, die natürlicherweise Vimentin exprimieren und keine Situation der Überexpression darstellen. Ein biochemischer Nachweis der Interaktion durch Immunpräzipitation war aufgrund der schlechten Löslichkeit von Vimentin nicht möglich. Auch ein GST-pull down Experiment war nicht erfolgreich. Eventuell kann *in vitro* durch zellfreie Koexpression oder ein Gel-overlay Experiment, sowie in Zellkultur durch die BiFC-Methode eine Interaktion direkt nachgewiesen werden. Ein weiterer wichtiger Punkt der Analyse ist die Identifikation der Kinase und des entsprechenden Signalweges, die potentiell Vimentin an Tyrosin319 phosphoryliert.

7 Zusammenfassung

Vimentin ist das IF-Protein in den Zellen mesenchymalen Ursprungs. In bisherigen *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen wurde noch kein Bezug zwischen Vimentin und einer spezifischen humanen Erkrankung gezeigt. In der vorliegenden Arbeit wurde in 90 Kataraktpatienten nach Mutationen im Vimentingen gesucht und in einer Patientin wurde eine Vimentinmutation G596A im Exon1 identifiziert. Diese Missensemutation führt zu einem Aminosäureaustausch E151K im 1B-Bereich der 'rod'-Domäne und wurde bisher in keiner anderen IF-Erkrankung beschrieben. Die *in vitro* Charakterisierung dieser Vimentinmutation ergab einen kinetischen Defekt der Filamentbildung sowie die Bildung von Proteinaggregaten in Zellkultur. Mechanistisch verursacht die Vimentin E151K Mutation *in vitro* eine um 60 % erhöhte Proteasomenaktivität. Dadurch konnte zum ersten Mal eine Assoziation von Vimentin mit einer genetisch bedingten humanen Erkrankung gezeigt werden.

Im *in vivo* System der Maus wurde die Expression und Funktion der Vimentin R113C Mutation, in Analogie zu Krankheits-verursachenden Mutationen in den IF-Proteinen Desmin und Keratinen, untersucht. Die Gewebe-spezifische Expression der dominant negativen Mutation R113C bewirkte in allen Geweben eine Störung des endogenen Vimentinfilamentsystems, verursachte aber nur in der Linse einen pathologischen Phänotyp in Form eines Katarakts. Die Kataraktbildung wird begleitet von extensiver Proteinaggregation in den Linsenfaserzellen, einer erhöhten Ubiquitylierung von Vimentin, erhöhter Hsp70-Expression und Proteasomenaktivität sowie von Einstülpungen der Plasmamembran. Überraschenderweise enthalten die sekundären postmitotischen Linsenfaserzellen keine Aggregate, was einen aktiven Abbau nahelegt. Zum ersten Mal konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß die Expression von mutantern Vimentin *in vivo* eine Streßantwort der Zelle auslöst und daß Vimentin eine entscheidende Funktion für die Integrität der Linse hat.

Mit Hilfe von bioinformatischen Vorhersagen und Zellkulturexperimenten wurde eine potentielle Funktion von Vimentin in der Sequestrierung des Transkriptionsfaktors Stat3, und damit indirekt in der transkriptionellen Regulation der Expression, postuliert. Dies muß durch weitere Experimente bestätigt werden.

Durch die Verfügbarkeit von Maus- und Zellkulturmodellen besteht die Möglichkeit, die Mechanismen der Kataraktbildung infolge von IF-Mutationen sowie neue Therapieansätze zur Behandlung von Proteinaggregaten weiter zu untersuchen.

8 Literaturverzeichnis

Aguzzi, A. (2009). Cell biology: Beyond the prion principle. *Nature* **459**, 924-5.

Aigelsreiter, A., Janig, E., Stumptner, C., Fuchsbichler, A., Zatloukal, K. and Denk, H. (2007). How a cell deals with abnormal proteins. Pathogenetic mechanisms in protein aggregation diseases. *Pathobiology* **74**, 145-58.

Alizadeh, A., Clark, J., Seeberger, T., Hess, J., Blankenship, T. and FitzGerald, P. G. (2003). Targeted deletion of the lens fiber cell-specific intermediate filament protein filensin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**, 5252-8.

Alizadeh, A., Clark, J. I., Seeberger, T., Hess, J., Blankenship, T., Spicer, A. and FitzGerald, P. G. (2002). Targeted genomic deletion of the lens-specific intermediate filament protein CP49. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 3722-7.

Andley, U. P. (2007). Crystallins in the eye: Function and pathology. *Prog Retin Eye Res* **26**, 78-98.

Anfinsen, C. B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223-30.

Arndt, V., Rogon, C. and Hohfeld, J. (2007). To be, or not to be--molecular chaperones in protein degradation. *Cell Mol Life Sci* **64**, 2525-41.

Bachmann, S., Kriz, W., Kuhn, C. and Franke, W. W. (1983). Differentiation of cell types in the mammalian kidney by immunofluorescence microscopy using antibodies to intermediate filament proteins and desmoplakins. *Histochemistry* **77**, 365-94.

Bär, H., Mücke, N., Katus, H. A., Aebi, U. and Herrmann, H. (2007). Assembly defects of desmin disease mutants carrying deletions in the alpha-helical rod domain are rescued by wild type protein. *J Struct Biol* **158**, 107-15.

Bär, H., Mücke, N., Kostareva, A., Sjoberg, G., Aebi, U. and Herrmann, H. (2005). Severe muscle disease-causing desmin mutations interfere with in vitro filament assembly at distinct stages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15099-104.

Bär, H., Strelkov, S. V., Sjoberg, G., Aebi, U. and Herrmann, H. (2004). The biology of desmin filaments: how do mutations affect their structure, assembly, and organisation? *J Struct Biol* **148**, 137-52.

Baruch, A., Greenbaum, D., Levy, E. T., Nielsen, P. A., Gilula, N. B., Kumar, N. M. and Bogoy, M. (2001). Defining a link between gap junction communication, proteolysis, and cataract formation. *J Biol Chem* **276**, 28999-9006.

Bassnett, S. (2002). Lens organelle degradation. *Exp Eye Res* **74**, 1-6.

Benedek, G. B., Pande, J., Thurston, G. M. and Clark, J. I. (1999). Theoretical and experimental basis for the inhibition of cataract. *Prog Retin Eye Res* **18**, 391-402.

Berry, V., Francis, P., Reddy, M. A., Collyer, D., Vithana, E., MacKay, I., Dawson, G., Carey, A. H., Moore, A., Bhattacharya, S. S. et al. (2001). Alpha-B crystallin gene (CRYAB) mutation causes dominant congenital posterior polar cataract in humans. *Am J Hum Genet* **69**, 1141-5.

- Bornheim, R., Muller, M., Reuter, U., Herrmann, H., Bussow, H. and Magin, T. M.** (2008). A dominant vimentin mutant upregulates Hsp70 and the activity of the ubiquitin-proteasome system, and causes posterior cataracts in transgenic mice. *J Cell Sci* **121**, 3737-46.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Brehmer, D., Rudiger, S., Gassler, C. S., Klostermeier, D., Packschies, L., Reinstein, J., Mayer, M. P. and Bukau, B.** (2001). Tuning of chaperone activity of Hsp70 proteins by modulation of nucleotide exchange. *Nat Struct Biol* **8**, 427-32.
- Brenner, M., Johnson, A. B., Boespflug-Tanguy, O., Rodriguez, D., Goldman, J. E. and Messing, A.** (2001). Mutations in GFAP, encoding glial fibrillary acidic protein, are associated with Alexander disease. *Nat Genet* **27**, 117-20.
- Bridges, D. and Moorhead, G. B.** (2005). 14-3-3 proteins: a number of functions for a numbered protein. *Sci STKE* **2005**, re10.
- Bringmann, A., Pannicke, T., Grosche, J., Francke, M., Wiedemann, P., Skatchkov, S. N., Osborne, N. N. and Reichenbach, A.** (2006). Muller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res* **25**, 397-424.
- Brody, J. R. and Kern, S. E.** (2004). Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *BioTechniques* **36**, 214-6.
- Bröhl, D.** (2002). In vivo Charakterisierung von Vimentin- und Keratin 18-Mutationen. *Diplomarbeit, Universität Bonn*, 1-117.
- Brown, K. D. and Binder, L. I.** (1992). Identification of the intermediate filament-associated protein gyronemin as filamin. Implications for a novel mechanism of cytoskeletal interaction. *J Cell Sci* **102 (Pt 1)**, 19-30.
- Brown, M. J., Hallam, J. A., Colucci-Guyon, E. and Shaw, S.** (2001). Rigidity of circulating lymphocytes is primarily conferred by vimentin intermediate filaments. *J Immunol* **166**, 6640-6.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. and Short, J. M.** (1987). XI1-Blue: A High Efficiency Plasmid Transforming recA Escherichia coli Strain With Beta-Galactosidase Selection. *Biotechniques* **5**, 376-378.
- Burkhard, P., Stetefeld, J. and Strelkov, S. V.** (2001). Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol* **11**, 82-8.
- Byun, Y., Chen, F., Chang, R., Trivedi, M., Green, K. J. and Cryns, V. L.** (2001). Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis. *Cell Death Differ* **8**, 443-50.
- Campbell, N. A.** (1997). *Biologie. Spektrum Akademischer Verlag.*
- Cao, T., Longley, M. A., Wang, X. J. and Roop, D. R.** (2001). An inducible mouse model for epidermolysis bullosa simplex: implications for gene therapy. *J Cell Biol* **152**, 651-6.
- Capetanaki, Y., Smith, S. and Heath, J. P.** (1989). Overexpression of the vimentin gene in transgenic mice inhibits normal lens cell differentiation. *J Cell Biol* **109**, 1653-64.

- Chaudhuri, T. K. and Paul, S.** (2006). Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches. *Febs J* **273**, 1331-49.
- Chou, Y. H., Flitney, F. W., Chang, L., Mendez, M., Grin, B. and Goldman, R. D.** (2007). The motility and dynamic properties of intermediate filaments and their constituent proteins. *Exp Cell Res* **313**, 2236-43.
- Chung, J., Berthoud, V. M., Novak, L., Zoltoski, R., Heilbrunn, B., Minogue, P. J., Liu, X., Ebihara, L., Kuszak, J. and Beyer, E. C.** (2007). Transgenic overexpression of connexin50 induces cataracts. *Exp Eye Res* **84**, 513-28.
- Clement, S., Velasco, P. T., Murthy, S. N., Wilson, J. H., Lukas, T. J., Goldman, R. D. and Lorand, L.** (1998). The intermediate filament protein, vimentin, in the lens is a target for cross-linking by transglutaminase. *J Biol Chem* **273**, 7604-9.
- Cochard, P. and Paulin, D.** (1984). Initial expression of neurofilaments and vimentin in the central and peripheral nervous system of the mouse embryo in vivo. *J Neurosci* **4**, 2080-94.
- Colucci-Guyon, E., Gimenez, Y. R. M., Maurice, T., Babinet, C. and Privat, A.** (1999). Cerebellar defect and impaired motor coordination in mice lacking vimentin. *Glia* **25**, 33-43.
- Colucci-Guyon, E., Portier, M. M., Dunia, I., Paulin, D., Pournin, S. and Babinet, C.** (1994). Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype. *Cell* **79**, 679-94.
- Conley, Y. P., Erturk, D., Keverline, A., Mah, T. S., Keravala, A., Barnes, L. R., Bruchis, A., Hess, J. F., FitzGerald, P. G., Weeks, D. E. et al.** (2000). A juvenile-onset, progressive cataract locus on chromosome 3q21-q22 is associated with a missense mutation in the beaded filament structural protein-2. *Am J Hum Genet* **66**, 1426-31.
- Conway, B. R.** (2008). Recent patents on ocular drug delivery systems. *Recent Pat Drug Deliv Formul* **2**, 1-8.
- Correia, I., Chu, D., Chou, Y. H., Goldman, R. D. and Matsudaira, P.** (1999). Integrating the actin and vimentin cytoskeletons. adhesion-dependent formation of fimbrin-vimentin complexes in macrophages. *J Cell Biol* **146**, 831-42.
- Coulombe, P. A., Hutton, M. E., Letai, A., Hebert, A., Paller, A. S. and Fuchs, E.** (1991). Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: genetic and functional analyses. *Cell* **66**, 1301-11.
- Coulombe, P. A. and Omary, M. B.** (2002). 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 110-22.
- Coulombe, P. A. and Wong, P.** (2004). Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds. *Nat Cell Biol* **6**, 699-706.
- Crick, F. H.** (1952). Is alpha-keratin a coiled coil? *Nature* **170**, 882-3.
- Dahm, R.** (1999). Lens fibre cell differentiation - A link with apoptosis? *Ophthalmic Res* **31**, 163-83.
- Delaye, M. and Tardieu, A.** (1983). Short-range order of crystallin proteins accounts for eye lens transparency. *Nature* **302**, 415-7.

- Dellagi, K., Vainchenker, W., Vinci, G., Paulin, D. and Brouet, J. C.** (1983). Alteration of vimentin intermediate filament expression during differentiation of human hemopoietic cells. *Embo J* **2**, 1509-14.
- Deng, J., Grande, F. and Neamati, N.** (2007). Small molecule inhibitors of Stat3 signaling pathway. *Curr Cancer Drug Targets* **7**, 91-107.
- Desrivieres, S., Kunz, C., Barash, I., Vafaizadeh, V., Borghouts, C. and Groner, B.** (2006). The biological functions of the versatile transcription factors STAT3 and STAT5 and new strategies for their targeted inhibition. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **11**, 75-87.
- Djabali, K., de Nechaud, B., Landon, F. and Portier, M. M.** (1997). AlphaB-crystallin interacts with intermediate filaments in response to stress. *J Cell Sci* **110 (Pt 21)**, 2759-69.
- Dunia, I., Pieper, F., Manenti, S., van de Kemp, A., Devilliers, G., Benedetti, E. L. and Bloemendal, H.** (1990). Plasma membrane-cytoskeleton damage in eye lenses of transgenic mice expressing desmin. *Eur J Cell Biol* **53**, 59-74.
- Eckes, B., Colucci-Guyon, E., Smola, H., Nodder, S., Babinet, C., Krieg, T. and Martin, P.** (2000). Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin. *J Cell Sci* **113 (Pt 13)**, 2455-62.
- Eckes, B., Dogic, D., Colucci-Guyon, E., Wang, N., Maniotis, A., Ingber, D., Merckling, A., Langa, F., Aumailley, M., Delouvee, A. et al.** (1998). Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. *J Cell Sci* **111 (Pt 13)**, 1897-907.
- Ecroyd, H. and Carver, J. A.** (2009). Crystallin proteins and amyloid fibrils. *Cell Mol Life Sci* **66**, 62-81.
- Ehret, G. B., Reichenbach, P., Schindler, U., Horvath, C. M., Fritz, S., Nabholz, M. and Bucher, P.** (2001). DNA binding specificity of different STAT proteins. Comparison of in vitro specificity with natural target sites. *J Biol Chem* **276**, 6675-88.
- Eng, L. F. and Ghirnikar, R. S.** (1994). GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol* **4**, 229-37.
- Eriksson, J. E., He, T., Trejo-Skalli, A. V., Harmala-Brasken, A. S., Hellman, J., Chou, Y. H. and Goldman, R. D.** (2004). Specific in vivo phosphorylation sites determine the assembly dynamics of vimentin intermediate filaments. *J Cell Sci* **117**, 919-32.
- Eshagian, J., Rafferty, N. S. and Goossens, W.** (1981). Human cataracta complicata. Clinicopathologic correlation. *Ophthalmology* **88**, 155-63.
- Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G. and Bishop, J. M.** (1985). Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* **5**, 3610-6.
- Evans, R. M.** (1998). Vimentin: the conundrum of the intermediate filament gene family. *Bioessays* **20**, 79-86.
- Faigle, W., Colucci-Guyon, E., Louvard, D., Amigorena, S. and Galli, T.** (2000). Vimentin filaments in fibroblasts are a reservoir for SNAP23, a component of the membrane fusion machinery. *Mol Biol Cell* **11**, 3485-94.
- Ferrari, S., Battini, R., Kaczmarek, L., Rittling, S., Calabretta, B., de Riel, J. K., Philiponis, V., Wei, J. F. and Baserga, R.** (1986). Coding sequence and growth regulation of the human vimentin gene. *Mol Cell Biol* **6**, 3614-20.

- Foisner, R., Bohn, W., Mannweiler, K. and Wiche, G.** (1995). Distribution and ultrastructure of plectin arrays in subclones of rat glioma C6 cells differing in intermediate filament protein (vimentin) expression. *J Struct Biol* **115**, 304-17.
- Francis, P., Berry, V., Bhattacharya, S. and Moore, A.** (2000). Congenital progressive polymorphic cataract caused by a mutation in the major intrinsic protein of the lens, MIP (AQP0). *Br J Ophthalmol* **84**, 1376-9.
- Francis, P. J., Berry, V., Moore, A. T. and Bhattacharya, S.** (1999). Lens biology: development and human cataractogenesis. *Trends Genet* **15**, 191-6.
- Franke, W. W., Grund, C., Kuhn, C., Jackson, B. W. and Illmensee, K.** (1982). Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. III. Primary mesenchymal cells and the first appearance of vimentin filaments. *Differentiation* **23**, 43-59.
- Franke, W. W., Hergt, M. and Grund, C.** (1987). Rearrangement of the vimentin cytoskeleton during adipose conversion: formation of an intermediate filament cage around lipid globules. *Cell* **49**, 131-41.
- Franke, W. W., Schmid, E., Osborn, M. and Weber, K.** (1978). Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 5034-8.
- Franke, W. W., Schmid, E., Winter, S., Osborn, M. and Weber, K.** (1979). Widespread occurrence of intermediate-sized filaments of the vimentin-type in cultured cells from diverse vertebrates. *Exp Cell Res* **123**, 25-46.
- Fuchs, E.** (1997). Keith R. Porter Lecture, 1996. Of mice and men: genetic disorders of the cytoskeleton. *Mol Biol Cell* **8**, 189-203.
- Fuchs, E. and Cleveland, D. W.** (1998). A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* **279**, 514-9.
- Fuchs, E. and Weber, K.** (1994). Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem* **63**, 345-82.
- Furst, D. O., Osborn, M. and Weber, K.** (1989). Myogenesis in the mouse embryo: differential onset of expression of myogenic proteins and the involvement of titin in myofibril assembly. *J Cell Biol* **109**, 517-27.
- Gao, Y. and Sztul, E.** (2001). A novel interaction of the Golgi complex with the vimentin intermediate filament cytoskeleton. *J Cell Biol* **152**, 877-94.
- Gautron, L., De Smedt-Peyrusse, V. and Laye, S.** (2006). Characterization of STAT3-expressing cells in the postnatal rat brain. *Brain Res* **1098**, 26-32.
- Getsios, S., Amargo, E. V., Dusek, R. L., Ishii, K., Sheu, L., Godsel, L. M. and Green, K. J.** (2004). Coordinated expression of desmoglein 1 and desmocollin 1 regulates intercellular adhesion. *Differentiation* **72**, 419-33.
- Gillard, B. K., Harrell, R. G. and Marcus, D. M.** (1996). Pathways of glycosphingolipid biosynthesis in SW13 cells in the presence and absence of vimentin intermediate filaments. *Glycobiology* **6**, 33-42.

- Gillard, B. K., Heath, J. P., Thurmon, L. T. and Marcus, D. M.** (1991). Association of glycosphingolipids with intermediate filaments of human umbilical vein endothelial cells. *Exp Cell Res* **192**, 433-44.
- Godsel, L. M., Hobbs, R. P. and Green, K. J.** (2008). Intermediate filament assembly: dynamics to disease. *Trends Cell Biol* **18**, 28-37.
- Goldfarb, L. G. and Dalakas, M. C.** (2009). Tragedy in a heartbeat: malfunctioning desmin causes skeletal and cardiac muscle disease. *J Clin Invest* **119**, 1806-13.
- Goldfarb, L. G., Vicart, P., Goebel, H. H. and Dalakas, M. C.** (2004). Desmin myopathy. *Brain* **127**, 723-34.
- Gonzales, M., Weksler, B., Tsuruta, D., Goldman, R. D., Yoon, K. J., Hopkinson, S. B., Flitney, F. W. and Jones, J. C.** (2001). Structure and function of a vimentin-associated matrix adhesion in endothelial cells. *Mol Biol Cell* **12**, 85-100.
- Gotz, W., Theuring, F., Favor, J. and Herken, R.** (1991). Eye pathology in transgenic mice carrying a MSV-SV 40 large T-construct. *Exp Eye Res* **52**, 41-9.
- Granger, B. L. and Lazarides, E.** (1984). Expression of the intermediate-filament-associated protein synemin in chicken lens cells. *Mol Cell Biol* **4**, 1943-50.
- Graw, J.** (1996). Genetic aspects of embryonic eye development in vertebrates. *Dev Genet* **18**, 181-97.
- Graw, J.** (2003). The genetic and molecular basis of congenital eye defects. *Nat Rev Genet* **4**, 876-88.
- Graw, J.** (2004). Congenital hereditary cataracts. *Int J Dev Biol* **48**, 1031-44.
- Graw, J.** (2009). Genetics of crystallins: cataract and beyond. *Exp Eye Res* **88**, 173-89.
- Green, H. and Kehinde, O.** (1976). Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell* **7**, 105-13.
- Green, H. and Meuth, M.** (1974). An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* **3**, 127-33.
- Green, K. J., Bohringer, M., Gocken, T. and Jones, J. C.** (2005). Intermediate filament associated proteins. *Adv Protein Chem* **70**, 143-202.
- Gregersen, N., Bross, P., Vang, S. and Christensen, J. H.** (2006). Protein misfolding and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **7**, 103-24.
- Grigoryan, G. and Keating, A. E.** (2008). Structural specificity in coiled-coil interactions. *Curr Opin Struct Biol* **18**, 477-83.
- Gyoeva, F. K. and Gelfand, V. I.** (1991). Coalignment of vimentin intermediate filaments with microtubules depends on kinesin. *Nature* **353**, 445-8.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-80.
- Harding, J. J.** (2002). Viewing molecular mechanisms of ageing through a lens. *Ageing Res Rev* **1**, 465-79.

- Hartl, F. U. and Hayer-Hartl, M.** (2009). Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 574-81.
- Hatfield, J. S., Skoff, R. P., Maisel, H. and Eng, L.** (1984). Glial fibrillary acidic protein is localized in the lens epithelium. *J Cell Biol* **98**, 1895-8.
- Hejtmancik, J. F.** (2008). Congenital cataracts and their molecular genetics. *Semin Cell Dev Biol* **19**, 134-49.
- Helfand, B. T., Chang, L. and Goldman, R. D.** (2003). The dynamic and motile properties of intermediate filaments. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 445-67.
- Helfand, B. T., Mikami, A., Vallee, R. B. and Goldman, R. D.** (2002). A requirement for cytoplasmic dynein and dynactin in intermediate filament network assembly and organization. *J Cell Biol* **157**, 795-806.
- Henrion, D., Terzi, F., Matrougui, K., Duriez, M., Boulanger, C. M., Colucci-Guyon, E., Babinet, C., Briand, P., Friedlander, G., Poitevin, P. et al.** (1997). Impaired flow-induced dilation in mesenteric resistance arteries from mice lacking vimentin. *J Clin Invest* **100**, 2909-14.
- Heon, E., Priston, M., Schorderet, D. F., Billingsley, G. D., Girard, P. O., Lubsen, N. and Munier, F. L.** (1999). The gamma-crystallins and human cataracts: a puzzle made clearer. *Am J Hum Genet* **65**, 1261-7.
- Hermeking, H. and Benzinger, A.** (2006). 14-3-3 proteins in cell cycle regulation. *Semin Cancer Biol* **16**, 183-92.
- Herrmann, H. and 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. and Aebi, U.** (2004). Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. *Annu Rev Biochem* **73**, 749-89.
- Herrmann, H., Bar, H., Kreplak, L., Strelkov, S. V. and Aebi, U.** (2007). Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 562-73.
- Herrmann, H., Haner, M., Brettel, M., Muller, S. A., Goldie, K. N., Fedtke, B., Lustig, A., Franke, W. W. and Aebi, U.** (1996). Structure and assembly properties of the intermediate filament protein vimentin: the role of its head, rod and tail domains. *J Mol Biol* **264**, 933-53.
- Herrmann, H., Hesse, M., Reichenzeller, M., Aebi, U. and Magin, T. M.** (2003). Functional complexity of intermediate filament cytoskeletons: from structure to assembly to gene ablation. *Int Rev Cytol* **223**, 83-175.
- Herrmann, H., Strelkov, S. V., Burkhard, P. and Aebi, U.** (2009). Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity. *J Clin Invest* **119**, 1772-83.
- Herrmann, J. E., Imura, T., Song, B., Qi, J., Ao, Y., Nguyen, T. K., Korsak, R. A., Takeda, K., Akira, S. and Sofroniew, M. V.** (2008). STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *J Neurosci* **28**, 7231-43.
- Herskowitz, I.** (1987). Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature* **329**, 219-22.

- Hesse, M., Grund, C., Herrmann, H., Brohl, D., Franz, T., Omary, M. B. and Magin, T. M.** (2007). A mutation of keratin 18 within the coil 1A consensus motif causes widespread keratin aggregation but cell type-restricted lethality in mice. *Exp Cell Res* **313**, 3127-40.
- Hesse, M., Magin, T. M. and 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**, 2569-75.
- Homan, S. M., Martinez, R., Benware, A. and LaFlamme, S. E.** (2002). Regulation of the association of alpha 6 beta 4 with vimentin intermediate filaments in endothelial cells. *Exp Cell Res* **281**, 107-14.
- Horwitz, J.** (1992). Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10449-53.
- Horwitz, J.** (2003). Alpha-crystallin. *Exp Eye Res* **76**, 145-53.
- Inagaki, M., Inagaki, N., Takahashi, T. and Takai, Y.** (1997). Phosphorylation-dependent control of structures of intermediate filaments: a novel approach using site- and phosphorylation state-specific antibodies. *J Biochem* **121**, 407-14.
- Inagaki, M., Matsuoka, Y., Tsujimura, K., Ando, S., Tokui, T., Takahashi, T. and Inagaki, N.** (1996). Dynamic property of intermediate filaments: regulation by phosphorylation. *Bioessays* **18**, 481-487.
- Irvine, A. D.** (2005). Inherited defects in keratins. *Clin Dermatol* **23**, 6-14.
- Irvine, G. B., El-Agnaf, O. M., Shankar, G. M. and Walsh, D. M.** (2008). Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Mol Med* **14**, 451-64.
- Ivaska, J., Pallari, H. M., Nevo, J. and Eriksson, J. E.** (2007). Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp Cell Res* **313**, 2050-62.
- Izawa, I. and Inagaki, M.** (2006). Regulatory mechanisms and functions of intermediate filaments: a study using site- and phosphorylation state-specific antibodies. *Cancer Sci* **97**, 167-74.
- Jakobs, P. M., Hess, J. F., FitzGerald, P. G., Kramer, P., Weleber, R. G. and Litt, M.** (2000). Autosomal-dominant congenital cataract associated with a deletion mutation in the human beaded filament protein gene BFSP2. *Am J Hum Genet* **66**, 1432-6.
- Jing, R., Wilhelmsson, U., Goodwill, W., Li, L., Pan, Y., Pekny, M. and Skalli, O.** (2007). Synemin is expressed in reactive astrocytes in neurotrauma and interacts differentially with vimentin and GFAP intermediate filament networks. *J Cell Sci* **120**, 1267-77.
- Kartenbeck, J., Schwechheimer, K., Moll, R. and Franke, W. W.** (1984). Attachment of vimentin filaments to desmosomal plaques in human meningioma cells and arachnoidal tissue. *J Cell Biol* **98**, 1072-81.
- Kim, S. and Coulombe, P. A.** (2007). Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. *Genes Dev* **21**, 1581-97.
- Kim, Y. J., Sauer, C., Testa, K., Wahl, J. K., Svoboda, R. A., Johnson, K. R., Wheelock, M. J. and Knudsen, K. A.** (2005). Modulating the strength of cadherin adhesion: evidence for a novel adhesion complex. *J Cell Sci* **118**, 3883-94.

- Kokkinos, M. I., Wafai, R., Wong, M. K., Newgreen, D. F., Thompson, E. W. and Waltham, M.** (2007). Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer--observations in vitro and in vivo. *Cells Tissues Organs* **185**, 191-203.
- Kowalczyk, A. P., Navarro, P., Dejana, E., Bornslaeger, E. A., Green, K. J., Kopp, D. S. and Borgwardt, J. E.** (1998). VE-cadherin and desmoplakin are assembled into dermal microvascular endothelial intercellular junctions: a pivotal role for plakoglobin in the recruitment of desmoplakin to intercellular junctions. *J Cell Sci* **111 (Pt 20)**, 3045-57.
- Kreis, S., Schonfeld, H. J., Melchior, C., Steiner, B. and Kieffer, N.** (2005). The intermediate filament protein vimentin binds specifically to a recombinant integrin alpha2/beta1 cytoplasmic tail complex and co-localizes with native alpha2/beta1 in endothelial cell focal adhesions. *Exp Cell Res* **305**, 110-21.
- Kueper, T., Grune, T., Prahl, S., Lenz, H., Welge, V., Biernoth, T., Vogt, Y., Muhr, G. M., Gaemlich, A., Jung, T. et al.** (2007). Vimentin is the specific target in skin glycation. Structural prerequisites, functional consequences, and role in skin aging. *J Biol Chem* **282**, 23427-36.
- Kumar, N., Robidoux, J., Daniel, K. W., Guzman, G., Floering, L. M. and Collins, S.** (2007). Requirement of vimentin filament assembly for beta3-adrenergic receptor activation of ERK MAP kinase and lipolysis. *J Biol Chem* **282**, 9244-50.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lampugnani, M. G. and Dejana, E.** (1997). Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 674-82.
- Lane, E. B., Hogan, B. L., Kurkinen, M. and Garrels, J. I.** (1983). Co-expression of vimentin and cytokeratins in parietal endoderm cells of early mouse embryo. *Nature* **303**, 701-4.
- Lane, E. B. and McLean, W. H.** (2004). Keratins and skin disorders. *J Pathol* **204**, 355-66.
- Lazarides, E.** (1982). Intermediate filaments: a chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins. *Annu Rev Biochem* **51**, 219-50.
- Lee, J. F., Stovall, G. M. and Ellington, A. D.** (2006). Aptamer therapeutics advance. *Curr Opin Chem Biol* **10**, 282-9.
- Lee, Y. C. and Lai, Y. K.** (1995). Integrity of intermediate filaments is associated with the development of acquired thermotolerance in 9L rat brain tumor cells. *J Cell Biochem* **57**, 150-62.
- Leibovitz, A., McCombs, W. M., 3rd, Johnston, D., McCoy, C. E. and 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**, 691-7.
- Levy, D. E. and Darnell, J. E., Jr.** (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 651-62.
- Li, R., Messing, A., Goldman, J. E. and Brenner, M.** (2002). GFAP mutations in Alexander disease. *Int J Dev Neurosci* **20**, 259-68.

- Lieber, J. G. and Evans, R. M.** (1996). Disruption of the vimentin intermediate filament system during adipose conversion of 3T3-L1 cells inhibits lipid droplet accumulation. *J Cell Sci* **109** (Pt 13), 3047-58.
- Liem, R. K. and Messing, A.** (2009). Dysfunctions of neuronal and glial intermediate filaments in disease. *J Clin Invest* **119**, 1814-24.
- Litt, M., Carrero-Valenzuela, R., LaMorticella, D. M., Schultz, D. W., Mitchell, T. N., Kramer, P. and Maumenee, I. H.** (1997). Autosomal dominant cerulean cataract is associated with a chain termination mutation in the human beta-crystallin gene CRYBB2. *Hum Mol Genet* **6**, 665-8.
- Litt, M., Kramer, P., LaMorticella, D. M., Murphey, W., Lovrien, E. W. and Weleber, R. G.** (1998). Autosomal dominant congenital cataract associated with a missense mutation in the human alpha crystallin gene CRYAA. *Hum Mol Genet* **7**, 471-4.
- Lynnerup, N., Kjeldsen, H., Heegaard, S., Jacobsen, C. and Heinemeier, J.** (2008). Radiocarbon dating of the human eye lens crystallines reveal proteins without carbon turnover throughout life. *PLoS One* **3**, e1529.
- Macario, A. J. and Conway de Macario, E.** (2005). Sick chaperones, cellular stress, and disease. *N Engl J Med* **353**, 1489-501.
- Mackay, D., Ionides, A., Kibar, Z., Rouleau, G., Berry, V., Moore, A., Shiels, A. and Bhattacharya, S.** (1999). Connexin46 mutations in autosomal dominant congenital cataract. *Am J Hum Genet* **64**, 1357-64.
- Magin, T. M., Reichelt, J. and Hatzfeld, M.** (2004). Emerging functions: diseases and animal models reshape our view of the cytoskeleton. *Exp Cell Res* **301**, 91-102.
- Magin, T. M., Vijayaraj, P. and Leube, R. E.** (2007). Structural and regulatory functions of keratins. *Exp Cell Res* **313**, 2021-32.
- Mandal, M., Myers, J. N., Lippman, S. M., Johnson, F. M., Williams, M. D., Rayala, S., Ohshiro, K., Rosenthal, D. I., Weber, R. S., Gallick, G. E. et al.** (2008). Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous carcinoma: association of Src activation with E-cadherin down-regulation, vimentin expression, and aggressive tumor features. *Cancer* **112**, 2088-100.
- Marceau, N., Schutte, B., Gilbert, S., Loranger, A., Henfling, M. E., Broers, J. L., Mathew, J. and Ramaekers, F. C.** (2007). Dual roles of intermediate filaments in apoptosis. *Exp Cell Res* **313**, 2265-81.
- Martin, W. D., Egan, R. M., Stevens, J. L. and Woodward, J. G.** (1995). Lens-specific expression of a major histocompatibility complex class I molecule disrupts normal lens development and induces cataracts in transgenic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36**, 1144-54.
- Mason, J. M. and Arndt, K. M.** (2004). Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *Chembiochem* **5**, 170-6.
- Meier-Bornheim, R.** (2006). Untersuchungen zur Funktion des Intermediärfilamentproteins Vimentin in vivo. *Dissertation, Universität Bonn*, 1-131.

- Messing, A., Head, M. W., Galles, K., Galbreath, E. J., Goldman, J. E. and Brenner, M.** (1998). Fatal encephalopathy with astrocyte inclusions in GFAP transgenic mice. *Am J Pathol* **152**, 391-8.
- Michalczyk, K. and Ziman, M.** (2005). Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol Histopathol* **20**, 665-71.
- Monteiro, M. J., Hoffman, P. N., Gearhart, J. D. and Cleveland, D. W.** (1990). Expression of NF-L in both neuronal and nonneuronal cells of transgenic mice: increased neurofilament density in axons without affecting caliber. *J Cell Biol* **111**, 1543-57.
- Mücke, N., Wedig, T., Burer, A., Marekov, L. N., Steinert, P. M., Langowski, J., Aebi, U. and Herrmann, H.** (2004). Molecular and biophysical characterization of assembly-starter units of human vimentin. *J Mol Biol* **340**, 97-114.
- Müller, M., Bhattacharya, S. S., Moore, T., Prescott, Q., Wedig, T., Herrmann, H. and Magin, T. M.** (2009). Dominant cataract formation in association with a vimentin assembly disrupting mutation. *Hum Mol Genet* **18**, 1052-7.
- Mullis, K. B. and Faloona, F. A.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-50.
- Nicholl, I. D. and Quinlan, R. A.** (1994). Chaperone activity of alpha-crystallins modulates intermediate filament assembly. *Embo J* **13**, 945-53.
- Nieminen, M., Henttinen, T., Merinen, M., Marttila-Ichihara, F., Eriksson, J. E. and Jalkanen, S.** (2006). Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration. *Nat Cell Biol* **8**, 156-62.
- Omary, M. B.** (2009). "IF-pathies": a broad spectrum of intermediate filament-associated diseases. *J Clin Invest* **119**, 1756-62.
- Omary, M. B., Coulombe, P. A. and McLean, W. H.** (2004). Intermediate filament proteins and their associated diseases. *N Engl J Med* **351**, 2087-100.
- Omary, M. B., Ku, N. O., Tao, G. Z., Toivola, D. M. and Liao, J.** (2006). "Heads and tails" of intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights. *Trends Biochem Sci* **31**, 383-94.
- Osborn, M. and Weber, K.** (1983). Tumor diagnosis by intermediate filament typing: a novel tool for surgical pathology. *Lab Invest* **48**, 372-94.
- Pallari, H. M. and Eriksson, J. E.** (2006). Intermediate filaments as signaling platforms. *Sci STKE* **2006**, pe53.
- Parry, D. A., Strelkov, S. V., Burkhard, P., Aebi, U. and Herrmann, H.** (2007). Towards a molecular description of intermediate filament structure and assembly. *Exp Cell Res* **313**, 2204-16.
- Pekny, M. and Lane, E. B.** (2007). Intermediate filaments and stress. *Exp Cell Res* **313**, 2244-54.
- Pekny, M., Leveen, P., Pekna, M., Eliasson, C., Berthold, C. H., Westermark, B. and Betsholtz, C.** (1995). Mice lacking glial fibrillary acidic protein display astrocytes devoid of intermediate filaments but develop and reproduce normally. *Embo J* **14**, 1590-8.

- Pekny, M. and Nilsson, M.** (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* **50**, 427-34.
- Perlson, E., Hanz, S., Ben-Yaakov, K., Segal-Ruder, Y., Seger, R. and Fainzilber, M.** (2005). Vimentin-dependent spatial translocation of an activated MAP kinase in injured nerve. *Neuron* **45**, 715-26.
- Perlson, E., Michaelevski, I., Kowalsman, N., Ben-Yaakov, K., Shaked, M., Seger, R., Eisenstein, M. and Fainzilber, M.** (2006). Vimentin binding to phosphorylated Erk sterically hinders enzymatic dephosphorylation of the kinase. *J Mol Biol* **364**, 938-44.
- Perng, M. D., Cairns, L., van den, I. P., Prescott, A., Hutcheson, A. M. and Quinlan, R. A.** (1999). Intermediate filament interactions can be altered by HSP27 and alphaB-crystallin. *J Cell Sci* **112 (Pt 13)**, 2099-112.
- Perng, M. D. and Quinlan, R. A.** (2005). Seeing is believing! The optical properties of the eye lens are dependent upon a functional intermediate filament cytoskeleton. *Exp Cell Res* **305**, 1-9.
- Perng, M. D., Sandilands, A., Kuszak, J., Dahm, R., Wegener, A., Prescott, A. R. and Quinlan, R. A.** (2004). The intermediate filament systems in the eye lens. *Methods Cell Biol* **78**, 597-624.
- Perng, M. D., Zhang, Q. and Quinlan, R. A.** (2007). Insights into the beaded filament of the eye lens. *Exp Cell Res* **313**, 2180-8.
- Prahlad, V., Yoon, M., Moir, R. D., Vale, R. D. and Goldman, R. D.** (1998). Rapid movements of vimentin on microtubule tracks: kinesin-dependent assembly of intermediate filament networks. *J Cell Biol* **143**, 159-70.
- Quinlan, R. A., Brenner, M., Goldman, J. E. and Messing, A.** (2007). GFAP and its role in Alexander disease. *Exp Cell Res* **313**, 2077-87.
- Ramachandran, R. D., Perumalsamy, V. and Hejtmancik, J. F.** (2007). Autosomal recessive juvenile onset cataract associated with mutation in BFSP1. *Hum Genet* **121**, 475-82.
- Ramaekers, F. C., Osborn, M., Schmid, E., Weber, K., Bloemendal, H. and Franke, W. W.** (1980). Identification of the cytoskeletal proteins in lens-forming cells, a special epitheloid cell type. *Exp Cell Res* **127**, 309-27.
- Rees, M. I., Watts, P., Fenton, I., Clarke, A., Snell, R. G., Owen, M. J. and Gray, J.** (2000). Further evidence of autosomal dominant congenital zonular pulverulent cataracts linked to 13q11 (CZP3) and a novel mutation in connexin 46 (GJA3). *Hum Genet* **106**, 206-9.
- Reichelt, J., Bussow, H., Grund, C. and Magin, T. M.** (2001). Formation of a normal epidermis supported by increased stability of keratins 5 and 14 in keratin 10 null mice. *Mol Biol Cell* **12**, 1557-68.
- Ren, P. H., Lauckner, J. E., Kachirskaja, I., Heuser, J. E., Melki, R. and Kopito, R. R.** (2009). Cytoplasmic penetration and persistent infection of mammalian cells by polyglutamine aggregates. *Nat Cell Biol* **11**, 219-25.
- Robidoux, J., Kumar, N., Daniel, K. W., Moukdar, F., Cyr, M., Medvedev, A. V. and Collins, S.** (2006). Maximal beta3-adrenergic regulation of lipolysis involves Src and epidermal growth factor receptor-dependent ERK1/2 activation. *J Biol Chem* **281**, 37794-802.

- Robson, R. M., Huiatt, T. W. and Bellin, R. M.** (2004). Muscle intermediate filament proteins. *Methods Cell Biol* **78**, 519-53.
- Runembert, I., Couette, S., Federici, P., Colucci-Guyon, E., Babinet, C., Briand, P., Friedlander, G. and Terzi, F.** (2004). Recovery of Na-glucose cotransport activity after renal ischemia is impaired in mice lacking vimentin. *Am J Physiol Renal Physiol* **287**, F960-8.
- Runembert, I., Queffeuilou, G., Federici, P., Vrtovsniak, F., Colucci-Guyon, E., Babinet, C., Briand, P., Trugnan, G., Friedlander, G. and Terzi, F.** (2002). Vimentin affects localization and activity of sodium-glucose cotransporter SGLT1 in membrane rafts. *J Cell Sci* **115**, 713-24.
- Sambrook, J. and Russell, D.** (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. **3. Auflage**, 1-2344.
- Sandilands, A., Hutcheson, A. M., Long, H. A., Prescott, A. R., Vrensen, G., Loster, J., Klopp, N., Lutz, R. B., Graw, J., Masaki, S. et al.** (2002). Altered aggregation properties of mutant gamma-crystallins cause inherited cataract. *Embo J* **21**, 6005-14.
- Sandilands, A., Prescott, A. R., Carter, J. M., Hutcheson, A. M., Quinlan, R. A., Richards, J. and FitzGerald, P. G.** (1995a). Vimentin and CP49/filensin form distinct networks in the lens which are independently modulated during lens fibre cell differentiation. *J Cell Sci* **108 (Pt 4)**, 1397-406.
- Sandilands, A., Prescott, A. R., Hutcheson, A. M., Quinlan, R. A., Casselman, J. T. and FitzGerald, P. G.** (1995b). Filensin is proteolytically processed during lens fiber cell differentiation by multiple independent pathways. *Eur J Cell Biol* **67**, 238-53.
- Sarria, A. J., Panini, S. R. and Evans, R. M.** (1992). A functional role for vimentin intermediate filaments in the metabolism of lipoprotein-derived cholesterol in human SW-13 cells. *J Biol Chem* **267**, 19455-63.
- Satoh, J., Yamamura, T. and Arima, K.** (2004). The 14-3-3 protein epsilon isoform expressed in reactive astrocytes in demyelinating lesions of multiple sclerosis binds to vimentin and glial fibrillary acidic protein in cultured human astrocytes. *Am J Pathol* **165**, 577-92.
- Schaffeld, M., Herrmann, H., Schultess, J. and Markl, J.** (2001). Vimentin and desmin of a cartilaginous fish, the shark *Scyliorhinus stellaris*: sequence, expression patterns and in vitro assembly. *Eur J Cell Biol* **80**, 692-702.
- Schietke, R., Brohl, D., Wedig, T., Mucke, N., Herrmann, H. and Magin, T. M.** (2006). Mutations in vimentin disrupt the cytoskeleton in fibroblasts and delay execution of apoptosis. *Eur J Cell Biol* **85**, 1-10.
- Schindler, C., Levy, D. E. and Decker, T.** (2007). JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J Biol Chem* **282**, 20059-63.
- Schweitzer, S. C. and Evans, R. M.** (1998). Vimentin and lipid metabolism. *Subcell Biochem* **31**, 437-62.
- Sehgal, P. B.** (2008). Paradigm shifts in the cell biology of STAT signaling. *Semin Cell Dev Biol* **19**, 329-40.
- Shao, J. and Diamond, M. I.** (2007). Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy. *Hum Mol Genet* **16 Spec No. 2**, R115-23.

- Sherman, M. Y. and Goldberg, A. L.** (2001). Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron* **29**, 15-32.
- Shiels, A. and Hejtmancik, J. F.** (2007). Genetic origins of cataract. *Arch Ophthalmol* **125**, 165-73.
- Sihag, R. K., Inagaki, M., Yamaguchi, T., Shea, T. B. and Pant, H. C.** (2007). Role of phosphorylation on the structural dynamics and function of types III and IV intermediate filaments. *Exp Cell Res* **313**, 2098-109.
- Smith, F.** (2003). The molecular genetics of keratin disorders. *Am J Clin Dermatol* **4**, 347-64.
- Smith, T. A., Steinert, P. M. and Parry, D. A.** (2004). Modeling effects of mutations in coiled-coil structures: case study using epidermolysis bullosa simplex mutations in segment 1a of K5/K14 intermediate filaments. *Proteins* **55**, 1043-52.
- Soellner, P., Quinlan, R. A. and Franke, W. W.** (1985). Identification of a distinct soluble subunit of an intermediate filament protein: tetrameric vimentin from living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 7929-33.
- Song, S., Landsbury, A., Dahm, R., Liu, Y., Zhang, Q. and Quinlan, R. A.** (2009). Functions of the intermediate filament cytoskeleton in the eye lens. *J Clin Invest* **119**, 1837-48.
- Soto, C.** (2001). Protein misfolding and disease; protein refolding and therapy. *FEBS Lett* **498**, 204-7.
- Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. and Brennan, M.** (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **51**, 1409-16.
- Sriram, K., Benkovic, S. A., Hebert, M. A., Miller, D. B. and O'Callaghan, J. P.** (2004). Induction of gp130-related cytokines and activation of JAK2/STAT3 pathway in astrocytes precedes up-regulation of glial fibrillary acidic protein in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of neurodegeneration: key signaling pathway for astrogliosis in vivo? *J Biol Chem* **279**, 19936-47.
- Stahl, N., Farruggella, T. J., Boulton, T. G., Zhong, Z., Darnell, J. E., Jr. and Yancopoulos, G. D.** (1995). Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* **267**, 1349-53.
- Stenson, P. D., Ball, E. V., Mort, M., Phillips, A. D., Shiel, J. A., Thomas, N. S., Abeyasinghe, S., Krawczak, M. and Cooper, D. N.** (2003). Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat* **21**, 577-81.
- Straub, B. K., Boda, J., Kuhn, C., Schnoelzer, M., Korf, U., Kempf, T., Spring, H., Hatzfeld, M. and Franke, W. W.** (2003). A novel cell-cell junction system: the cortex adhaerens mosaic of lens fiber cells. *J Cell Sci* **116**, 4985-95.
- Strelkov, S. V., Herrmann, H. and Aebi, U.** (2003). Molecular architecture of intermediate filaments. *Bioessays* **25**, 243-51.
- Strelkov, S. V., Herrmann, H., Geisler, N., Wedig, T., Zimbelmann, R., Aebi, U. and Burkhard, P.** (2002). Conserved segments 1A and 2B of the intermediate filament dimer: their atomic structures and role in filament assembly. *Embo J* **21**, 1255-66.

- Styers, M. L., Kowalczyk, A. P. and Faundez, V.** (2006). Architecture of the vimentin cytoskeleton is modified by perturbation of the GTPase ARF1. *J Cell Sci* **119**, 3643-54.
- Styers, M. L., Salazar, G., Love, R., Peden, A. A., Kowalczyk, A. P. and Faundez, V.** (2004). The endo-lysosomal sorting machinery interacts with the intermediate filament cytoskeleton. *Mol Biol Cell* **15**, 5369-82.
- Sun, Y. and MacRae, T. H.** (2005). The small heat shock proteins and their role in human disease. *Febs J* **272**, 2613-27.
- Suzuki, T., Nakamoto, T., Ogawa, S., Seo, S., Matsumura, T., Tachibana, K., Morimoto, C. and Hirai, H.** (2002). MICAL, a novel CasL interacting molecule, associates with vimentin. *J Biol Chem* **277**, 14933-41.
- Svitkina, T. M., Verkhovsky, A. B. and Borisy, G. G.** (1996). Plectin sidearms mediate interaction of intermediate filaments with microtubules and other components of the cytoskeleton. *J Cell Biol* **135**, 991-1007.
- Szeverenyi, I., Cassidy, A. J., Chung, C. W., Lee, B. T., Common, J. E., Ogg, S. C., Chen, H., Sim, S. Y., Goh, W. L., Ng, K. W. et al.** (2008). The Human Intermediate Filament Database: comprehensive information on a gene family involved in many human diseases. *Hum Mutat* **29**, 351-60.
- Takamiya, Y., Kohsaka, S., Toya, S., Otani, M. and Tsukada, Y.** (1988). Immunohistochemical studies on the proliferation of reactive astrocytes and the expression of cytoskeletal proteins following brain injury in rats. *Brain Res* **466**, 201-10.
- Tawk, M., Titeux, M., Fallet, C., Li, Z., Dumas-Duport, C., Cavalcante, L. A., Paulin, D. and Moura-Neto, V.** (2003). Synemin expression in developing normal and pathological human retina and lens. *Exp Neurol* **183**, 499-507.
- Terzi, F., Henrion, D., Colucci-Guyon, E., Federici, P., Babinet, C., Levy, B. I., Briand, P. and Friedlander, G.** (1997). Reduction of renal mass is lethal in mice lacking vimentin. Role of endothelin-nitric oxide imbalance. *J Clin Invest* **100**, 1520-8.
- Thompson, L. M.** (2008). Neurodegeneration: a question of balance. *Nature* **452**, 707-8.
- Todaro, G. J. and Green, H.** (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* **17**, 299-313.
- Toh, T., Morton, J., Coxon, J. and Elder, M. J.** (2007). Medical treatment of cataract. *Clin Experiment Ophthalmol* **35**, 664-71.
- Toivola, D. M., Tao, G. Z., Habtezion, A., Liao, J. and Omary, M. B.** (2005). Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends Cell Biol* **15**, 608-17.
- Tsuruta, D. and Jones, J. C.** (2003). The vimentin cytoskeleton regulates focal contact size and adhesion of endothelial cells subjected to shear stress. *J Cell Sci* **116**, 4977-84.
- Tzivion, G., Luo, Z. J. and Avruch, J.** (2000). Calyculin A-induced vimentin phosphorylation sequesters 14-3-3 and displaces other 14-3-3 partners in vivo. *J Biol Chem* **275**, 29772-8.
- Uitto, J., Richard, G. and McGrath, J. A.** (2007). Diseases of epidermal keratins and their linker proteins. *Exp Cell Res* **313**, 1995-2009.

- Uyama, N., Zhao, L., Van Rossen, E., Hirako, Y., Reynaert, H., Adams, D. H., Xue, Z., Li, Z., Robson, R., Pekny, M. et al.** (2006). Hepatic stellate cells express synemin, a protein bridging intermediate filaments to focal adhesions. *Gut* **55**, 1276-89.
- Vassar, R., Coulombe, P. A., Degenstein, L., Albers, K. and Fuchs, E.** (1991). Mutant keratin expression in transgenic mice causes marked abnormalities resembling a human genetic skin disease. *Cell* **64**, 365-80.
- Vicart, P., Caron, A., Guicheney, P., Li, Z., Prevost, M. C., Faure, A., Chateau, D., Chapon, F., Tome, F., Dupret, J. M. et al.** (1998). A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat Genet* **20**, 92-5.
- Werner, N. S., Windoffer, R., Strnad, P., Grund, C., Leube, R. E. and 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.
- Wiche, G.** (1998). Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. *J Cell Sci* **111** (Pt 17), 2477-86.
- Windoffer, R. and Leube, R. E.** (1999). Detection of cytokeratin dynamics by time-lapse fluorescence microscopy in living cells. *J Cell Sci* **112** (Pt 24), 4521-34.
- Wu, Y., Diab, I., Zhang, X., Izmailova, E. S. and Zehner, Z. E.** (2004). Stat3 enhances vimentin gene expression by binding to the antisilencer element and interacting with the repressor protein, ZBP-89. *Oncogene* **23**, 168-78.
- Xu, G. M., Sikaneta, T., Sullivan, B. M., Zhang, Q., Andreucci, M., Stehle, T., Drummond, I. and Arnaout, M. A.** (2001). Polycystin-1 interacts with intermediate filaments. *J Biol Chem* **276**, 46544-52.
- Yoon, M., Moir, R. D., Prahlad, V. and Goldman, R. D.** (1998). Motile properties of vimentin intermediate filament networks in living cells. *J Cell Biol* **143**, 147-57.
- Zandy, A. J., Lakhani, S., Zheng, T., Flavell, R. A. and Bassnett, S.** (2005). Role of the executioner caspases during lens development. *J Biol Chem* **280**, 30263-72.

9.2 Eigene Publikationen

Ulrike Krauss, Martin Müller, Michael Stahl and Annette G. Beck-Sickinger
In vitro gene delivery by a novel human calcitonin (hCT)-derived carrier peptide.
Bioorg. Med. Chem. Lett. (2004) 14: 51-54.

Esther Lizano, Jens Schuster, Martin Müller, Janet Kelso and Mario Mörl
A Splice Variant of the Human CCA-adding Enzyme with Modified Activity.
J. Mol. Biol. (2007) 366: 1258-1265.

Roland Bornheim*, Martin Müller*, Ursula Reuter, Harald Herrmann, Heinrich Büssow, Thomas M. Magin

A dominant vimentin mutant upregulates Hsp70 and the activity of the ubiquitin-proteasome system, and causes posterior cataracts in transgenic mice.

J. Cell Sci. (2008) 121: 3737-3746.

* geteilte Erstautorschaft

Martin Müller, Shomi S. Bhattacharya, Toni Moore, Qunicey Prescott, Tatjana Wedig, Harald Herrmann, Thomas M. Magin

Dominant cataract formation in association with a vimentin assembly-disrupting mutation.

Hum. Mol. Genet. (2009) 18: 1052-1057.