

**Untersuchungen zur Funktion des
Intermediarfilamentproteins Vimentin *in vivo***

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

Vorgelegt von
Roland Meier-Bornheim
aus
Bonn

Bonn, Juli 2006

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

1. Referent: Prof. Dr. Thomas M. Magin

2. Referent: Prof. Dr. Michael Hoch

Tag der Promotion: 26. Oktober 2006

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr 2006

Abkürzungen

μ	mikro (10 ⁻⁶)
A	Adenin oder Ampere
Abb.	Abbildung
A. bidest	zweifach destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cDNS	DNS-Kopie einer RNS
C-Terminus	Carboxy-Ende eines Peptids
°C	Grad Celsius
Da	Dalton
d. h.	das heißt
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
d.p.c.	Tage nach der Befruchtung
EBS	<i>Epidermis bullosa simplex</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
G	Guanin
GFAP	gliales fibrilläres saures Protein
h	Stunde
HE	Hämatoxylin/Eosin
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
K	Keratin
kb	Kilobasenpaare (1000 bp)
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilodalton (1000 Da)
M	mol pro Liter
MCS	multiple Klonierungsstelle
mg	Milligramm
mRNS	Boten-RNS
Rnase	Ribonuklease

n	Anzahl
neo	Neomycinresistenzgen
NLS	Kernlokalisations-Signal oder -Sequenz (kontextabhängig)
p	Plasmid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pBSK	pBluescript SK
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
RFU	Relative Fluorescence Unit / Relative Fluoreszenz Einheit
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur / Reverse Transkription
RT-PCR	Polymerase Kettenreaktion mit revers transkribierter RNS (cDNS)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV40	Simian Virus 40
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TE	TRIS-EDTA Puffer
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit (Unit)
üN	über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
Vim	Vimentin
v/v	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
ZNS	zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1 Das optische System	1
<i>1.1.1 Die Linse</i>	2
<i>1.1.2 Die Retina</i>	3
1.2 Intermediärfilamente	6
<i>1.2.1 Struktur von Intermediärfilamenten</i>	7
1.3 Vimentin	8
<i>1.3.1 Funktionen von Vimentin</i>	9
<i>1.3.2 Funktionen von Vimentin in Astrogliazellen</i>	10
<i>1.3.3 Funktionen von Vimentin aus in vitro Studien</i>	11
1.4 Gen-Inaktivierung durch Generierung einer dominant negativen Mutante	12
1.5 Ziel der Arbeit	13

2 Material

2.1 Präparierbesteck	16
2.2 Verbrauchsmaterial	16
2.3 Chemikalien, Enzyme und Reagenziensätze	16
2.4 Medien und Lösungen	16
<i>2.4.1 Allgemeine Lösungen und Puffer</i>	16
<i>2.4.2 Lösungen für proteinbiochemische Untersuchungen</i>	17
<i>2.4.3 Medien und Lösungen für die Bakterienkultur</i>	19
<i>2.4.4 Medien und Lösungen für die Zellkultur</i>	19
<i>2.4.5 Medien und Lösungen für die Histologie</i>	20
2.5 Größenstandards	21
2.6 Primäre Antikörper	21
2.7 Sekundärantikörper	22
2.8 Primer	22
2.9 Geräte	23
2.10 Versuchstiere	23
<i>2.10.1 Wildtyp-Kontrolltiere</i>	23
<i>2.10.2 Vim^{R113C} Mäuse</i>	23

2.10.3 <i>VimΔ2B Mäuse</i>	24
2.10.4 <i>VimWt Mäuse</i>	24
2.10.5 <i>Vim-/-Mäuse</i>	24
2.10.6 <i>GFAP-/-Mäuse:</i>	24
2.11 Anästhetika	24
2.12 Bakterienstämme	24
2.13 Zelllinien	25

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden	26
3.1.1 <i>Präparation genomischer DNS aus Zellen</i>	26
3.1.2 <i>Präparation genomischer DNS aus Gewebe</i>	27
3.1.3 <i>RNS-Isolierung aus Linsen der Maus</i>	27
3.1.4 <i>Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenol/Chloroform-Extraktion</i>	27
3.1.5 <i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	28
3.1.5.1 <i>Genotypisierung von Vimentin transgenen (Vim$R_{113}C$, VimΔ2B, VimWt) Mäusen</i>	28
3.1.5.2 <i>Genotypisierung von Vimentin knockout Mäusen</i>	29
3.1.5.3 <i>Genotypisierung von GFAP knockout Mäusen</i>	29
3.1.5.4 <i>Genotypisierung von Vim$R_{113}C$ / Vimentin „knockout“ Mäusen</i>	29
3.1.6 <i>Semiquantitative RT-PCR</i>	30
3.1.7 <i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	31
3.1.7.1 <i>Native Agarose-Gelelektrophorese</i>	31
3.1.7.2 <i>Ultraschnelle, hochauflösende Agarose-Gelelektrophorese in Natrium-Borsäure-Puffer</i>	31
3.2 Biochemische Methoden	31
3.2.1 <i>Gesamt-Präparation von Proteinen aus Zellen und Geweben</i>	31
3.2.2 <i>Präparation von löslichen und unlöslichen Zytoskelett-Fractionen</i>	32
3.2.3 <i>Immunpräzipitation</i>	32
3.2.4 <i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese</i>	33
3.2.5 <i>Immunoblot-Analyse</i>	33
3.2.5.1 <i>Inkubation des Proteinblots mit Antikörpern</i>	34
3.2.5.2 <i>Detektion des Signals</i>	34

3.2.6 Enzymatische-Aktivitätsbestimmung in Linsen und Zell-Homogenisaten	35
3.2.6.1 Analyse der Proteasome-Aktivität in Linsen und Zellen	35
3.2.6.2 Analyse der Caspase-Aktivität in Linsen und Zellen	35
3.2.6.3 Indirekter Nachweis der Transglutaminase-Aktivität	35
3.3 Zellkultur	36
3.3.1 Allgemeine Kulturbedingungen	36
3.3.2 Proteasomenblock mit MG-132	37
3.4 Tierexperimentelles Arbeiten	37
3.4.1 Tierhaltung	37
3.4.2 Bestimmung des embryonalen Entwicklungsstadiums	37
3.4.3 Präparation Geweben und Organen	38
3.5 Histologie	38
3.5.1 Immunfärbung und Gewebefärbung von Paraffinschnitten	38
3.5.2 Fixierung von Gewebe durch Ganzkörperperfusion für die Elektronenmikroskopie	38
3.5.3 Immunfluoreszenznachweis von Proteinen in Zellen und Gefrierschnitten	40
3.6 Computergestützte Analysen	40
4 Ergebnisse	
4.1 Funktionsanalyse von Vimentin transgenen Mäusen	41
4.1.1 Herstellung der transgenen Mauslinien <i>VimWt</i> , <i>VimR_{113C}</i> und <i>VimΔC2B</i>	41
4.1.1.1 Etablierung der transgenen Mauslinien	42
4.1.1.2 Kontrolle der transgenen Proteinexpression der Gründertiere	43
4.1.2 Genereller Phänotyp der transgenen Mauslinien	45
4.1.2.1 Proteinexpressionsanalyse von <i>VimWt</i> , <i>VimR_{113C}</i> und <i>VimΔC2B</i> in Organen und Geweben der Maus	45
4.1.2.2 Immunfluoreszenzanalyse Vimentin expremierender Organe und Gewebe	45
4.1.3 Pathologie transgener <i>VimR_{113C}</i> und <i>VimΔC2B</i> Mäuse	47

4.1.3.1 <i>Juveniler Katarakt in transgenen $VimR_{113}C$ und $Vim\Delta C2B$ Mäusen</i>	47
4.1.3.2 <i>Ophtalmologische Spaltlampenuntersuchung der Linsen</i>	48
4.1.3.3 <i>Endogene vs. transgene Proteinexpression in der Linse</i>	49
4.1.3.4 <i>Histologische Veränderungen der Linse</i>	51
4.1.4 <i>Aggregatbildung in Linsen transgener $VimR_{113}C$ und $Vim\Delta C2B$ Mäuse</i>	51
4.1.5 <i>Morphologie der Linse transgener $VimR_{113}C$ und $Vim\Delta C2B$ Mäuse</i>	54
4.1.5.1 <i>Vimentin und Membran assoziierte Proteine in der Linse transgener Mäuse</i>	58
4.1.5.2 <i>Normale Beaded-Filament-Struktur in Faserzellen transgener Linsen</i>	61
4.1.6 <i>$VimR_{113}C$ und $Vim\Delta C2B$ Aggregate sind reversible Strukturen</i>	66
4.1.7 <i>Zelluläre Kontrollsysteme und die Stressantwort in Linsen transgener $VimR_{113}C$ und $Vim\Delta C2B$ Mäuse</i>	68
4.1.7.1 <i>Unveränderte Caspase und Transglutaminaseaktivität in transgenen $VimR_{113}C$ und $Vim\Delta C2B$ Linsen.</i>	68
4.1.7.2 <i>Erhöhte Proteasomaktivität in $VimR_{113}C$ Linsen und Ubiquitinierung von transgenem $VimR_{113}C$ Protein</i>	71
4.1.7.2 <i>Rekrutierung von Chaperonen in Linsen transgener Mäuse</i>	75
4.1.8 <i>Vimentin Aggregate und die Stressantwort in der Linse</i>	77
4.1.8.1 <i>Erhöhte GFAP-Expression im Linsenepithel transgener Mäuse</i>	78
4.1.9 <i>Aktivierte Müller-Glia und Astrozyten in der Retina transgener Mäuse</i>	80
4.1.9.1 <i>Aktivierung des Transkriptionsfaktors Stat3 in der Retina transgener Mäuse</i>	83
4.1.10 <i>Aktivierte Gliazellen im optischen Nerv transgener Mäuse</i>	85
4.1.10.1 <i>Transgene Vimentin Expression in Astroglia</i>	86
4.1.10.2 <i>Erhöhte GFAP Expression in Astrozyten des optischen Nerven</i>	87
4.1.10.3 <i>Ultrastruktur des Optischen Nerven von $Vim\Delta C2B$ Mäusen</i>	89
4.2 <i>Mutationscreening zur Analyse von Patienten mit congenitalen Katarakten</i>	90
4.3 <i>Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit</i>	91

5 Diskussion	
5.1 Vimentin und seine Funktion in der Embryonalentwicklung	93
5.2 Transgenes Vimentin in der Entwicklung und Differenzierung der Linsenfaser	95
5.3 Weitere Ursachen der Kataraktentwicklung in transgenen Vimentin Mäusen	97
5.4 Kristalline und ihre Bedeutung in Katarakterkrankungen	98
5.5 Vimentin Aggregate und ihre transiente Natur in Linsen transgener Mäuse	98
<i>5.5.1 Proteasen in der Linse transgener Mäuse</i>	99
<i>5.5.2 Das Ubiquitin/Proteasom-System und seine Bedeutung in der Linse transgener Mäuse</i>	100
5.6 GFAP kompensiert die Vimentin Aggregation im Linsenepithel transgener Mäuse	101
5.7 Vimentin Aggregate in Gliazellen und die Regulation der GFAP Expression	102
6 Ausblick	106
7 Zusammenfassung	109
8 Literaturverzeichnis	110
Anhang	
Erklärung	

1 Einleitung

Mit der Entschlüsselung der menschlichen Genomsequenz (Nature 409, 860-921, 2001) und kurze Zeit später des Mausgenoms (Nature 418, 743-50, 2002) wurde die Basis geschaffen, um eine der größten Herausforderungen der Naturwissenschaften unserer Zeit zu bewältigen, die systematische Ermittlung aller Genfunktionen in Säugetieren. Dabei stellt das Verständnis der Rolle eines einzelnen Gens oder Genproduktes die Grundvoraussetzung dar, um seine Aufgaben im Kontext des gesamten Organismus richtig einzuordnen. Aufgrund ihrer Verwandtschaft zum Menschen hat sich die Maus als Modellsystem zur Erforschung dieser Zusammenhänge etabliert. Es bietet dabei die Möglichkeit, Proteine zu verschiedenen Zeitpunkten in der Gewebsentwicklung oder bei ihrer Rolle in der Pathogenese zu verfolgen. Dies stellt sich als Vorteil gegenüber *in vitro* Systemen heraus, wenn die zu untersuchenden Gene Teil einer großen Genfamilie sind, deren Mitglieder *in vivo* differentiell und gewebsspezifisch exprimiert werden und dabei unterschiedliche oder gleiche Funktionen erfüllen.

1.1 Das optische System

Den Kontakt zur Außenwelt stellt der Organismus über seine Sinneswahrnehmung her. Der prominenteste der fünf Sinne des Menschen ist der Sehsinn. Das verarbeitende Organ für visuelle Reize ist das Auge, in dem Licht über die Hornhaut, den Wasserkörper, die Linse und schließlich den Glaskörper zur Retina (Netzhaut) geleitet wird. Die Retina wandelt das Licht in neuronale Reize um und transportiert diese zur Verarbeitung über den optischen Nerven in das Sehzentrum des Gehirns.

Das Auge ist nahezu kugelförmig und besteht aus 3 konzentrischen Lagen, Sklera, Choroidea und Retina. Die Sklera geht anterior in die durchsichtige Hornhaut über. Beide sind aus dem gleichem Fasertyp aufgebaut, wobei die Fasern der Hornhaut symmetrisch strukturiert und somit lichtdurchlässig sind. Die Choroidea liegt unter der Sklera und umschließt das Auge ebenfalls. Im Zentrum der Choroidea ist die Iris, die die Pupille umschließt. Darunter liegt die Linse die aus lebenden, metabolisch aktiven Zellen besteht und trotz ihrer Dicke die Transparenz aufrecht erhält.

1.1.1 Die Linse

Die Linse ist ein transparentes Organ des Körpers, das aus regelmäßig angeordneten Linsenfaserzellen besteht, die im Laufe ihrer Differenzierung ihre Organellen und Zellkerne verlieren. Die adulte Linse besteht aus langen, bandförmigen, dichtgepackten konzentrischen Schalen von Faserzellen. In jeder Schale laufen die Zellen wie Längengrade auf einem Globus von einem Pol der Linse bis zum anderen. Im Querschnitt sind die Faserzellen abgeflacht, sechseckig und ihre langen Zelloberflächen stehen senkrecht zum eintreffenden Licht (Abb. 1-1). Diese Form ermöglicht eine besonders dichte Packung der Zellen und reduziert die Streuung des Lichtes auf ein Minimum. Die äußere Schicht der Linse besteht aus der Linsenkapsel, die ihr Stabilität und Form verleiht. Anterior unter der Kapsel befindet sich das einschichtige Linsenepithel ektodermaler Herkunft. Aus diesen proliferierenden Zellen geht im Laufe der Embryonalentwicklung die gesamte Linse hervor. Somit befinden sich im Zentrum der Linse die ältesten Zellen (primäre Linsenfaser). Die nach außen hin immer jünger werdenden Zellen (sekundäre Linsenfaser) entstehen während der Entwicklung der adulten Linse, indem sich neuen Faserzellen vom Linsenäquator ausgehend, auf schon vorhandene Fasern legen (Graw, 1996).

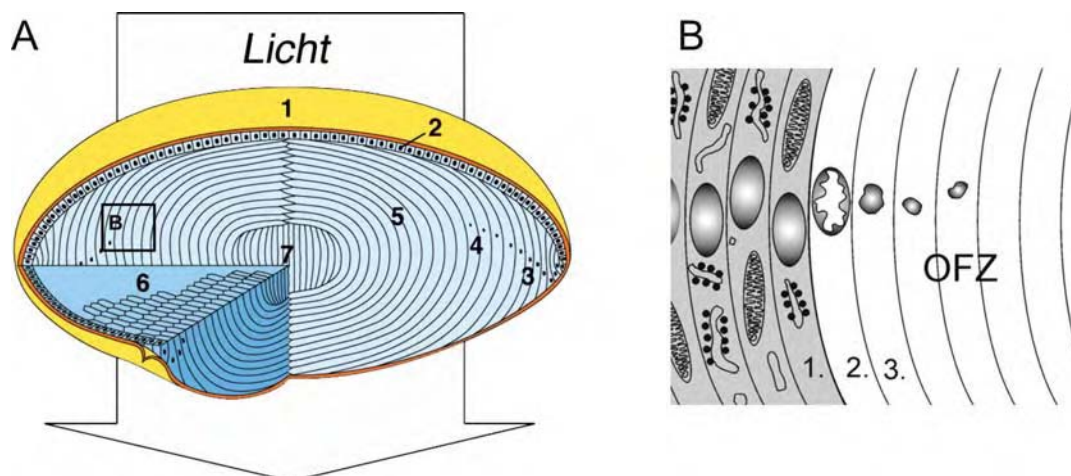


Abb. 1-1 Schematische Darstellung der Linse

A, Kapsel (1). Linsenepithel (2). Differenzierung neu gebildeter Linsenfaser aus der Äquatorregion. Die schwarzen Punkte deuten die Degradation der Zellkerne an (3-5). Ein Ausschnitt dieses Prozesses ist in der Vergrößerung in B zu sehen. Ausdifferenzierte Faserzellen ohne Organellen (5). Hexagonale Struktur der Faserzellen im Querschnitt (6). Primäre Linsenfaser (7).

B, Enukleation und Organellverlust während der Linsenfaserdifferenzierung. OFZ, Organell freie Zone. An der Grenze der OFZ werden Organellen schnell degradiert (1-3). Dies geht mit der Fragmentierung der Mitochondrien und dem Abbau des Endoplasmatischen Retikulums und des Golgikomplexes einher. Zeitgleich dekondensiert das Chromatin in den Zellkernen und die Zellkernmembranen lösen sich vollständig auf. (Modifiziert nach (Dahm, 1999) und (Zandy et al., 2005)).

Während ihres Differenzierungsprozesses verlieren die Linsenfaser ihre Zellkerne (E nukleation) und bauen ihre Organellen ab, bleiben aber metabolisch geringfügig aktiv (Abb. 1-5 B). Im Inneren der Linse findet kein Zellaustausch mehr statt und somit bleiben organellfreie Linsenzellen ein Leben lang erhalten.

Von möglicherweise entscheidender Bedeutung zur Erhaltung der optischen Funktion und der dichtgepackten, hochorganisierten polygonalen Struktur der Linsenfaser sind die Intermediärfilamente (IF) der Linse. Sie formen das strukturgebende Gerüst im Zytoplasma und vermittelt dabei hauptsächlich dynamisches Verhalten und die mechanische Integrität der Faserzellen. Das IF-Protein Vimentin ist in großer Menge im Linsenepithel und in differenzierenden Linsenfaser exprimiert. Im Inneren der Linse wird seine Expression an einer morphologisch nicht definierbaren Zone eingestellt (Geisler and Weber, 1981; Ramaekers et al., 1980). Ob der Verlust von Vimentin in der Differenzierung in einen Zusammenhang mit der E nukleation dieser Zellen, analog zur Differenzierung von Erythrozyten steht, ist noch unbeantwortet (Capetanaki et al., 1989; Sandilands et al., 1995).

Zuzüglich zu Vimentin werden zwei weitere IF-Proteine in allen Zellen der Linse exprimiert. Die linsenspezifischen Intermediärfilamente CP49 und Filensin bilden zusammen mit dem „small-Heatshock-Protein“ α B-Krystallin die sogenannten „beaded filaments“. Die „beaded filaments“ sind an der Bildung der kristallinen Masse beteiligt, die in den Linsenzellen die unkontrollierte Lichtstreuung minimiert und somit hauptverantwortlich für die optische Funktion der Linse ist. Trotz etablierter „knockout“-Modelle für alle drei Haupt-IF-Proteine der Linse bleibt immer noch unklar, welches der Zytoskelettsysteme die mechanische Stabilität der Linse gewährleistet (Alizadeh et al., 2003; Alizadeh et al., 2002; Colucci-Guyon et al., 1994).

1.1.2 Die Retina

Die Retina stellt den Ausläufer des Gehirns ins Auge dar und wird während der Embryonalentwicklung aus einem Teil des Zwischenhirns gebildet. Die Retinae in Vertebraten sind sich in Struktur und Signalcharakteristik sehr ähnlich. Sie enthalten sieben Hauptzelltypen, die grob unterteilt in drei Schichten in der Retina angeordnet sind (Abb. 1.2). Die äußere Schicht (äußere Körnerzellschicht, ONL) besteht aus den Zellkörpern der Photorezeptorzellen, die Lichtreize in elektrische Signale umwandeln. Die eigentlichen Photorezeptoren, die Stäbchen und Zapfen der Zellen, werden nochmals gesondert in äußeres

(OS) und inneres (IS) Segment unterteilt. Die mittlere Schicht (Innere Körnerzellschicht, INL) besteht aus bipolaren, horizontalen und amakrinen Zellen, die die Signale durch analoge Potentialänderungen verarbeiten. Komplettiert wird die Unterteilung durch die innere Schicht von Ganglionzellen (Ganglionzellschicht, GCL), deren Ausgangssignale als Aktionspotentiale durch den optischen Nerven in die Sehzentren des Gehirns gelangen. Die Photorezeptorzellen sind auf der dem Lichteinfall abgewandten Seite der Retina angeordnet, so dass die Lichtinformation erst alle Schichten durchdringen muss (Dyer and Cepko, 2001).

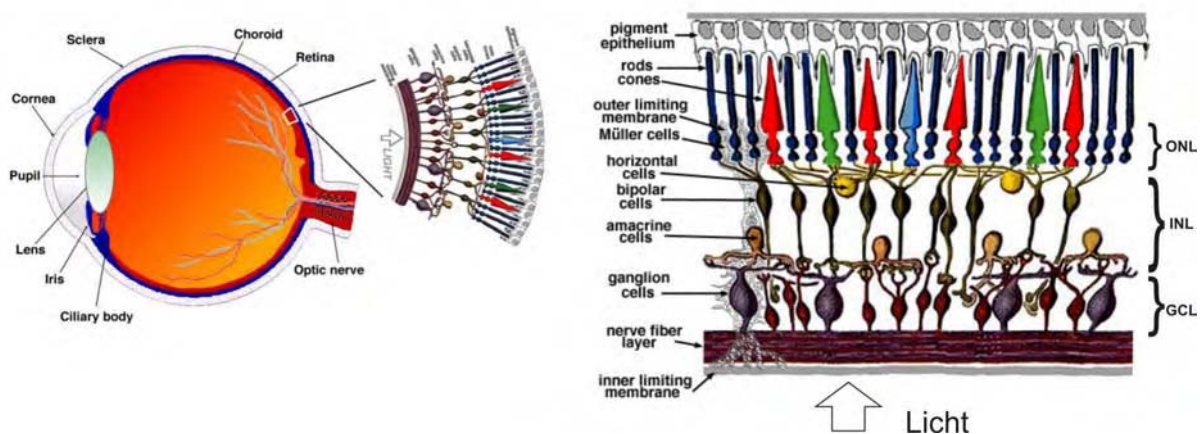


Abb. 1-2 Schematische Darstellung des Auges und der Retina

Gezeigt ist die Schematische Darstellung des humanen Auges und der Aufbau der Retina. Die Retina besteht hauptsächlich aus sieben verschiedenen Zelltypen. Stäbchen- und zapfenförmigen Photorezeptorzellen, Bipolarzellen, Ganglionzellen, Amakrinzellen, Horizontalzellen und Müller-Zellen. Die Retina wird in drei distinkte Schichten unterteilt. Die äußere Körnerzellschicht (ONL), die innere Körnerzellschicht (INL) und die Ganglionzellschicht (GCL). Die Retina spezifischen Müllergliazellen, deren Zellkörper in der INL liegen, umspannen alle drei Zellschichten und sind am Schutz und/oder an der Reparatur von Neuronen beteiligt. Modifiziert nach (Kolb et al., 2001).

Zusätzlich kann die Retina histologisch in zwei weitere Schichten unterteilt werden, in denen keine Zellsomata zu finden sind und hauptsächlich synaptische Kontakte geknüpft werden – äußere und innere plexiforme Schicht. Die Kontaktzone zwischen den Photorezeptor-, Horizontal- und Amakrinzellen bezeichnet man als äußere plexiforme Schicht (outer plexiform layer, OPL). Die innere plexiforme Schicht (inner plexiform layer, IPL) fungiert als Relaisstation für die komplexe Verschaltung von Bipolar- und Ganglionzellen. Zusätzlich integrieren und modulieren vertikal und horizontal ausgerichtete Amakrinzellen die Signale der Bipolarzellen untereinander und mit den Ganglionzellen.

Zusätzlich zu bereits genannten Ganglionzellen und Photorezeptoren enthält die Retina zwei Typen von Gliazellen, Astrozyten und Müller-Zellen. Astrozyten sind an der Innenseite der Ganglionzellschicht lokalisiert. Müller-Zellen sind spezifische Gliazellen für die Retina. Die

Müller-Zellen stützen und halten das Gewebe zusammen und sind entscheidend für die Festigkeit der Netzhaut. Sie bilden in ihrer Gesamtheit ein Gerüst, in das die Nervenzellen der Netzhaut eingebettet sind. Müller-Zellen umspannen dabei alle Zellschichten der Retina, wobei ihre Zellkörper (Somata) in der Körnerzellschicht liegen. Die länglichen Müller-Zellen bilden faserförmig auslaufenden Microvilli aus, die über „Adherens Junctions“ mit Photorezeptorzellen die „outer limiting membrane“ formen. Die lateral miteinander kontaktierenden keulenförmigen Endfüßchen tragen zur Bildung der „inner limiting membrane“ bei, die die Abgrenzung der Retina zum Glaskörper darstellt (Kolb et al., 2001). Beide Gliazellen der Retina exprimieren die Intermediärfilamente GFAP und Vimentin, wobei GFAP das in adulten Zellen dominantere IF ist.

Wie andere Gliazellen des ZNS, reagieren Astrozyten und Müller-Zellen auf Stress mit reaktiver Gliose. Diese zeichnet sich durch erhöhte Proliferation (Sahel et al., 1990), veränderte Ionentransporteigenschaften (Reichenbach et al., 1997), Sekretion von Wachstumsfaktoren (Sueishi et al., 1996) und insbesondere durch intensiven Anstieg der Expression der IF-Proteine GFAP und Vimentin aus (Ghosh and Wasselius, 2002; Seiler and Turner, 1988). Zusätzlich zu letzteren genannten IF-Proteinen wird Nestin ebenfalls in aktivierten Astrozyten exprimiert (Eliasson et al., 1999). Aktivierte Astrozyten sind durch eine Größenzunahme im Sinne einer Hypertrophie des Zytoplasmas, sowie durch Ausbildung von langen und dicken Zellfortsätzen charakterisiert. Die Kerne sind dabei oft vergrößert, untypisch geformt, enthalten mehr Chromatin und viele kleine Nucleoli (Norton et al. 1992, Norenberg 1994). In der Ultrastruktur sind ein besonderes Merkmal die dichtgepackten Filamentbündel, die GFAP und Vimentin enthalten und das gesamte Zytoplasma auszufüllen scheinen (Eliasson et al., 1999). Die Filamentbündel sind sowohl im Zytoplasma als auch in den Zellfortsätzen nachweisbar (Eng und Ghirnikar 1994). Die Folge der reaktiven Gliose, unter der vermehrten IF-Protein Expression, ist eine Vernarbung des Gewebes, welche das axonale Wachstum der Neuronen durch Bildung einer physischen Barriere behindert und somit eine Trennung von gesundem und verletztem Gewebe herstellt (Fawcett and Asher, 1999). Diese Ergebnisse postulieren eine wichtige Funktion der Intermediärfilamente Vimentin und GFAP in Astrozyten bei neurodegenerativen Erkrankungen des ZNS. Wie Intermediärfilamente in diese Prozesse genau eingreifen ist aber noch weitgehend unklar.

1.2 Intermediärfilamente

Das Zytoskelett basiert auf dem Zusammenspiel drei distinkter Filamentsysteme, Mikrofilamente, Makrofilamente und Intermediärfilamente (Fuchs and Cleveland, 1998; Ku et al., 1999). Das strukturgebende Gerüst im Zytoplasma vermittelt dabei hauptsächlich dynamisches Verhalten und die mechanische Integrität der Zelle. Neben den Mikrofilamenten (MF) aus helikalen polymerisierten Aktin-Filamenten und den Makrofilamenten in Form von röhrenförmigen, polaren, Mikrotubuli sind IF die dritte Komponente, aufgrund ihres „intermediären“ Durchmessers so benannt. IF, mit einem Durchmesser von 13-15 nm, sind aus fibrösen Proteinen aufgebaut und besitzen im Gegensatz zu den beiden anderen Filamentsystemen weder polare Architektur noch enzymatische Aktivität (Fuchs and Cleveland, 1998). Desweiteren unterscheiden sich IF von Mikrotubuli und Mikrofilamenten durch ihre große Diversität und ihrem Vorkommen im Zellkern und Zytoplasma (Herrmann et al., 2003).

Intermediärfilamente: Klassifizierung, Struktur und Assembly

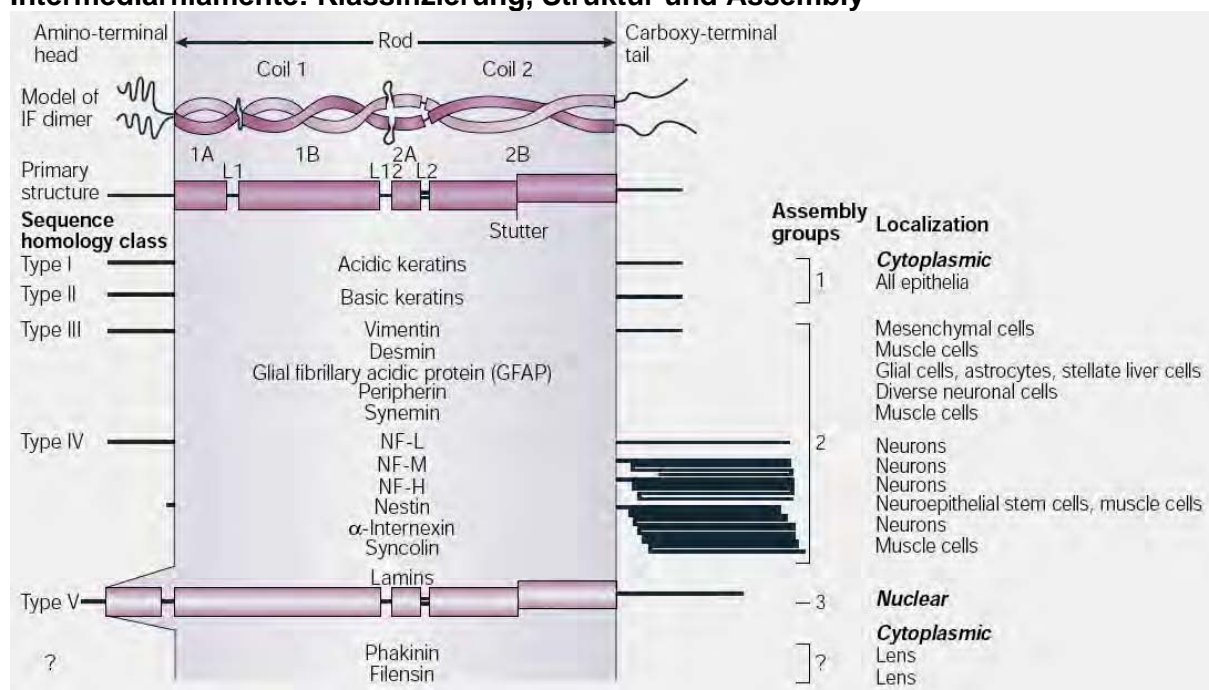


Abb. 1-3 Übersicht über die Mitglieder der Intermediärfilament-Familie

Intermediärfilamente (IF) werden aufgrund ihrer Sequenzhomologie und ihrer Gewebsexpression in fünf Typklassen eingeteilt. Des weiteren ist eine Klassifizierung in drei „Assembly“-Gruppen möglich, wobei die linsenspezifischen Proteine Phakinin (CP49) und Filensin eigenständig betrachtet werden. Alle Filamentproteine teilen ihre dreigeteilte Struktur in Kopf-, Zentral- und Schwanzdomäne, wobei die zentrale Domäne hochkonservierte Sequenzmotive trägt. Die Heterogenität von IF-Proteinen wird hauptsächlich von ihren Kopf und Schwanzdomänen vermittelt, welche unterschiedliche Länge und Aminosäure-Sequenz aufweisen. Weitere Erläuterungen im Text. (Modifiziert nach Chang and Goldman, 2004)

Mit über 70 Mitgliedern sind die IF-Proteine eine der größten Genfamilien im Säuger genom (Hesse et al., 2001; Hesse et al., 2004). Sie lassen sich aufgrund ihrer Sequenzidentität und Expressionsmuster in sechs verschiedene Sequenzhomologie-Klassen aufteilen (Abb. 1.3) (Fuchs and Weber, 1994; Herrmann et al., 2000). Eine Übersicht ist in Abb. 1-3 gegeben. Zu den Typ III Proteinen gehört Vimentin, gliales fibrilläres saures Protein (GFAP), Nestin, Desmin, Synemin und Peripherin. Die spezifisch in der Linse exprimierten IF-Proteine, CP49 (Phakinin) und Filensin werden aufgrund ihres „Assembly-Verhaltens“ als eine eigenständige Gruppe betrachtet, haben aber die größte Gen-Sequenzhomologie zu Typ III und Typ IV IF-Proteinen (Georgatos et al., 1997).

Eine weiterer Unterteilung der IF-Proteine ist durch ihr Filamentbildungsverhalten möglich. IF-Proteine können zu Homopolymeren oder Heteropolymeren dimerisieren, welche sich dann eigenständig zu nicht-kovalenten oligomeren Strukturen höherer Ordnung zusammenlagern.

Zur „Assembly“ Gruppe I gehören die Typ I und Typ II Keratine, die untereinander ausschließlich Heterodimere bilden, während die nur Homopolymere bildenden Lamine die Gruppe III darstellen. Vimentin, GFAP, Desmin, Peripherin, Synemin, α -Internexin und die Neurofilamente bilden die „Assembly“ Gruppe II. Mitglieder dieser Gruppe können grundsätzlich zu Homopolymeren assemblieren, wobei Synemin und Paranemin nur Heteropolymere mit Vimentin oder Desmin und Nestin nur Heteropolymere mit Vimentin und α -Internexin ausbildet. Die Mitglieder der Sequenzhomologie-Gruppe III besitzen *in vitro* grundsätzlich das Potenzial untereinander Heteropolymere zu formen und liegen *in vivo* in verschiedenen Geweben zu verschiedenen Zelldifferenzierungsstadien auch als solche vor (Herrmann and Aebi, 1998). Eine eigenständige Heteropolymer bildende Gruppe sind die linsenspezifischen IF-Proteine CP49 und Filensin, die nur untereinander Filamente ausbilden können (Georgatos et al., 1997; Goulielmos et al., 1996).

1.2.1 Struktur von Intermediärfilamenten

Alle IF teilen, trotz großer Unterschiede in ihrer Nukleotidsequenz, ihre charakteristische Sekundär-Struktur (Abb. 1.1). Ihr α -helikaler Mittelteil ist eine stabförmige Domäne (rod-domain) mit relativ konstanter Länge von 310-352 Aminosäuren, die von drei Linkerregionen von je 8–12 Aminosäuren unterbrochen wird. Die Stab-Domäne beginnt und endet mit hochkonservierten Sequenzmotiven von 8–12 Aminosäuren. Befindet sich eine Mutation in diesem Bereich, wird die Zusammenlagerung der IF-Proteine mit großer Wahrscheinlichkeit

gestört, was meist schwerere phänotypische Auswirkungen in den betroffenen Geweben nach sich zieht (www.interfil.org) (Fuchs and Cleveland, 1998; Irvine and McLean, 1999). In der zentralen Stabdomäne befinden sich vier α -helikale Bereiche (coil 1A, 1B, 2A und 2B), die durch nichthelikale Bereiche (Linker L1, L12 und L2) unterbrochen werden. Kennzeichnend für die α -helikalen Subdomänen ist ihr Heptaden-Sequenzmotiv (abcdefg)₂ mit jeweils hydrophoben Aminosäuren an Position a und d (Parry and Steinert, 1999). Mit ihren zentralen α -helikalen Domänen lagern sich zwei IF-Monomere antiparallel umschlingend zu einem langgestreckten „coiled-coil“ zusammen. Zwei dieser antiparallelen Dimere bilden ein IF-Tetramer, welches als kleinste lösliche Einheit *in vivo* postuliert wird (Herrmann et al., 1999). Ein eindeutiges Modell höherer Ordnung für den Aufbau der 10 nm Filamente steht jedoch noch aus. Im Allgemeinen wird eine Grundstruktur von 32 Monomeren im Durchmesser eines Filamentes angenommen, die für die unterschiedlichen Heteropolymere bildenden IF-Proteine vielgestaltige Anordnungen erlaubt (Fuchs and Cleveland, 1998). So liegen die linsenspezifischen IF-Proteine CP49 und Filensin in einer 3:1 Molarität vor, was ein Misch-Filament aus Homopolymeren CP49 im Zentrum und außen angelagerten Heteropolymeren postuliert. Synemin und Nestin sind nicht in der Lage eigenständige Filamente zu bilden, assemblieren aber in geringen Mengen in ein bestehendes Vimentin Zytoskelett (Bilak et al., 1998). In aktivierten Astrozyten wird Nestin sogar als dritte Komponente in Vimentin-GFAP Heteropolymeren integriert (Eliasson et al., 1999).

Die für das Assembly entscheidende Zentrale-Domäne der IF wird von der Kopf (N-terminus) und Schwanz-Domäne (C-terminus) flankiert, welche vorwiegend die Heterogenität der IF durch ihre unterschiedliche Länge und Aminosäuresequenz vermitteln.

1.3 Vimentin

Vimentin ist das Typ III Intermediärfilament-Protein in Zellen und Geweben von mesodermaler Herkunft. In der Maus beginnt seine Expression an Tag E8,5 der Embryonalentwicklung in parietalen Endoderm, primären Mesenchym und neuronalen Crest-Zellen (Franke et al., 1982; Lane et al., 1983). Einen Tag später wird Vimentin in Myoblasten, Myotomzellen und in Stammzellen des Neuroepitheliums als erstes Intermediärfilament gebildet. Im späteren Verlauf der Differenzierung wird Vimentin in diesen Zelltypen durch zelltypspezifische Intermediärfilamente ersetzt (Cochard and Paulin, 1984; Furst et al., 1989). Im adulten Tier ist Vimentin in allen Zellen mesenchymalen Ursprungs und in der Linse des Auges exprimiert (Bachmann et al., 1983; Colucci-Guyon et

al., 1994). Durch seine Eigenschaft heteropolymere Filamente mit allen Typ III-IF zu bilden, ist Vimentin häufig temporär mit Desmin, GFAP, Nestin und Synemin koexprimiert. Dieses komplexe Expressionsmuster legt die Hypothese nahe, dass das Vimentin-Zytoskelett Zellen im undifferenzierten Zustand hält und in diesem Stadium ihre Gewebeintegrität bewahrt. Außerdem wird Vimentin in allen Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems gebildet und geht im Laufe der Differenzierung zeitgleich mit dem Kernverlust der Zellen verloren (Dellagi et al., 1983). Zudem wird Vimentin in der Stressantwort nach Verletzungen des Zentralnervensystems (ZNS) in reaktiven Astrozyten vermehrt zusammen mit GFAP gebildet und ist bedeutend für die Narbenbildung (Pekny, 2001; Takamiya et al., 1988).

1.3.1 Funktionen von Vimentin

Die Funktionen von Vimentin sind trotz seiner evolutionär konservierten und gewebeübergreifenden Expression noch weitgehend ungeklärt. Um die Funktion von Vimentin zu verstehen, wurden „knockout“ Mäuse hergestellt (Colucci-Guyon et al., 1994). Diese zeigten überraschenderweise keinen offensichtlichen, pathogenen Phänotyp und keine kompensatorischen Effekte durch andere Intermediärfilamente. Unter Abwesenheit von Stress zeigte sich, dass das Fehlen von Vimentin in der Fortpflanzung oder in der Embryonalentwicklung keine Effekte in der Maus hat. Daraus wurde zunächst eine geringe Rolle von Vimentin bei der Erhaltung der Gewebeintegrität gefolgert.

Insbesondere nach Implikation verschiedenster Stressmodelle zeigten sich aber sehr wohl zahlreiche Defekte in Vimentin-null Mäusen. Die Abwesenheit von Vimentin führte zu einer verzögerten Wundheilung von Hautverletzungen in adulten und neugeborenen Gewebe. Dies war auf die verzögerte Migration der Fibroblasten zur Wundstelle und in der Folge von geringer mesenchymaler Kontraktion beim Wundverschluss zurück zuführen (Eckes et al., 2000). Unter diesem Aspekt wurde in primäre Fibroblasten von Vimentin-null Mäusen eine wesentlich höhere Sensitivität auf mechanischen Stress beobachtet. Dies wurde von lokaler Reorganisation von Fokalkontakten und des Aktinfilamentsystems begleitet. Vimentin defiziente Zellen zeigten reduzierte mechanische Stabilität, Motilität und eine beeinträchtigte Migrationsfähigkeit, was eine wichtige Funktion von Vimentin für die mechanische Stabilität der Zellen vorschlägt (Eckes et al., 1998).

Des weiteren konnte bei zirkulierenden T-Lymphozyten eine verminderte Deformationsresistenz festgestellt werden (Brown et al., 2001). Dies untermauert die Hypothese, dass der

Kollaps des Vimentin Zytoskeletts während der Polarisierung von T-Lymphozyten eine wichtige Rolle für die endothelialen Transmigration dieser Zellen spielt.

Außerdem wurde eine veränderte Modulation des Tonus von vaskulären Gefäßen (Terzi et al., 1997) und eine gestörte Transduktion von Scherkräften in den Arterien in Form von abgeschwächter Gefäßerweiterung in Vimentin defizienten Mäusen festgestellt (Henrion et al., 1997). Zudem führte die Nephrektomie von $\frac{3}{4}$ der Nierenmasse im Gegensatz zu Wildtyp Tieren bei Vimentin-null Mäusen zu Letalität der Tiere, ausgelöst durch totales Nierenversagen. Diese Ergebnisse postulieren eine Beteiligung von Vimentin in der Modulierung des Blutgefäßtonus durch Involvierung in die Feinabstimmung der Endothelin-Stickstoffmonoxid Balance.

Des weiteren konnte in einem Modell, bei dem es zu mangelnder Blutversorgung der Niere kommt, eine Bedeutung von Vimentin für die Lokalisation des Natriumtransporters SGLT-1 zu den „Brush Border Membranen“ von Nierengefäßen gezeigt werden (Runembert et al., 2002).

1.3.2 Funktionen von Vimentin in Astrogliazellen

Intensive Untersuchungen zur Rolle von Vimentin wurden in Astrogliazellen an Vimentin defizienten Mäusen durchgeführt. Dabei zeigten ersten Untersuchungen des ZNS von Vimentin-null Mäusen eine normale Verteilung der Astrozyten im Nervensystem und keine veränderte kompensatorische Expression von anderen Intermediärfilamenten anstelle des Vimentin Proteins. Aber Subpopulationen von Gliazellen der weißen Substanz waren nicht mehr in der Lage, ein unverändertes GFAP-Zytoskelett zu bilden, wie z.B. Gliazellen des Corpus callosum oder die Bergmann Glia des Cerebellum (Galou et al., 1996). Primäre Astrozyten von Vimentin defizienten Mäusen bildeten nur kurze kondensierte GFAP Filamente ohne ein Filament-Netzwerk auszubilden. Auch nach Induktion von Stress durch das Zufügen von Verletzungen, konnte die Expression von GFAP in normalerweise Vimentin exprimierenden Gliazellen nicht induziert werden (Pekny, 2001). Generell zeigten Zellen, die Vimentin und GFAP exprimieren, kein intaktes GFAP Zytoskelett in Vimentin-null Mäusen. Weil aber GFAP mRNS in den Zellen vorhanden ist und auch translatiert wird, bedarf es anscheinend Vimentin um ein funktionales Filamentsystem aus GFAP, sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen zu stabilisieren und zu bilden (Galou et al., 1997).

Die Untersuchung von Vimentin/GFAP doppel-„knockout“ Mäusen führte weiterhin zu neuen Hypothesen für möglichen Vimentin Funktionen. So wurde nach Verletzungen des Gehirns eine verminderte Narbenbildung gefunden, die im Wildtyp eine Folge der intensiven reaktiven Gliose der Glia-Zellen ist (Pekny, 2001; Pekny et al., 1999). Diese Studien zeigen die Bedeutung von Intermediärfilamenten in reaktiven Astrozyten für die gewöhnliche Glia-Narbenbildung im Prozess der reaktiven Gliose. Die mechanistische Funktion bleibt allerdings noch unbeantwortet.

In der Retina (Netzhaut), die sich in der Embryonalentwicklung aus einem Abschnitt des Zwischenhirns entwickelt, sind GFAP und Vimentin in zwei Zelltypen, den Astrogliazellen und den Müller-Zellen, koexprimiert. In ungestressten Müller-Zellen ist GFAP dominant in den Endfüßchen lokalisiert, während Vimentin eine perinukleäre Anordnung zeigt. Ebenso wie die Astroglia des ZNS reagieren Müller-Zellen der Retina nach Induktion von Stress mit der Überexpression von GFAP (Ghosh and Wasselius, 2002). Im Gegensatz zu den zahlreichen Studien der Astroglia des ZNS sind die Funktionen von Vimentin und GFAP in Gliazellen der Retina noch kaum untersucht. Welche speziellen Aufgaben Vimentin und GFAP in den Gliazellen der Retina übernehmen ist noch unbeantwortet.

1.3.3 Funktionen von Vimentin aus in vitro Studien

Neben den Ergebnissen aus „knockout“-Studien gibt es zahlreiche Vorschläge für Funktionen aus *in vitro* Studien, die größtenteils Beteiligung von Vimentin an Stoffwechselfvorgängen, Lipidmetabolismus oder Transportvorgängen in der Zelle über Assoziation mit verschiedenen Proteinen postulieren (Abb. 1-4).

So konnte ein möglicher Zusammenhang von Vimentin mit dem Lipidstoffwechsel beobachtet werden (Franke et al., 1987). In Präadipozyten stabilisieren umschließende Vimentinfilamente Lipidtropfen und verhindern ihre hydrophoben Wechselwirkungen mit Organellmembranen. Zudem ist ein intaktes Vimentin-Filamentsystem Voraussetzung für die Bildung von Lipidtropfen (Lieber and Evans, 1996). Des weiteren konnte eine Kolo-kalisation von Vimentin mit Glycosphingolipiden und somit die Einflussnahme zur Verwertung dieser im Kreislauf über Endosomen und den Golgi-Apparat gezeigt werden (Gillard et al., 1996).

Auch *in vitro* wurde eine Beteiligung von Vimentin an der Stressantwort der Zelle dokumentiert. Dabei ist die Bildung eines intakten Zytoskeletts unter Stressbedingungen gestört und wird von der Bindung mit den Chaperonen HSP27 und α B-Krystallin moduliert (Nicholl and Quinlan, 1994; Perng et al., 1999). Außerdem sequestriert Vimentin 14-3-3-

Proteine und verhindert damit seine Interaktion mit Raf-Kinase (Tzivion et al., 2000). Die Interaktion von Vimentin mit 14-3-3-Proteinen, die Schlüsselrollen in der Zellteilung, Signaltransduktion und Apoptose einnehmen und Vimentin als Substrat für verschiedenen Proteinkinasen, wie Protein Kinase C (PKC), PAK, Cdk1, RhoA und AuroraB, postuliert eine Rolle von Vimentin in der Regulation von Signaltransduktionsprozessen durch seine lösliche und unlösliche Fraktion im Zytoplasma der Zelle (van Hemert et al., 2001).

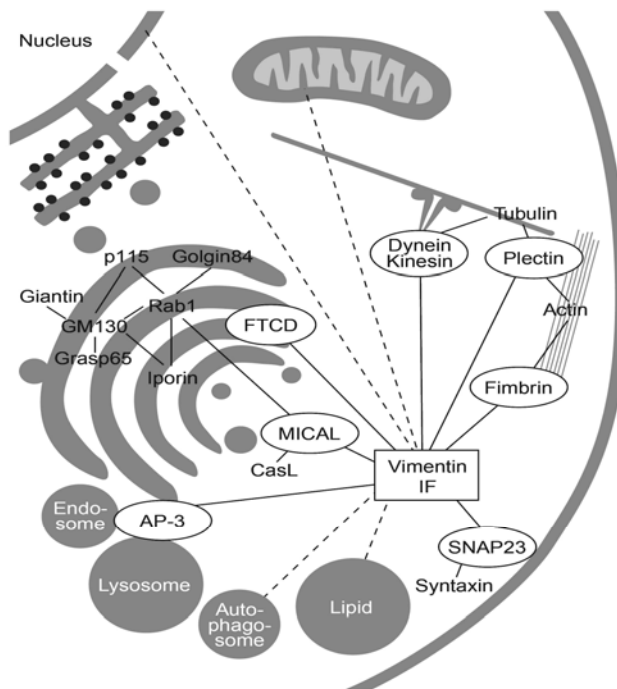


Abb. 1-4 Postulierte Vimentin Interaktionen mit zytosomatischen Proteinen und Organellen

Vimentin interagiert direkt mit zahlreichen Organell-, Membran- oder Zytoskelett assoziierten Proteinen (Ovale). Ebenso werden Interaktionen mit Organellen und Zellulären Komponenten über noch unbekannte Linker-Proteine postuliert (gestrichelte Linien). (Modifiziert nach Toivola et al. 2005)

1.4 Gen-Inaktivierung durch Generierung einer dominant negativen Mutante

Nicht immer führt der Verlust eines Gens („loss of function“) durch Herstellung einer „knockout“ Maus zu offensichtlichen Phänotypen oder deutlichen Konsequenzen für den Organismus und somit zur Hinweisen auf die Genfunktion. Das Mausgenom besitzt anscheinend genügend Redundanz zur Kompensation von einzelnen Genverlusten auf beiden Allelen. Zusätzlich sind viele Gene, „Housekeeping-Gene“ ausgenommen, pleiotropisch exprimiert und können somit bei Verlust nur einen milden Phänotyp erzeugen. Dies trifft insbesondere auf große Genfamilien wie z.B. die Intermediärfilamente zu, die durch Expression anderer Familienmitglieder den Expressionsverlust eines Proteins augenscheinlich kompensieren können. Ein entscheidender Schritt zur Untersuchung der Funktion eines Gens

kann dann die Inaktivierung des Gens durch Generierung einer dominant negativen Mutante sein.

Die Funktion des endogenen Proteins wird durch das mutierte Protein gestört und somit ein Effekt erzeugt, der sich schwerwiegender auswirkt als der Verlust des Proteins (Herskowitz, 1987). Dieser Ansatz wurde für Intermediärfilamente erstmals durch eine Mutation im Keratin 14 Gen gezeigt (Vassar et al., 1991). Die transgenen Mäuse litten, analog zur *Epidermolysa bullosa simplex* (EBS) Patienten, unter Blasenbildung der Haut nach mechanischer Belastung. In Folge dessen wurden Mutationen im Keratin 14 Gen in EBS-Patienten entdeckt, die zur monogenetischen Erkrankung durch Expressionsverlust des Gens oder Aggregation des Proteins führten (Coulombe et al., 1991; Hovnanian et al., 1993). Weitere Beispiele für den Gewinn von Toxizität eines Intermediärfilamentenproteins nach Mutation ist Keratin 6 und das Typ III-IF GFAP. So zeigte der „knockout“ der Isoform K6a und der „doppel-knockout“ K6a/K6b nur einen geringen Effekt (Wojcik et al., 2000; Wong et al., 2000), während die Expression des K6 Gens mit einer Punktmutation zu schweren Läsionen in der interfollikulären Epidermis führte (Wojcik et al., 1999). Beim GFAP ergab das komplette Ausschalten des Gens keinen bemerkenswerten Phänotyp (Gomi et al., 1995; Liedtke et al., 1996; McCall et al., 1996; Pekny et al., 1995). Die Überexpression des Proteins führte allerdings zu Aggregatbildung in Astrozyten des ZNS, vergleichbar zum Symptomkomplex der Alexander'schen Krankheit (Messing et al., 1998). Daraufhin wurden Mutationen im GFAP-Gen von Patienten der Alexander'schen Krankheit gefunden, die wahrscheinlich Filamentbildung inhibieren, das Protein aggregieren lassen und somit toxisch auf die Zelle wirken (Brenner et al., 2001; Messing et al., 2001). Auch der Totalverlust des Vimentin Proteins führte zu keinem augenscheinlichen Phänotyp (Colucci-Guyon et al., 1994). Mutationen im Vimentin-Gen sind bisher im *in vivo* Modell noch nicht untersucht. Lediglich eine Überexpressionsstudie von Hühnchen-Vimentin in der Maus wurde *in vivo* durchgeführt. Die Überexpression hatte eine ausgeprägter Kataraktbildung und gestörte Linsenfaserdifferenzierung zur Folge (Capetanaki et al., 1989). Zudem ist Vimentin eines der wenigen Intermediärfilamente ohne Beziehung zu einer humanen Erkrankung.

1.5 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, einen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung der *in vivo* Funktion von Vimentin zu leisten. Obwohl Vimentin ein in der Evolution hoch konserviertes Protein darstellt (Herrmann et al., 1996), ist im Gegensatz zu anderen IF Proteinen wenig über seine

Funktion *in vivo* bekannt. So zeigte der „knockout“ des Vimentin Gens in Mäusen nur einen sehr subtilen Phänotyp (Colucci-Guyon et al., 1994). Auch nach Induzierung von Stress lässt dieser Ansatz kaum Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins zu (Pekny, 2001). Wie sich für andere IF-Proteine gezeigt hat, liefern dominant-negative Mutationen in konservierten Regionen, die zu monogenetischen Erkrankungen führen, mehr Hinweise auf mögliche Funktionen des Proteins (Brenner et al., 2001; Coulombe et al., 1991). Ein Beispiel ist das Vimentin verwandte IF-Protein GFAP, bei dem das mutierte Protein neue für die Zelle schädliche Funktionen hinzugewinnt („gain of function“). Dadurch behindert mutiertes GFAP, mehr als beim gesamten Verlust des Proteins („loss of function“), endogenes GFAP bei der Erfüllung/Ausführung seine spezifischen Aufgaben.

Ziel war es deshalb, eine transgene Mauslinie zu etablieren, die eine Punktmutation an hochkonservierter Stelle in „coil 1A“ von Vimentin trägt, welche analog zu Keratin 14 und GFAP, sich dominant negativ auswirkt. In Vorarbeiten der AG Magin, wurden Konstrukte mit der Punktmutation R₁₁₃C (Arginin zu Cystein) und einer Deletion des gesamten „coil 2A“ (Δ C2B) hergestellt. Um die Mutation auf ihre dominant negative Funktion *in vitro* zu überprüfen, wurden diese stabil in Mausfibroblasten (3T3-L1) transfiziert, die als einziges IF endogenes Vimentin exprimieren (Franke et al., 1978). Dadurch stand neben dem Mausmodell ein *in vitro*-Modell zur Untersuchung zu Verfügung.

Die Analyse des Mausmodells von dominant-negativen Mutationen im Vimentin-Gen sollte zu bisher nicht bekannten Funktionen führen und Hinweise auf die ursächliche Beteiligung von Vimentin bei humanen Erkrankungen liefern. Dazu sollte zunächst ein Expressionsmuster des transgenen Proteins in den Mäusen durch Immunfluoreszenz- und biochemische-Analysen erstellt werden, um Toxizität und artifizielle Auswirkungen durch Überexpression auszuschließen (Capetanaki et al., 1989). Anschließend sollten die transgenen Mäuse durch immunhistochemische- und Immunfluoreszenz-Methoden auf pathologische, histologische und anatomische Veränderungen untersucht werden. Aufgrund der differentiellen Expression von Vimentin während der Embryogenese (Franke et al., 1982) sollte außerdem auf mögliche Entwicklungsstörungen geachtet werden und pathologische Veränderungen im adulten Tier charakterisiert werden. Aufgrund des Expressionsmusters von Vimentin sollte insbesondere das Auge, die Endothelien, Astrozyten und Leukozyten beobachtet werden. Dabei sollten molekulare Interaktionen von Vimentin mit sich selbst und mit anderen Proteinen untersucht werden, um Einsichten in die Funktionen von Vimentin im Organismus, z.B. für die Integrität mesenchymaler Gewebe, zu gewinnen.

Ziel war es durch „reverse Genetik“ einen Beitrag zur Aufklärung der Funktion von Vimentin zu leisten und ein Mausmodell für mögliche humane Erkrankungen von Vimentin exprimierendem Gewebe zu etablieren.

Im Erfolgsfall sollten die Ergebnisse durch eine Mutationsanalyse von DNS-Proben von Patienten, deren Krankheitsbilder mit den beobachteten Veränderungen übereinstimmen, auf Mutationen im Vimentin-Gen untersucht werden.

2 Material

2.1 Präparierbesteck

Präparationsbesteck zur Präparation von Embryonen und adulter Tiere wurde von der Witte GmbH bezogen.

2.2 Verbrauchsmaterial

Alle Plastikwaren und Reaktionsgefäße wurden von den Firmen Becton-Dickinson (Franklin Lakes, New Jersey, USA), Greiner (Frickenhausen), Sarstedt (Nümbrecht) und Eppendorf (Hamburg) bezogen.

2.3 Chemikalien, Enzyme und Reagenziensätze

Chemikalien wurden in Analysequalität von den Firmen Applichem (Darmstadt), Fluka (Buchs, Schweiz), Gibco BRL (Neu-Isenburg), ICN (Aurora, Ohio, USA), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Steinheim), Roche (Mannheim) und Roth (Karlsruhe) bezogen. Soweit nicht anders vermerkt, wurden Enzyme und Reagenziensätze von den Firmen Gibco BRL, Invitrogen (Leiden, Niederlande), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Schwalbach), Pharmacia (Heidelberg), Promega (Heidelberg), Roche und Stratagene (Heidelberg) bezogen und nach den Angaben der Hersteller eingesetzt.

2.4 Medien und Lösungen

Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit deionisiertem Wasser angesetzt und bei Raumtemperatur gelagert. Alle hier nicht vermerkten Stammlösungen und Puffer werden an der entsprechenden Stelle im Methodenteil aufgelistet.

2.4.1 Allgemeine Lösungen und Puffer

10 x PBS	0,58 M Na ₂ HPO ₄ 0,17 M NaH ₂ PO ₄ 0,68 M NaCl
TE pH 8,0	10 mM Tris-HCl pH 8 1 mM EDTA pH 8
10 x TAE	0,4 M Tris-Acetat 10 mM EDTA

10 x TBE-Puffer	1 M Tris-Base 0,83 M Borsäure 0,01 M EDTA
20 x SB-Puffer	200 mM Na-Hydroxid mit Borsäure auf pH 8,0 einstellen
10 x DNS -Ladepuffer	100 mM EDTA, pH 8,0 30,0% (v/v) Ficoll 0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylencyanol 0,25% (w/v) Orange G
RNase	20 mg/ml in A. bidest 15 min 95°C Aliquots bei -80°C lagern.
Mowiol	2,4 g Mowiol 4-88 (Hoechst) 6 g Glycerol 6 ml A. bidest Mehrere Stunden bei RT stehen lassen. 12 ml 0,2 M Tris pH 8,5 10 min 50°C, gelegentlich umrühren. Nach Lösung: Klären durch Zentrifugation für 15 min bei 8000 upm.
Mowiol + DABCO	2,5% DABCO (1,4-diazobicyclo-[2.2.2]-octan) zu Mowiol geben. Aliquots bei -20°C. Bei RT mehrere Wochen stabil nach dem Auftauen.
Lysispuffer	100 mM Tris-HCl pH 8,5 5 mM EDTA 0,2% SDS 200 mM NaCl Lagerung bei -20°C.
10 x DNS/RNS-Ladepuffer	100 mM EDTA 30% (v/v) Ficoll je 1 Spatelspitze Bromphenolblau, Xylencyanol und Orange G
Ethidiumbromid-Lösung	10 mg/ml Ethidiumbromid (Sigma)

2.4.2 Lösungen für proteinbiochemische Untersuchungen

„High-salt“-Puffer (pH 7,4)	1 M NaCl 20 mM Tris HCl 1 mM EDTA
-----------------------------	---

„Low-salt“-Puffer (pH 7,4)	0,2 M NaCl 20 mM Tris-HCl 1 mM EDTA
10 x TBS	100 mM Tris-HCl, pH 7,4 1,5 mM NaCl
10 x TBST	10 x TBS 1% (v/v) Tween-20
Lower Tris	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 0,4% (w/v) SDS
Upper Tris	1 M Tris-HCl, pH 6,8 0,4% SDS
APS	10% (w/v) Ammoniumpersulfat
Acrylamidlösung	30:0,8 Acrylamid/Bisacrylamid
Laemmli-Probenpuffer	50 mM Natriumphosphat, pH 6,8 25% (w/v) SDS 40 mM DTT 5 mM EDTA 5 mM EGTA 25% (v/v) Glycerol 1 Spatelspitze Bromphenolblau
5 x Laemmli-Laufpuffer	30 g/l Tris 2,93 g Glycin 5 g/l SDS
“Stripping“-Puffer	62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 2% (w/v) SDS 10 mM DTT
Coomassie Blue Spezial	40% Methanol 5% Essigsäure 0,2% (v/v) Coomassie Brilliant Blue (CBB) R250- Lösung (10% (w/v), in Methanol gelöst)
Entfärber für Polyacrylamidgele	40% (v/v) Methanol 5% (v/v) Essigsäure
Substratlösung	Super-Signal West Dura (Pierce) 50% (v/v) Luminol/Verstärker-Lösung 50% (v/v) Stabile Peroxidlösung

RIPA-Puffer	25 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 1 % Nonident P40 2 mM EGTA 2 mM EDTA
RIPA-Waschpuffer	Wie RIPA-Puffer, aber nur 0,1% Nonidet P40

2.4.3 Medien und Lösungen für die Bakterienkultur

Ampicillin (1000 x)	200 mg/ml Ampicillin in 0,1 M Tris-HCl (pH 8) lösen. Mit 1 N NaOH klären.
LB-Medium	10,0 g Bacto-Trypton 5,0 g Bacto-Hefeextrakt 10,0 g NaCl Mit A. bidest auf 1 l auffüllen (pH 7,4). Autoklavieren.
LB-Agar	LB-Medium mit 1,5% Agar
SOC Medium	2% BAxtoTrypton 0,5% Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl Autoklavieren. 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glucose

2.4.4 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Der für das Ansetzen der Medien und Lösungen verwendete Puffer und das Wasser waren von Zellkultur-Qualität.

Hepes-gepufferte Salzlösung (10 x HBS)	16 g NaCl 0,74 g KCl 0,252 g Na ₂ HPO ₄ 2 g D-Glucose (Dextrose) 10 g HEPES In 180 ml sterilen Wassers lösen, pH 7,2 einstellen, auf 200 ml auffüllen und sterilfiltrieren (0,1 µm Porendurchmesser). Lagerung bei -20°C.
---	---

DMEM Kulturmedium	500 ml Dulbeccos Modified Eagle Medium (Invitrogen) mit 4500 mg/l Glucose 56 ml FBS (Invitrogen) 5,6 ml Natriumpyruvat (100 mM, Invitrogen) ggf. 2,85 ml Penicillin/ Streptomycin-Stammlösung (200 x, Invitrogen)
2 x Einfrier-Medium	16 ml DMEM Kulturmedium 4 ml DMSO (ultrapure) 5 ml Neugeborenen Kälberserum bei -20 °C lagern bei Anwendung 1:1-Verdünnung mit Kulturmediummedium
Trypsin-Lösung	0,25% (v/v) Trypsin (Invitrogen) 1 mM EDTA
200x Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin (Gibco BRL) fertige Lösung in 1 ml Aliquots bei -20°C gelagert.

2.4.5 Medien und Lösungen für die Histologie

10 x PBS ⁺	10% BSA in 10x PBS-Puffer, pH 7,4
10 x TBS ⁺	10% BSA in 10 x TBS-Puffer, pH 7,4
EosinY-Lösung	0,1% oder 0,5% EosinY (Sigma) 1 Tropfen Eisessig auf 100 ml Färbelösung
Hämatoxylin-Lösung	Mayer's Hämalaunlösung (Merck)
Karnovsky-Fixativ (2%)	2 g Paraformaldehyd in 42 ml A. bidest lösen mit 1 bis 2 Tropfen 1 N NaOH klären 4 ml 50% Glutaraldehyd 4 ml A. bidest 50 ml Phosphatpuffer (0,2 M) Frisch ansetzen
Phosphatpuffer (0,2 M)	2,76 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 21,44 g Na ₂ HPO ₄ anhydrid in 500 ml A. bidest
Osmium (1%)	2% Osmiumtetroxid 15 ml Phosphatpuffer (0,2 M)

Epon I	62 ml Epon 812 (Serva) 100 ml Epon Härter DDSA (Serva)
Epon II	100 ml Epon 812 89 ml Epon Härter MNA

2.5 Größenstandards

λ -Marker: λ -Phagen-DNS restringiert mit EcoRI und HindIII. Fragmentgrößen (bp): 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564.

Mass Ruler DNA Ladder Low Range (MBI Fermentas): 100 bp-Leiter von 100 bis 1000 bp.

Proteinmarker: Broad Range (New England Biolabs). Proteingrößen (kDa): 212, 158, 116, 97, 66, 56, 43, 36, 27, 20, 14, 7, 2-3.

2.6 Primäre Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Antigen</i>	<i>Spezies/ Subklasse</i>	<i>Verdünnung IF</i>	<i>Verdünnung WB</i>	<i>Bezugsquelle/ Referenz</i>
GP53	Vimentin	Meerschwein polyklonal	1:100	1:2000	Progen
L9I10	c-myc	Hybridoma	neat	1:1000	Hybridoma
AC-40	Actin	Maus monoklonal	1:200	1:1000	Pharmingen
Hsp70	Hsp70	Maus monoklonal	1:400	1:4000	Santa Cruz
Hsp40	Hsp40	Ziege	1:50	1:1000	Santa Cruz
3241	Filensin	Kaninchen	1:50	1:500	Roy Quinlan
2981	CP49	Kaninchen	1:50	1:500	Roy Quinlan
Ac 40	Aktin	Maus monoklonal	1:200	1:1000	Sigma
DP2.15	Desmoplakin	Maus monoklonal	1:20	1:500	Progen
B 5-1-2	α -tubulin	Maus monoklonal	1:2000	1:20 000	Sigma
HD1	Plectin	Maus monoklonal	1:200	1:2000	Owaribe
anti-laminaA	LaminA	Maus	1:250	1:2000	Roy Quinlan
α B crystallin	α BCrystallin	Kaninchen Serum	1:50	1:1000	Roy Quinlan
α -Syn	Synemin	Kaninchen	1:200	1:2000	Denise Paulin
α -GFAP	GFAP	Maus monoklonal	1:2000	1:20000	Sigma
DEB5	Desmin	Maus monoklonal	1:100	1:1000	Klaus Weber
P4G7	Ubiquitin	Maus monoklonal		1:1000	Abcam
α -mu Ki67	Ki67	Kaninchen	1:50		Dianova

Tabelle 2-1: Verwendete Primärantikörper

2.7 Sekundärantikörper

<i>Name</i>	<i>Anti Spezies</i>	<i>Spezies/Subklasse</i>	<i>Farbe</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Bezugsquelle/ Referenz</i>
Alexa 594	Maus	Ziege IgG (H+L)	rot	1:800	Molecular Probes
Alexa 594	Ratte	Ziege IgG (H+L)	rot	1:800	Molecular Probes
Alexa 594	Kaninchen	Ziege IgG	rot	1:800	Molecular Probes
Alexa 594	Meerschwein	Ziege IgG (H+L)	rot	1:800	Molecular Probes
Alexa 488	Maus	Ziege IgG (H+L)	grün	1:400	Molecular Probes
Alexa 488	Ratte	Ziege IgG (H+L)	grün	1:400	Molecular Probes
Alexa 488	Kaninchen	Ziege IgG	grün	1:400	Molecular Probes
Alexa 488	Meerschwein	Ziege IgG (H+L)	grün	1:400	Molecular Probes
Texas Red	Maus	Ziege IgG1	rot	1:400	S. Biotechnology A.
Cy3	Maus	Ziege IgG1	rot	1:800	Dianova
HRP α -m	Maus	Ziege IgG (H+L)		1:30000	Dianova
HRP α -r	Ratte	Ziege IgG (H+L)		1:30000	Dianova
HRP α -rb	Kaninchen	Ziege IgG (H+L)		1:30000	Dianova
HRP α -gp	Meerschwein	Ziege IgG (H+L)		1:30000	Dianova

Tabelle 2-2: Verwendete Sekundärantikörper, H+L: Leichte und schwere Kette.

2.8 Primer

Alle Desoxyoligonukleotide wurden im Auftrag durch die Firma Sigma ARK (Darmstadt); Roth (Karsruhe) oder Operon (Hilden) synthetisiert. Sie wurden in einer Standardkonzentration von 20 pmol/ μ l eingesetzt.

<i>Name</i>	<i>Sequenz 5'→3'</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>PCR-Anwendung</i>
BN518	CTCATCTCAGAAGAGGATCTG	c-Myc Epitop	Genotyp VimR113C, VimD2B, VimWT Mäuse
BN519	CTTGAACCTCAGTGTGATGGC	Vimentin-Gen	Genotyp VimR113C, VimD2B, VimWT Mäuse
VimMycFor	TCCTACGATTCACAGCCACCG	Maus Vimentin-Gen	Genotyp alle Vim tg auf Vim-/- Hintergrund
VimMycRev	AGACTGTAGGTGCGTGTGGAC	Maus Vimentin-Gen	Genotyp alle Vim tg auf Vim-/- Hintergrund
GFAP rev	CCAAACTGGCTGATGTCTACC	Maus GFAP Gen, Exon 1	RT-PCR, GFAP
GFAP for	CAGGTTGTTCTCTGCCTCCAG	Maus GFAP-Gen, Exon 2	RT-PCR, GFAP
Vim1	AGCTGCTCGAGCTCAGCCAGC	Maus Vimentin-Gen	GenotypVim-/- Mäuse, Colucci-Guyon et al., 1994
Vim2	TGTCCTCGTCTCTACCAGC	Maus Vimentin-Gen	GenotypVim-/- Mäuse, Colucci-Guyon et al., 1994
Vim3	CTGTTCCGCCAGGCTCAAGGC	Neo-Selektionsmarker	GenotypVim-/- Mäuse, Colucci-Guyon et al., 1994
GFAP KO5'	GTCCAGCCGAGCCGCGAG	GFAP-Gen	Genotyp GFAP-/- Mäuse
GFAP KO3'	CTCCGAGACGGTGGTCAGG	GFAP-Gen	Genotyp GFAP-/- Mäuse
neo forw	TGTTCCTCTCTCTCATCTCC	Neo-Selektionsmarker	Genotyp GFAP-/- Mäuse
neo rev	ATTGTCTGTTGTGCCAGTC	Neo-Selektionsmarker	Genotyp GFAP-/- Mäuse
β -actin USP	CGTGGGCCGCCCTAGGCAACCA	Mouse β -actin-Gen	RT-PCR, β -Aktin, De Sousa et al , 1993
β -actin DSP	GGGGGGACTTGGGATTCCGGTT	Mouse β -actin-Gen	RT-PCR, β -Aktin, De Sousa et al , 1993

Tabelle 2-3: Auflistung der verwendeten Prime

2.9 Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Modell</i>	<i>Hersteller</i>
Blotkammer	Naß-Blot Trans-Blot®Cell	Biorad
Blotkammer Semi dry	The Panther™HEP-1	Owl
Brutschrank	B6/ B12/ B20	Hereaus
Brutschrank	CB 150	Binder
Entwicklermaschiene	Curix 60	Agfa
Gelkammer (Agarosegele)	B1A, B2	Easy Cast
Gelkammer (Polyacrylamidgele)	Mighty Small SE250	Hoefel
Gießstand	Mighty Small Dual gel Caster	Hoefel
Homogenisator	Potter-Elvehjem	Braun
Hybridisierungssofen	Hybridisierer HB-1D	Techne
IF-Mikroskop	Axiophot 2	Zeiss
Kolbenhubpipette	Pipetman (20; 200; 1000 µl)	Gilson
LSM-Mikroskop	LSM510	Zeiss
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph
Paraffin Gewebeinfiltrationsautomat	Tissue-Tek VIP	Sakura
Paraffineinbettstation	TEC	Sakura
Paraffin-Schnitt-Transfersystem mit Rotationsmikrotom	RM2155	Leica
PCR-Thermocycler	T Gradient	Biometra
PH-Meter	761	Calimatic Knick
Photometer	Genesys 10UV	Thermo E.Coop.
Rollermixer	SRT2	Stuart Scientific
Strudelmischer	MS 1	IKA-Works
Tischschüttler	3016	GFL
Ultra Turrax	T 25	Janke & Kunkel
Ultrazentrifuge	J2-21 mit Rotor JA-20	Beckman
Vortexer	REAX 2000	Heidolph
Waage	BP2100S	Sartorius
Waage (Feinwaage)	BP210D	Sartorius
Zentrifuge	5417 C	Eppendorf
Zentrifuge	Labofuge 400R	Labofuge 400R
Zentrifuge (Kühlzentrifuge)	Fuge 5403	Eppendorf

Tabelle 2-4: Auflistung der verwendeten Geräte

2.10 Versuchstiere

2.10.1 Wildtyp-Kontrolltiere

Als Kontrollen wurden Tiere der Stämme C57BL/6, 129/Sv und Balb/C verwendet. Alle Kontrolltiere wurden von Harlan oder Charles River bezogen.

2.10.2 *VimR₁₁₃C* Mäuse

Mauslinie, die transgen für eine Mutante des Maus Vimentin-Gens ist. Die hochkonservierte Aminosäure Arginin ist hier an Position 113 (Anfang von Coil 1A) gegen Cystein ausgetauscht.

Als Marker ist ein c-myc Epitop im Aminoterminus eingefügt. Das Transgen wird durch seinen eigenen Promotor gesteuert und enthält alle bis dato bekannten Genregulatorelemente.

2.10.3 *Vim*ΔC2B Mäuse

Transgene Mauslinie, die das mutierte Vimentin-Gen mit Deletion der 2B-Stabdomäne und Teilen des N-Terminus, unter der Kontrolle des endogenen Promotors, exprimiert. Analog zur R₁₁₃C Mutante ist als Marker das c-myc Epitop im Aminoterminus eingefügt.

2.10.4 *Vim*Wt Mäuse

Transgene Mauslinie, die zusätzlich ein unverändertes Vimentin-Gen unter der Kontrolle des endogenen Promotors mit eingefügten c-myc Epitop im Aminoterminus exprimiert. Diese Mauslinie diente als transgene Kontrolle.

2.10.5 *Vim*^{-/-}-Mäuse

Mauslinie, bei der das Vimentin-Gen gezielt ausgeschaltet wurde (Colucci-Guyon et al., 1994). Die Vimentin-Nullmutante enthält ein Neomycin-Resistenzgen, welches in Exon 1 inseriert wurde.

2.10.6 *GFAP*^{-/-}-Mäuse

Mauslinie, die defizient für GFAP ist (Colucci-Guyon et al., 1994; Pekny et al., 1995). Bei diesen Mäusen sind die ersten 71 Aminosäuren von Exon 1 durch ein Neomycin-Resistenzgen ersetzt worden.

2.11 Anästhetika

Xylazin-Ketamin	4,25 ml	isotonische NaCl-Lösung
	0,5 ml	Rompun, 2% (Bayer)
	0,25 ml	Ketavet , 100 mg/ml
		zum Narkotisieren 100 µl/g Körpergewicht

2.12 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Verwendung	Referenz
XL I-blue MRF ⁺	recA1, endA1, gryA96, thi-1, d(mcr)A183, d(mcrCB-hsdSMR mrr)173, supE44, relA1, lac[F pro AB lacIqZdM15Tn10 (tetr 12,5 µg/ml)]	Vermehrung von Plasmiden	Bullock et al., 1987
Top10F	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Klonierung	Invitrogen

Tab. 2-5 : Verwendete Bakterienstämme

2.13 Zelllinien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Eigenschaften</i>	<i>Referenz</i>
3T3-L1	murine, embryonale Fibroblasten; konfluente Zellen können sich zu Adipozyten differenzieren; die Zellen sind nicht kontaktinhibiert.	Green und Meuth, 1974
vim wt	3T3-L1 Maus-Fibroblasten, die stabil mit einem Vimentin-Konstrukt transfiziert wurden, welches nach dem Startcodon des offenen Leserahmens des Wildtyp-Vimentin Gens ein c-myc-Epitop trägt.	Schietke et al, 2006
vim R ₁₁₃ C	3T3-L1 Maus-Fibroblasten, die stabil mit einem Vimentin-Konstrukt transfiziert wurden, welches die Punktmutation R ₁₁₃ C trägt und nach dem Startcodon des offenen Leserahmens des Vimentin-Gens ein c-myc-Epitop trägt.	Schietke et al, 2006
vim ΔC2B	3T3-L1 Maus-Fibroblasten, die stabil mit einem Vimentin-Konstrukt transfiziert wurden, bei dem „coil 2B“ deletiert wurde und das nach dem Startcodon des offenen Leserahmens des Vimentin-Gens ein c-myc-Epitop trägt.	Schietke et al, 2006

Tab. 2-6 : Verwendete Zelllinien

3 Methoden

Alle nicht aufgeführten Methoden werden nach Standardmethoden nach Sambrook et al. (1989) und Ausubel et al. (1987) oder nach Herstellerangaben durchgeführt.

Der Umgang mit gentechnisch veränderten Mikroorganismen erfolgte gemäß den Grundregeln des sauberen mikrobiologischen Arbeitens. Gentechnisch veränderte Organismen wurden nach ihrer Erzeugung erfasst und durch Autoklavieren (Bakterien, Säugerzellen) oder Verbrennung (Mäuse) vernichtet, wenn sie nicht mehr benötigt wurden.

3.1 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Methoden zur Präparation, Isolierung aus Bakterien und Manipulation von Nukleinsäuren, sind bereits in der Diplomarbeit Meier-Bornheim (2001) ausführlich beschrieben.

3.1.1 Präparation genomischer DNS aus Zellen

Für die Präparation genomischer DNS wurden etwa 1 bis 4×10^7 Zellen zunächst durch die Behandlung mit Trypsin/EDTA (5 min, 37°C) vom Boden der Kulturschale gelöst und dann im Falcon- Röhren pelletiert (1200 upm, 2 min, RT). Das Zellpellet wurde nach Entfernung des Überstandes entweder eingefroren (-20°C) oder sofort verarbeitet. Dazu wurden die Zellen in 0,5 ml TE-Puffer (pH8) resuspendiert. Nach der Zugabe von 2,5 ml Lysispuffer mit $200 \mu\text{g/ml}$ Proteinase K und $200 \mu\text{g/ml}$ RNase A wurde mindestens 1 h bei 55°C unter langsamen Dreh- oder Schüttelbewegungen inkubiert. Erfolgte die Lyse der Zellen direkt in der Kulturflasche, wurde zuerst das Medium entfernt und die Zellen mit 5 ml sterilen Wassers gewaschen. Nach der Zugabe des Lysispuffers wurde die Flasche geschwenkt und einige Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Das Lysat wurde dann in ein Falcon-Röhren überführt und weiter verarbeitet wie oben beschrieben. Nach Abschluß der Inkubation wurde die DNS Phenol/Chloroform gereinigt und in Ethanol/NaAc gefällt. Wurde DNS aus weniger als 1 Million Zellen isoliert, erfolgte die Zugabe von $1 \mu\text{l}$ Glykogen (20 mg/ml). Nach dem Waschen wurde die DNS in $500 \mu\text{l}$ bis 2 ml TE-Puffer (pH8) aufgenommen und durch vorsichtiges Pipettieren vollständig gelöst.

3.1.2 Präparation genomischer DNS aus Gewebe

Ein Gewebestückchen (0,5 – 0,8 cm Schwanzspitze oder anderes Gewebe) wurde in 200 µl Lysepuffer plus 5 µl Proteinase K (20 mg/ml) überführt und für mindestens 3 h oder üN bei 55°C im Drehinkubator inkubiert. Das Lysat wurde abzentrifugiert (14000 upm, 5 min, RT), der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 160 µl Isopropanol zugegeben und gemischt. Das DNS-Präzipitat wurde mit einer gelber Spitze aus dem Reaktionsgefäß herausgenommen, einmal für ca. 5 s in 70 % Ethanol gewaschen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 200 µl TE-Puffer überführt. Nach einer 10 minütigen Inkubation mit geöffnetem Deckel bei 65°C wurde die gelbe Spitze entfernt, das Reaktionsgefäß verschlossen und bis zum vollständigen Lösen der genomischen DNS bei 55°C unter Drehbewegung inkubiert. Für PCR-Reaktionen wurde 1-2 µl dieser Lösung eingesetzt.

3.1.3 RNS-Isolierung aus Linsen der Maus

Gesamt-RNS wurde mit dem Macherey-Nagel NucleoSpin RNA II Kit nach Angaben des Herstellers oder mit Trizol™-Reagenz (Gibco BRL) isoliert, basierend auf der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987). Die hier angeführten Volumenangaben beziehen sich auf die Ausgangsmenge an Trizol. Für 6 Linsen wurden 2,5 ml Trizol eingesetzt. Das tiefgefrorene (-80°C) Gewebe wurde in Trizol überführt und sofort auf höchster Geschwindigkeitsstufe für mindestens 1 min homogenisiert (Ultra Turrax T25). Nach Inkubation bei RT (5 min) wurde die Probe mit 0,2 Volumen Chloroform versetzt und 15 s lang kräftig geschüttelt. Nach einer weiteren Inkubation (5 min, RT) wurde die Probe 15 min zentrifugiert (14.000 upm, 4°C, 5417C, Eppendorf), um die Phasen zu trennen. Die obere RNS-haltige (wässrige) Phase wurde in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 0,5 Volumen Isopropanol und eine Inkubation von 10 min bei RT wurde die RNS gefällt und anschließend durch Zentrifugation pelletiert (14000 upm, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das RNS-Pellet in 1 Volumen 75%igem Ethanol gewaschen (14000 upm, 5 min, 4°C). Das Pellet wurde anschließend maximal 10 min luftgetrocknet und in 60 µl RNase freies Wassers (Sigma) aufgenommen. Davon wurden je 2 µl zur Konzentrationsbestimmung auf dem Agarosegel und im Photometer abgenommen, die restliche RNS wurde bis zum Gebrauch in Ethanol/NaAc präzipitiert und bei -20°C gelagert.

3.1.4 Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Trennung von Nukleinsäuren von Proteinen und anderen Zellbestandteilen bedient man sich der Phenol/Chloroform-Extraktion. Proteinkomponenten werden durch mehrmalige

Extraktion mit dem starken organischen Lösungsmittel Phenol vollständig denaturiert und von den in der wässrigen Phase verbleibenden Nukleinsäuren abgetrennt. Zur in TE oder A.bidest befindlichen DNS oder RNS wurde 0,4 Volumen TE gesättigtes Phenol und 0,4 Volumen Chloroform hinzugegeben und gründlich mit dem Vortexer durchmischt. Nach Zentrifugation (5 min, RT, 14000 upm, 5415C, Eppendorf) wurde die obere wässrige Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dabei galt es, Überführungen der Inter- und Unteren-Phase zu vermeiden. Bei bestehender Interphase wurde die Phenol/Chlorophorm Extraktion nochmals wiederholt. Zum Überstand wurde 1 Volumen Chloroform zugegeben und erneut zentrifugiert (5 min, RT, 14000 upm, 5415C, Eppendorf). Der Überstand wurde wieder abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Nukleinsäuren wurden anschließend präzipitiert und je nach Bedarf weiterverwendet oder gelagert.

3.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

DNS-Bereiche, deren flankierende Enden Basenpaarungen mit Primern eingehen, können durch eine Polymerasereaktion amplifiziert werden. Die DNS wird durch Hitze denaturiert, um sie für die Replikation einzelsträngig zu machen. Während der anschließenden Abkühlung binden die Primer spezifisch an den komplementären Bereich. In der nachfolgenden Verlängerungsreaktion wird in der Anwesenheit von dNTPs durch eine spezielle thermostabile DNS-Polymerase (Taq-Polymerase) die Matrize zu einem Doppelstrang aufgefüllt. Durch die Wiederholung des Zyklus ergibt sich eine exponentielle Anreicherung der zwischen den Primern gelegenen Matrizen-DNS. Die Amplifikation wurde in der Regel in einem 25 µl-Ansatz auf einem Thermocycler durchgeführt. Für alle folgenden Applikationen wurde Taq-Polymerase von Invitrogen benutzt.

3.1.5.1 Genotypisierung von Vimentin transgenen Mäusen (*VimWt*, *VimR₁₁₃C*, *VimΔC2B*)

Die Genotypisierung von Vimentin transgenen Mäusen basiert auf dem Nachweis des c-myc Epitops, welches in Wiltyp Mäusen nicht vorhanden ist. Dabei entsteht ein Produkt von 306 bp. 25 µl Ansatz: 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1,25 mM MgCl₂, 250 µM dNTPs, 0,5 µM BN518, 0,5 µM BN519, 1 U Taq-Polymerase und steriles Wasser.

Temperaturprofil:

Zyklenzahl	1	35	1
Denaturierung	95°C 5 min	95°C 30 s	
Anlagerung		55°C 30 s	
Verlängerung		72°C 25 s	72°C 5 min

3.1.5.2 Genotypisierung von Vimentin „knockout“ Mäusen

Die Genotypisierung von Vimentin „knockout“ Mäusen wurde modifiziert nach (Colucci-Guyon et al., 1994) mit den Primern Vim1, Vim2 und Vim3 durchgeführt. Dabei entstanden für das Allel des Wildtyps ein Produkt der Größe 398 bp und für das inaktivierte Allel ein Produkt der Größe 530 bp. 25 µl Ansatz: 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1,25 mM MgCl₂, 250 µM dNTPs, 0,5 µM Vim1, 0,5 µM Vim2 (wt) oder Vim3 (ko), 1 U Taq-Polymerase und steriles Wasser.

Temperaturprofil:

Zyklenzahl	1	30	1
Denaturierung	94°C 1 min	94°C 1 min	
Anlagerung		65°C 1 min	
Verlängerung		72°C 1 min	72°C 5 min

3.1.5.3 Genotypisierung von GFAP „knockout“ Mäusen

Die Genotypisierung von GFAP „knockout“ Mäusen wurde modifiziert nach (Pekny et al., 1995) durchgeführt. Hierbei handelte es sich um eine 4 Primer PCR. Dabei entstanden für das Allel des Wildtyps mit den Primern GFAP KO5' und GFAP KO3' ein Produkt der Größe 350 bp. Dieses Produkt ist im inaktivierten Allel aufgrund der Insertion des Neo-Selektionsmarkers nicht mehr nachweisbar. Die Primer neo for und neo rev liefern ein Produkt der Größe 150 bp und sind spezifisch für die Neo-Kassette. 25 µl Ansatz: 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1,25 mM MgCl₂, 250 µM dNTPs, 2 µM 0,5 µM GFAP KO5', 0,5 µM KO3', 1,5 µM neo for, 1,5 µM neo rev, 1 U Taq-Polymerase und steriles Wasser.

Temperaturprofil:

Zyklenzahl	1	5	25	1
Denaturierung	94°C 5 min	94°C 30 s	92°C 1 min	
Anlagerung		65°C 30 s	65°C 30 s	
Verlängerung		72°C 30 s	72°C 20 s	72°C 5 min

3.1.5.4 Genotypisierung von VimR₁₁₃C / Vimentin „knockout“ Mäusen

Der Vimentin „knockout“ beruht auf einer Insertion des Neo-Resistenzgens als Selektionsmarkers in Exon 1 (Colucci-Guyon et al., 1994). Hier ergibt sich das Problem für die Genotypisierung der „knockout“ Tiere mit Vimentin transgener Insertion ins Genom, da das Vimentin-Transgen-Konstrukt aus der gesamten genomischen DNS Gensequenz besteht und somit immer ein falsches Vimentin Wildtyp Allel vortäuscht. Deshalb wurde eine zusätzliche PCR mit spezifischen Primern, die das c-myc-Epitop in den Vimentin mutanten

Genen umklammerten, etabliert. Die Primer VimMycFor und VimMycRev liefern ein Produkt der Größe ein 200 bp Fragment für das Wildtyp Allele und ein 240 bp Fragment für das Transgen. 25 µl Ansatz: 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1,25 mM MgCl₂, 250 µM dNTPs, 2 µM 0,5 µM GFAP KO5', 0,5 µM GFAP KO3', 1,5 µM neo for, 1,5 µM neo rev, 1 U Taq-Polymerase und steriles Wasser.

Temperaturprofil:

Zyklenzahl	1	30	1
Denaturierung	94°C 1 min	94°C 30 sec	
Anlagerung		62°C 30 sec	
Verlängerung		72°C 25 sec	72°C 5 min

3.1.6 Semiquantitative RT-PCR

In der reversen Transkription wurde RNS zunächst in cDNS umgeschrieben, die anschließend in einer PCR-Reaktion als Matrize verwendet wurde. Auf diese Weise konnten auch geringe Transkriptmengen in Geweben oder Zellen nachgewiesen werden.

Für die RT-Reaktion zur Herstellung von cDNS wurde 10 µl der aufgelösten RNS aus Linsenpräparation eingesetzt. Die RT-Reaktion wurde mit dem „SuperScript II Reverse Transcriptase System“ (Invitrogene) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Konzentrationen der erhaltenen cDNS-Mengen wurden durch UV-Messungen angeglichen und durch Agarosegel-Elektrophorese kontrolliert. Gleiche Mengen der Aliquots der transkribierten cDNS (mindestes 0,1µg) wurden dann in die GFAP-PCR mit den Primern GFAPfor und GFAPrev eingesetzt, welche ein spezifisches Produkt von 179 bp liefert. Die Primer liegen in Exon 1 und 2 und umspannen somit Intron 1-2, was die unspezifische Amplifikation von genomischer DNS verhindert. Als Kontrolle diente die Amplifikation von β-Aktin (De Sousa et al., 1993).

25 µl Ansatz: 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1,25 mM MgCl₂, 250 µM dNTPs, 0,5 µM GFAPrev, 0,5 µM GFAPfor und 1 unit Taq DNA-Polymerase

Temperaturprofil:

Zyklenzahl	1	maximal 35
Denaturierung	95°C 3 min	95°C 30 s
Anlagerung		61,5°C 30 s
Verlängerung		72°C 30 s

3.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

3.1.7.1 Native Agarose-Gelelektrophorese

Die native Agarose-Gelelektrophorese dient der analytischen oder präparativen Auftrennung von Nukleinsäuren im Gleichspannungsfeld. Die Moleküle wandern aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen zum positiven Pol, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit sowohl durch die Molekülgröße, als auch durch die Konformation (einzelnsträngig, doppelsträngig, zirkulär geschlossen, zirkulär mit Einzelstrangbruch) beeinflusst wird. Die eingesetzte Agarosekonzentration richtete sich nach der Länge der aufzutrennenden Nukleinsäuren und lag zwischen 0,7% und 1,5%. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1x TAE- oder 1x TBE-Puffer aufgekocht. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) in die Gellösung konnte die DNS oder RNS später bei Bestrahlung mit UV-Licht (260 nm) sichtbar gemacht werden. Die zu analysierenden Proben wurden vor dem Beladen des Gels mit der entsprechenden Menge 10 x DNS/RNS-Ladepuffer versetzt. Die Bestimmung der DNS-Fragmentlängen erfolgte durch den parallelen Auftrag eines Längenstandards. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von bis zu 10 V/cm Elektrodenabstand.

3.1.7.2 Ultraschnelle, hochauflösende Agarose-Gelelektrophorese in Natrium-Borsäure-Puffer TBE oder TAE als elektrophoretische Lösungen setzen hohe Ionenkonzentrationen ein und erfordern lange elektrophoretische Laufzeiten um starke Hitzebildung zu verhindern. Dieses Problem konnte durch Verwendung von 5 mM Natrium-Borsäure (SB) gelöst werden (Brody and Kern, 2004). SB-Puffer verhindert die bekannte Überhitzung des elektrophoretischen Systems und lässt somit 15-fach schnellere und hochauflösendere Trennung von kleineren DNS und RNS Fragmenten zu. Natrium-Borsäure Elektrophoresepuffer wurde in dieser Arbeit für analytische Gele und DNS-Fragmentgrößen bis 5 kb benutzt. Mini-Gele wurden mit 200-250 Volt, große Gele mit 300-400 Volt angelegter Spannung bei maximaler Laufzeit von nur 10 min durchgeführt.

3.2 Biochemische Methoden

3.2.1 Gesamt-Präparation von Proteinen aus Zellen und Geweben

Die präparierten und in Flüssigstickstoff gelagerten Gewebeproben wurden in 95°C heißem Protein-Probenpuffer (1 ml pro 100 mg Gewebe) aufgenommen und mit dem Ultra Turrax (2 min, 24000 upm) homogenisiert. Nach der Homogenisation wurde die Suspension für 5 min auf 95°C im Wasserbad erhitzt. Bei anhaltender Viskosität wurde nochmals für 5 –10 min bei

95°C erhitzt. Um die Proteine von restlichen Verunreinigungen und Zelltrümmern zu trennen, wurde die Suspension zentrifugiert (5 min, RT, 14000 upm, 5415C, Eppendorf) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um ein vollständiges Lösen der Disulfidbrückenbindungen der Proteine zu erreichen wurde nochmals 1M DTT-Lösung zugegeben und auf eine Endkonzentration von 40 mM in der Probe eingestellt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C (einige Tage) oder -80°C (einige Monate) gelagert. Vor dem Gelauftrag wurde das Lysat für 5 bis 10 min gekocht, um die Proteine zu denaturieren und DNS zu hydrolysieren.

3.2.2 Präparation von löslichen (SF) und unlöslichen (CF) Zytoskelett-Fractionen

Aufgrund ihrer geringen Löslichkeit können Zytoskelettproteine durch Extraktion mit detergentenhaltigen Lösungen oder durch Puffer mit hoher Ionenstärke aus Geweben und Kulturzellen angereichert werden. Alle folgenden Präparationsschritte wurden auf Eis durchgeführt.

Auf sechs frisch präparierte Linsen wurden ca. 2 ml eiskalter Low-Salt-Extraktionspuffer gegeben. Das Gewebe wurde sofort homogenisiert (15 min, Potter, B.Braun) und dann 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde dem Homogenisat Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche) zugefügt. Dann wurde es in einen Glas-Homogenisator überführt und mit einem L-Pistill weiter homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenisat abzentrifugiert (10 min, 8000 upm, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen (lösliche Zytoskelett-Fraktion, SF) und das entstandene Pellet in 2 ml eiskaltem High-Salt-Extraktionspuffer, dem ebenfalls Proteinase-Inhibitor zugesetzt wurde, resuspendiert und weiter im Glas-Homogenisator (S-Pistill) homogenisiert. Anschließend wurden die Proteine bei 15000 upm (4°C) für 10 min pelletiert. Das Proteinpellet (unlösliche Zytoskelett-Fraktion, CF) wurde dann in 500 µl Laemmli-Probenpuffer aufgenommen. Die Lagerung der Extrakte erfolgt bei -20°C.

3.2.3 Immunpräzipitation

Zur Durchführung der Immunpräzipitations-Analyse wurden je 6 Linsen einer Mauslinie in 2 ml RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitor-Cocktail (Roche) homogenisiert (4°C, 20 min, Potter, B.Braun) und anschließend weitere 40 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde abzentrifugiert (20 min, 4°C, 13000 upm, 5415C, Eppendorf) und der Überstand abgenommen. Die Proteinkonzentrationen der Überstände wurden nach Bradford-Bestimmung angeglichen und dann jeweils 25µl (ca. 4-6 µg) Vimentin Antikörper zugegeben und auf dem Drehrad inkubiert (1 h, 4°C). Zur Kontrolle wird ab parallel 1/10 des Überstandes ohne Antikörper

weiterbehandelt. Danach wurde zur Immunpräzipitation jeweils 20 µl Prot-(A)-Sepharose-Slurry (Amersham) zugegeben und weiter inkubiert (1 h, 4°C, Drehrad). Nach fünfmaligem Waschen mit je 1 ml RIPA-Waschpuffer und jeweiligem Mischen (5 min, 4°C, Drehrad) und Zentrifugation (1 min, 4°C, 5000 upm) wird das Sediment abschließend mit 30 µl Laemmli-Probenpuffer versehen, für 3 min aufgekocht und anschließend zentrifugiert (2 min, 14000 upm). Der letzte Überstand wurde nun mit Hilfe der Immunoblotanalyse weiteruntersucht. Alle Überstände und Pellets wurden nicht verworfen, sondern dienten im weiteren Experiment als Kontrolle der Spezifität der Immunpräzipitation.

3.2.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde eine diskontinuierliche Elektrophorese in SDS-haltigen Polyacrylamidgelen durchgeführt. Die Herstellung der Gele erfolgte nach der Methode von Laemmli (1970).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in der Regel „Mini“-Gele (Mighty Small Dual Gel Caster, Hoefer) mit 10% Polyacrylamid und einer Geldicke von 1 mm eingesetzt. Ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel, bestehend aus Sammel- und Trenngel, wurde wie folgt angesetzt:

<i>Lösung</i>	<i>Trenngel 10 %</i>	<i>Sammelgel 3,5 %</i>
30 % Acrylamid	3,5 ml	0,44 ml
Upper Tris	-	1 ml
Lower Tris	2,5 ml	-
A. bidest	4 ml	2,6 ml
APS 10 %	10 µl	40 µl
TEMED	100 µl	6 µl
Gesamtvolumen	~ 10,1 ml	~ 4,1 ml

Tabelle 3-1: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

1-20 µg des Proteinlysats wurden pro Geltasche aufgetragen. Der Gellauf wurde bei einer Stromstärke von 15 mA durchgeführt, bis die Lauffront das Sammelgel erreicht hatte und dann mit einer Stromstärke von 25 mA fortgesetzt, bis die Lauffront das Gelende erreichte.

3.2.5 Immunoblot-Analyse

Durch Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore, pore size 0,45 µm) wurden durch Western-Blotting, die in der SDS-Page aufgetrennten, negativ geladenen Proteine für die Antikörperdetektion zugänglich gemacht. Das SDS-Gel wurde in A.bidest gewaschen und für 15 min auf dem Tischschüttler in Schaeffer-Nielsen-Puffer äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde für 15 sec in Methanol inkubiert, 2 min in A.bidest gewaschen

und ebenfalls in Schaeffer-Nielsen-Puffer äquilibriert. Der Transfer erfolgt für 50 min bei 300 mA in der Semi-Dry-Blotkammer (OWL) wobei der Aufbau folgendem Schema folgt: Kathode – Papier – Gel – Membran – Papier - Anode. Luftblasen zwischen den Komponenten wurden durch Rollen mit einer 10 ml Pipette entfernt. Nach dem Transfer wurde der Blot kurz mit A.bidest gewaschen und zur Dokumentation mit 0,2 %iger Commassie oder Ponceau - Lösung 5 min gefärbt bis die Proteinbanden sich deutlich absetzten und anschließend mit Entfärberlösung oder Wasser entfärbt. Nach Lufttrocknung der Membran wurde der Blot eingescannt und die Markerbanden mit einem Bleistift markiert.

3.2.5.1 Inkubation des Proteinblots mit Antikörpern

Die Membran wurde 15 s in Methanol, dann 2 min in Millipore-Wasser inkubiert. Nach 30 min Blockierung bei RT mit 100 ml TBST-Lösung wurde die Membran 2 h bei RT mit dem Primärantikörper in 25 ml TBST in einer Petrischale inkubiert. Im Anschluß wurde die Membran 3 x 5 min mit TBST + 1% Triton-X-100 und 1x mit TBST gewaschen. Die Inkubation mit dem in TBST verdünnten Sekundärantikörper erfolgte für 30 min bei RT. Es folgten drei Waschschrte von je 10 min Dauer mit TBST und 1 x mit TBS bei RT.

3.2.5.2 Detektion des Signals

In dieser Arbeit erfolgt der Nachweis durch das Chemilumineszenzverfahren indirekt über sekundäre, mit „Horse Raddish Peroxidase“ (HRP) gekoppelte Antikörper, welche an die proteinspezifischen primären Antikörper binden. HRP katalysiert als Enzym die Oxidation von Luminol (Super Signal, Pierce), wobei Energie in Form von Photonen frei wird. Das entstehende Licht wurde durch Exposition eines Röntgenfilms festgehalten. Zur Signal-Detektion wurde die Membran mit frisch angesetzter Substratlösung (Super Signal Ultra 1:5 mit Bidest. verdünnt) inkubiert. Das Substrat (1 ml) wurde auf eine glatte Oberfläche gegeben, und die Membran mit der proteinhaltigen Seite nach unten aufgelegt und für 5 min inkubiert. Dann wurde die Membran zwischen die Folien eines Vernichtungsbeutels gelegt und ein Röntgenfilm in der Dunkelkammer für 30 s bis 30 min aufgelegt.

3.2.6 Enzymatische-Aktivitätsbestimmung in Linsen und Zell-Homogenisaten

3.2.6.1 Analyse der Proteasom-Aktivität in Linsen und Zellen

Für die Proteasom-Aktivitätsbestimmung wurden 6 Linsen oder eine 80%ig konfluente 10cm-Zellkulturschale in 2 ml EBSS-Puffer in einem Potter-Elvehjem (1200 upm, 4°C, 10 min, Braun) homogenisiert. Das Homogenisat wurde abzentrifugiert (4°C, 14000 upm, 3 min) und der Überstand in die Bestimmung eingesetzt. Als Substrat diente das synthetische Proteasome Substrate III (Calbiochem), welches eine spezifische Spaltstelle (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC) besitzt und nach Spaltung das anregbare Fluorochrom AMC (7-Amino-4-methyl-coumarin) frei gibt. Die Fluoreszenz Emission wurde nach Anregung mit 360nm, bei 460nm mit dem Spectra Plus Multititer Plate Reader (Tecan) gemessen. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 2 Stunden bei 37°C. Die Daten zum Vergleich der Proteasom-Aktivität wurden in der exponentiellen Phase der Reaktion erhoben. Die Durchführung erfolgte wie beschrieben (Petersen et al., 2004)

3.2.6.2 Analyse der Caspase-Aktivität in Linsen und Zellen

Für die Caspase Aktivitätsbestimmung wurde der Caspase-Glow^{TN} 3/7 Assay (Promega) eingesetzt. Dafür wurden 6 Linsen oder eine 80%ig konfluente 10cm-Zellkulturschale in 3 ml eiskaltem Lysispuffer (25mM HEPES pH 7.5, 0.1% Triton, 5mM MgCl₂, 2mM DTT, 1.3mM EDTA, 1 mM EGTA) in einem Potter-Elvehjem (1200 upm, 4°C, 10 min, Braun) homogenisiert. Das Homogenisat wurde abzentrifugiert (4°C, 14000 upm, 3 min) und der Überstand in die Bestimmung nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Der hier verwendete Assay basiert auf dem Angebot eines synthetischen Substrates mit der Caspase spezifischen Spaltstelle in der Sequenz DEVD. Nach Spaltung wird Aminoluciferin frei, welches von der beigefügten Luciferase unter Lichtemission umgesetzt wird. Die freigesetzte Lichtmenge ist dabei proportional zur Caspase Aktivität. Die Lumineszenz Messung erfolgte in einer schwarzen 96-Well-Platte (Nunc) mit dem Spectra Plus Multititer Plate Reader und wird als „Relative Fluorescence Unit“ (RFU) angegeben.

3.2.6.3 Indirekter Nachweis der Transglutaminase-Aktivität

Für die Transglutaminase-Aktivitätsbestimmung wurden je 6 Linsen in 3 ml Salz-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl) mit einem Potter-Elvehjem (1200 upm, 4°C, 10 min, Braun) homogenisiert. Das Homogenisat wurde abzentrifugiert (4°C, 14000 upm, 3 min) und der Überstand nach Zugabe von 2 mM Leupeptin, ein Calpain-Inhibitor der die proteolytische Spaltung von Vimentin verhindert, und 4 mM CaCl₂ auf dem Drehrad für 21 h bei 37°C

inkubiert. Anschließend wurden die Substrate in die SDS-Page und Western Blot eingesetzt um mögliche kovalente Vimentin Kreuzvernetzungen durch Transglutaminase nachzuweisen. Die Durchführung erfolgte wie beschrieben (Clement et al., 1998).

3.3 Zellkultur

Die Kultivierung der 3T3-L1 Mausfibroblasten erfolgte in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt in Zellkulturflaschen. Die Arbeiten mit den Säugerzellen fanden unter sterilen Bedingungen statt, wobei ausschließlich sterile Einmal-Plastikware (FALCON, Becton Dickinson) verwendet wurde.

3.3.1 Allgemeine Kulturbedingungen

3T3-L1 Mausfibroblasten wurden in DMEM-Kulturmedium, unter 2-3 Tägigem Mediumwechsel und einmal wöchentlichem Splitten gehalten. Gesplittet wurden die 3T3-L1 - Zellen bei einer Konfluenz von etwa 90 % durch Trypsinierung und anschließender Ausplattierung mit einer Verdünnung von 1:3 bis 1:10. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend etwa 1/10 des Kulturvolumens an Trypsin zugegeben. Nach einer Inkubation von 4 min bei 37°C wurde das Trypsin durch Zugabe von DMEM- Komplet-Medium inaktiviert, die Suspension zentrifugiert (2 min, 1200 upm, RT, Labofuge 400R) und die Zellen in entsprechendem Volumen Kulturmedium resuspendiert und ausplattiert.

Zum Einfrieren wurden die Zellen einer konfluenten T-25-Kulturflasche trypsiniert, abzentrifugiert (2 min, 1200 upm, RT, Labofuge 400R) und in 2,5 ml Kulturmedium resuspendiert. Je 0,5 ml der Zellsuspension wurden zu 0,5 ml 2x Einfriermedium gegeben, das 20 % DMSO enthielt. Die Röhrchen wurden in einen mit 250 ml Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter (Nalgene) gestellt und üN bei -80°C eingefroren. Die Lagerung erfolgte anschließend in der Gasphase von flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen wurden die in Einfrier Röhrchen gelagerten, gefrorenen Zellen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und kurz in einem 37°C-Wasserbad erwärmt. Anschließend wurden die Zellsuspension in 9 ml Kulturmedium überführt und ausplattiert. Der erste Mediumwechsel erfolgte am nächsten Tag.

3.3.2 Proteasomenblock mit MG-132

Für den Proteasomenblock wurde das Medium von 70-80% konfluente 3T3-L1 Mausfibroblasten in 10cm-Schalen abgenommen und durch vorgewärmtes mit 1,5 μ M MG-132 versetztes Kulturmedium ersetzt. Anschließend wurden die Zellen im Wärmeschrank mit 5% CO₂ bei 37°C inkubiert und unter Standardbedingungen gehalten.

3.4 Tierexperimentelles Arbeiten

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) genehmigt worden. Adulte Tiere wurden durch zervikale Dislokation, alle unter zwei Wochen alten Tiere durch Decapitation getötet.

3.4.1 Tierhaltung

Alle Mauslinien wurden in Mikroisolator Käfigen des IVC-Typs (individually ventilated cage) oder in offenen Tierställen in einem 12-stündigen Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Verpaarungen wurden generell Nachmittags im Verhältnis 1:1 angesetzt. Die Kontrolle des Vaginalpropfens (VP), der aus denaturierten Proteinen des Ejakulats besteht, wurde 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 19,5 Tage nach Konzeption (dpc) mit Beginn der Hell-Phase. Den Jungtieren wurden im Alter von 4 bis 5 Wochen Ohrmarken zur Identifizierung gesetzt. Gleichzeitig wurde von jedem Tier ein Stück der Schwanzspitze abgeschnitten, aus dem genomische DNS gewonnen und der Genotyp der Maus mittels PCR bestimmt wurde.

3.4.2 Bestimmung des embryonalen Entwicklungsstadiums

Unter den oben beschriebenen konstanten Bedingungen ovulieren die Weibchen 3 bis 5 Stunden nach Beginn der Dunkelperiode. Die Männchen, die in demselben Lichtzyklus gehalten werden, verpaaren sich mit den ovulierenden Weibchen etwa in der Mitte des Dunkel-Zyklus. Die Bestimmung des embryonalen Entwicklungsstadiums erfolgte, basierend auf der Annahme, dass die Konzeption in der Mitte des Dunkelzyklus stattgefunden hat. Der Zeitpunkt der Verpaarungskontrolle wurde mit dem Tag 0,5 (E0.5) der Embryonalentwicklung gleichgesetzt.

3.4.3 Präparation Geweben und Organen

Uteri von trächtigen Mäusen wurden nach zervikaler Dislokation aus der Bauchhöhle präpariert und in PBS-Puffer überführt. Die einzelnen Implantationsstellen wurden voneinander getrennt und für die Herstellung von Gefrierschnitten in -80°C kaltem Isopentan eingefroren und bei -80°C gelagert. Organe von Neugeborenen wurden nach Decapitation, von adulten Tieren nach zervikaler Dislokation, entnommen und in -80°C kaltem Isopentan eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C oder in der Gasphase von flüssigem Stickstoff.

3.5 Histologie

3.5.1 Immunfärbung und Gewebefärbung von Paraffinschnitten

Frisch präparierte Gewebe wurden in Carnoy's Fixativ für 2 Stunden oder in Formalin in fixiert und anschließend im Gewebeeinfiltrationsautomat (Tissue-Tek VIP) entwässert und paraffiniert. Danach wurden die Gewebe in Paraffin eingebettet und histologische Schnitte in einer Dicke von $4\ \mu\text{m}$ mit einem Mikrotom (Leica) angefertigt. Die Schnitte wurden für 2 Stunden bei 37°C getrocknet und zur Entparaffinierung zweimal für 5 min in Xylol unter dem Abzug inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in eine absteigende Alkoholreihe (2 x 100 %, 2 x 90 %, 1 x 70 %) für jeweils 45 sec. getaucht und für 2 min in A.bidest gewaschen und für histochemische und histologische Färbemethoden eingesetzt. Zur Untersuchung von Gewebeunterschieden wurde überwiegend mit einer Eosin-/Hämatoxylin-Lösung gefärbt (Bancroft und Cook, 1994). Für die Immunfärbung von Paraffinschnitten wurden die Schnitte zur Antigenwiederherstellung für 25 min in Kunststoffküvetten in Citratpuffer gekocht. Dabei werden die durch Formalin geknüpften Verbindungen wieder aufgebrochen. Anschließend wurden die Dünnschnitte auf RT abgekühlt und mit PBS gewaschen. Die Antikörperinkubation erfolgt wie in (3.5.3) beschrieben, wobei der Nachweis des Antigens indirekt über am sekundären Antikörper gekoppeltes Biotin erfolgt, welches von Peroxidase gekoppeltem Streptavidin erkannt wird und durch Katalyse des farblosen AEC-Substrates (3-Amino-9-Ethyl-Carbazol) einen roten Niederschlag erzeugt.

3.5.2 Fixierung von Gewebe durch Ganzkörperperfusion für die Elektronenmikroskopie

Um für die Elektronenmikroskopie optimal erhaltene fixierte Augen oder andere Gewebe zu erhalten, wurden diese durch Ganzkörperperfusion fixiert. Dabei penetriert das

Fixierungsmittel über das Blutgefäßsystem in die Organe. Die Mäuse wurden gewogen und pro 10g Körpergewicht 0,1 ml Betäubungsmittel intraperitoneal injiziert. Nach Narkotisierung der Mäuse wurde auf Höhe des Sternum der Brustkorb geöffnet und das Herz freigelegt. In die linke Hauptkammer des pulsierenden Herzens wurde zunächst Heparin-Lösung injiziert, welche die Gerinnung des Blutes unterbindet. Mit einer Butterfly-Kanüle wurde dann über einen Schlauch ca. 10 ml physiologische Kochsalzlösung injiziert, wodurch der Druck im Herz-Gefäßsystem steigt und das gesamte Blut aus dem Gefäßkreislauf gespült wird. Ein Entlastungsschnitt in das rechte Atrium verhinderte hierbei die Schädigung von Gewebe durch Überdruck. Anschließend wurden ca. 30 ml Karnovsky-Fixativ (2%) mittels einer Spritze in das Gefäßsysteme gepumpt bis die gesamte Maus fixiert war. Anschließend wurden die zu Untersuchenden Organe präpariert und 1 h in 1% Osmium nachfixiert, zweimal in 0,1 M Phosphatpuffer gespült und durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert (je 10 min: 30, 50, 70, 96% Ethanol und zweimal 10 min Ethanol absolut). Nach Inkubation in Propylenoxid (2x 15 min) wurden die Proben in Epon eingebettet: 1 h in Epon I, üN in Epon II (RT). Zum Ausbetten wurden die Proben in reinem Epon bei 37°C 5 h bis 10 h, dann bei 45°C üN und anschließend bei 60°C für mindestens 16 h inkubiert. Die Präparate waren wahlweise für Semidünnschnitte oder für die Elektronenmikroskopie einsetzbar.

3.5.3 Immunfluoreszenznachweis von Proteinen in Zellen und Gefrierschnitten

Die für die Immunfluoreszenz-Analyse präparierten Gewebe wurden vor dem Schneiden in TissueTek® eingebettet. Anschließend wurden am Kryostaten (Leica) Gefrierschnitte hergestellt. Das Trimmen des Gewebes erfolgte bei 35 µm. Die Schnittdicke betrug in der Regel 5 bis 7 µm, bei der Herstellung von Gewebeschnitten für konfokale Aufnahmen 10-20 µm. Die Schnitte wurden bei einer Umgebungstemperatur von -21°C und einer dem Gewebe angepassten Objekttemperatur von -18 bis -25°C angefertigt. Die Schnitte wurden auf Superfrost®Plus Objektträger (Merck) aufgezogen und 1-2 h luftgetrocknet. Nicht sofort verarbeitete Gewebeschnitte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte für 10 min in vorgekühltem Aceton (-20°C) fixiert und dann erneut luftgetrocknet.

Zur Untersuchung der 3T3-L1 Mausfibroblasten wurde diese auf autoklavierten Deckgläsern bis zu 80%igen Konfluenz kultiviert. Die Deckgläschen kurz in 1x PBS-Puffer (pH 7,4) gewaschen, dann 5 min in Methanol (-20°C) fixiert und 30 sec in Aceton (-20°C) dehydriert, in PBS gewaschen und direkt weiterverwendet.

Die primären Antikörper wurden in 1x PBS⁺ oder 1x TBS⁺ verdünnt und auf die Gewebeschnitte appliziert, so dass diese vollständig bedeckt waren. Nach Inkubation in einer feuchten Kammer (1 h, RT) wurden die Objektträger dreimal kurz in PBS-Puffer (pH 7,4) gewaschen und für 30 min in einer feuchten Kammer mit dem verdünnten Zweitantikörper inkubiert. Zur Kernfärbung wurde DAPI für die letzten 5 min der Zweitantikörperinkubation zugegeben. Die Präparate wurden dann wie zuvor beschrieben gewaschen, kurz in A. bidest, dann in absolutem Ethanol getaucht und schließlich an der Luft getrocknet. Bei Doppelimmunfluoreszenzen wurden erst beide primären sowie anschließend beide sekundären Antikörper gleichzeitig appliziert. Zum Fixieren der Gewebeschnitte wurden die Schnitte mit vorgewärmtem Mowiol + DABCO (37°C) eingedeckt. Die Objektträger wurden üN getrocknet. Die Dokumentation der Immunfluoreszenz erfolgte über ein Axiophot II TM-Mikroskop (Zeiss) mit einer Digitalkamera (AxioCam, Zeiss) und einem Bildverarbeitungsprogramm (AxioVision, Zeiss).

3.6 Computergestützte Analysen

Die Analyse oder Manipulation von Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen wurde mit den Programmen HUSAR („Heidelberg UNIX Sequence Analysis Resources“) des deutschen Krebsforschungszentrums (Heidelberg), Primer3 (Whitehead Institute for Biomedical Research), pDRAW32 DNA Analysis software (AcaClone software) oder Chromas v.2.1 (Technelysium) durchgeführt.

Zu Analysen von genomischen Sequenzen der Maus und des Menschen wurden die Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (NIH), der Ensembl Genome Browser (Wellcome Trust Sanger Institute) und der UCSC Genome Browser (University of California Santa Cruz) eingesetzt.

Zur Densitometrischen Messung von Ethidium-Bromid gefärbter DNS im Agarosegel und Chemilumineszenz Signalen von Proteinkonzentrationen in der SDS-Page wurde das Grafikprogramm ImageJ V1.36 (NIH) benutzt. Fotos von DNS-Agarosegelen wurden direkt mit dem Intas System digital im Jpeg-Format gespeichert und zur Vermessung eingesetzt. Für die Auswertung der Immunoblot-Daten wurden die exponierten Filme (Medical X-Ray, Fuji) mit einem Scanner (AGFA) als 8-Bit-RGB Bild im Tiff-Format mit einer Mindestauflösung von 350dpi eingelesen und anschließend ausgewertet.

Bildverarbeitungen wurden mit den Programmen Axiovision LE Rel. 4.2 (Zeiss), Photoshop V6.0 (Adobe), Corel Draw 12.0 und IrfanView V3.98 vorgenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Funktionsanalyse von Vimentin transgenen Mäusen

Aufgrund des milden Phänotyps der Vimentin „knockout“ Maus sollte durch transgene Mäuse, die mutiertes Vimentin exprimieren, welches für die Zelle toxische Eigenschaften besitzt, durch molekularbiologische und biochemische Analysemethoden ein Beitrag zur Aufklärung der *in vivo* Funktion des Proteins geleistet werden.

Alle im folgenden beschriebenen Versuche und Analysen wurden mit allen transgenen Linien (VimWt, VimR₁₁₃C und VimΔC2B) gleichermaßen durchgeführt. Als Kontrolle dienten stets transgene VimWt Tiere, die transgen c-myc markiertes Wildtyp Vimentin exprimierten und keinen Unterschied zu Wildtyp C57Bl/6 Mäusen aufwiesen (siehe Abb. 4-1). Bei gleichen Phänotypen und Ergebnissen der Mutanten VimR₁₁₃C und VimΔC2B, sind die Resultate oftmals zur Vereinfachung exemplarisch nur für die VimR₁₁₃C Punkt-Mutante gezeigt. Bei Abweichungen der Ergebnisse der VimΔC2B im Vergleich zur VimR₁₁₃C-Mutante, die aus der drastischeren Veränderung der Proteinstruktur von VimΔC2B hervorgehen, sind diese gesondert aufgeführt und im Text erwähnt. Die VimΔC2B-Mutante führte meist zu einem verstärktem Phänotyp, aber nicht zu unterschiedlichen Ergebnissen wie die VimR₁₁₃C-Mutante.

4.1.1 Herstellung der transgenen Mauslinien VimWt, VimR113C und Vim ΔC2B

In Vorarbeiten von D. Bröhl (Bröhl, 2002) wurden drei Konstrukte kloniert, die aus genomischer Maus-DNS bestehen und neben dem Vimentin-Gen 10,5 kb an 5'-regulatorischen Bereichen und die Sequenz des humanen c-myc-Epitops enthalten. Außerdem wurde die Punktmutation R₁₁₃C und die Deletion ΔC2B von „coil2B“ der zentralen Domäne in das Gen eingeführt (Abb. 4-1). Die Punktmutation R₁₁₃C liegt in einem hochkonserviertem Bereich der Coil 1A Domäne, die essentiell für das Zusammenlagern von IF-Proteinen ist. Zudem ist dort durch die Gensequenz ein Hot-Spot für Mutationen gegeben. Die ΔC2B Deletion verhindert garantiert die Ausbildung intakter Filamente, da ohne die Coil 2B Domäne keine coiled-coil Struktur möglich ist (Herrmann and Aebi, 1998; Herrmann et al., 2000).

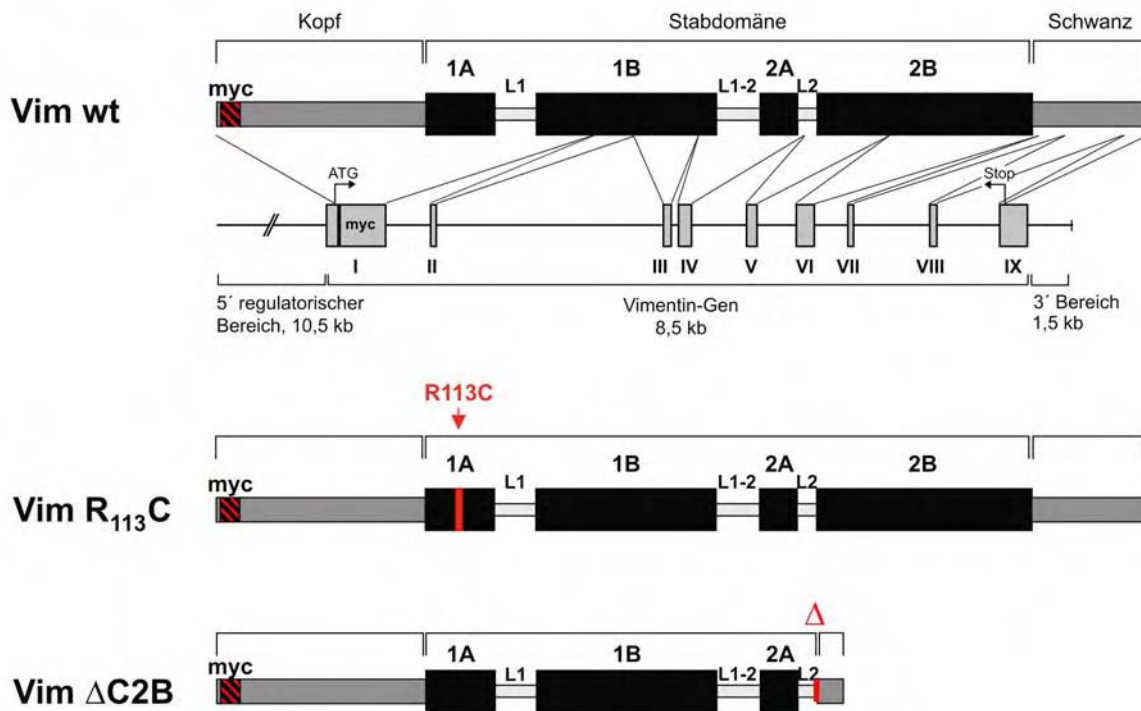


Abb. 4-1 Schematische Darstellung der Gen- und Domänenstruktur der transgenen Vimentin Konstrukte

A, zeigt die Struktur des c-myc-markierten VimWt-Konstrukts als Gen und Domänenstrukturschema. Dieses Konstrukt wurde in allen folgenden Experimenten als Kontrolle verwendet. B, zeigt die Proteinstruktur des Punktmutationskonstruktes mit dem Aminosäureaustausch an Position 113 von Arginin zu Cystein. R₁₁₃C markiert die Position des Aminosäureaustausches in der konservierten 1A Region. C, zeigt die Struktur des Deletionskonstruktes. Δ gibt die Position der Deletion von 159 Aminosäuren der Coil2B Domäne an. Die Graphik verdeutlicht die dreigeteilte Struktur von IF-Proteinen in Kopf, Schwanz und Stabdomäne. Die nicht-helikalen Kopf- und Schwanzdomänen (gunkelgrau) flankieren die α-helikalen Stabdomänen 1A, 1B, 2A und 2B (schwarz), die durch die Linkerregionen L1, L12 und L2 (hellgrau) getrennt sind. myc, c-Myc-Epitope. falscher Schrifttyp

In den Konstrukten wurden alle bekannten regulatorischen Elemente des Vimentin Promotors erfasst, der in den transgenen Mäusen die Gewebespezifität und Menge der Expression, analog zum endogenen Vimentin, garantieren sollte.

4.1.1.1 Etablierung der transgenen Mauslinien

Zur Etablierung der transgenen Mauslinien mussten die Gewebespezifität und die Menge der Expression des Transgens überprüft werden. Bei der Mikroinjektion in den Pronukleus integriert die DNS zufällig in das Mausgenom und wird mit den endogenen Chromosomen repliziert, wodurch sie ein Teil des Genoms des neu geformten Embryos wird. Die so erhaltenen Gründertiere sind meist hemizygot für das Transgen, da normalerweise nur eine oder mehrere Kopien hintereinander in einen Locus in das Chromosoms integriert. Durch die zufällige Integration in das Wirtsgenom hängt die Expression des Transgens aber nicht nur

von der Anzahl der integrierten Kopien, sondern auch von der Position der Integration ab. Dabei können „Positionseffekte“ entstehen, das heißt z.B. verminderte Expression des Transgens durch benachbarte Silencer-Elemente oder durch Integration in transkriptionell inaktive Regionen oder ektopische Expression durch benachbarte Enhancer-Elemente. Zudem müssen Integrationen des Transgens in transkribierte Regionen eines Wirtsgens berücksichtigt werden, die zu Inaktivierung anderer Gene führen und somit zu Phänotypen, die nicht ursächlich aus der Insertion des Transgens hervorgehen (Papaioannou and Behringer, 2004).

Um für das Transgen heterozygote Mäuse zu erzeugen, wurden alle folgenden Verpaarungen der transgenen Tiere mit C57Bl/6 Mäusen durchgeführt, um Positionseffekte die zu ungewollter Inaktivierung von Genen führen zu umgehen. Zudem wurden mehrere unabhängige transgene Mauslinien erzeugt, die übereinstimmende Phänotypen zeigten, welche dann gesichert als Folge des Transgens interpretiert werden konnten. Die Gewebespezifität und Expressionsmenge der Transgene wurde im folgenden durch Immunfluoreszenzanalysen und biochemische Untersuchungen geklärt.

4.1.1.2 Kontrolle der transgenen Proteinexpression der Gründertiere

Zur Kontrolle der Vimentin Proteinexpression der genotypisch positiven Gründertiere, wurden diesen Ohrbiopsien entnommen und die Expression des Transgens durch Immunfluoreszenz an Kryoschnitten nachgewiesen. Der selektive Nachweis des Transgens erfolgte über einen spezifischen Antikörper gegen das c-myc Epitop. In Abb. 4-1 ist exemplarisch die Expression der verschiedenen Mutanten in Lipocyten des Ohres und Endothelzellen zu sehen.

Von neun Gründertieren der VimR₁₁₃C Mutante exprimierten sieben Mäuse kaum oder kein transgenes Protein. Somit wurden drei Gründertiere zur weiteren Zucht verwendet. Von zehn Gründertieren der VimWt Linie exprimierten sechs Tiere kaum bis mässig transgenes Protein. Somit konnten vier Gründertiere zur Etablierung der Zucht verwendet werden. Von VimΔC2B standen insgesamt nur vier Gründertiere nach der Mikroinjektion zur Verfügung, wovon nur eines eine in der Immunfluoreszenz nachweisbare Menge des Transgens exprimierte.

Alle ausgewählten Gründertiere gaben das Transgen an ihre Nachkommen weiter und die transgene Expression konnte in der Tochtergeneration aufrecht erhalten werden. Somit konnten alle ausgewählten Gründertiere für die Zucht verwendet werden.

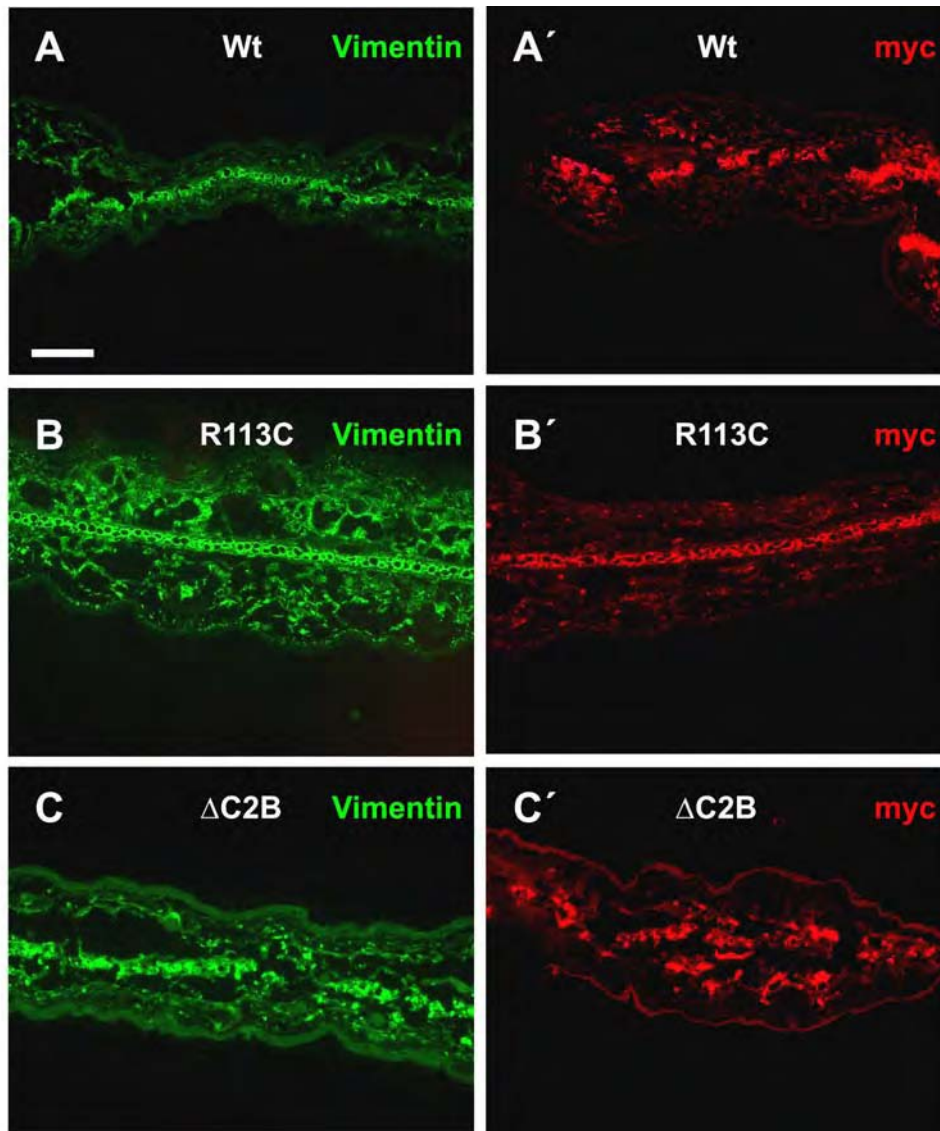


Abbildung 4-2 Kontrolle der transgenen Proteinexpression der Gründertiere im Ohr

Kryoschnitte vom Ohrgewebe der Gründertiere wurden mit indirekter Immunfluoreszenz gegen Vimentin (grün) und c-myc (rot) gefärbt. A, B und C, zeigt die gesamte Vimentin-Expression eines *VimWt*, *VimR₁₁₃C* und *VimΔC2B* Gründertieres. A', B' und C', zeigen die Expression des Transgens in denselben Tieren in versetzter Schnittebene. Balken, 100μm

In der ersten, vorläufigen Analyse der Expression durch Immunfluoreszenz wurde jedoch deutlich, dass für alle drei Mutanten eine geringere Expression des Transgens im Vergleich mit der endogenen Vimentin-Expression zu beobachten war (Abb. 4-2). Offensichtlich wurde bereits hier, dass die *VimΔC2B* Mutante zu Aggregation der Vimentin-Filamente in Zellen führt. In der *VimR₁₁₃C* Mutante konnte dies im Mausohr noch nicht beobachtet werden. Wie erwartet bildete das *VimWt* Transgen mit endogenem Vimentin ein unverändertes Vimentin-Zytoskelett aus, sodass es als Kontrolle für weitere Experimente eingesetzt werden konnte.

4.1.2 Genereller Phänotyp der transgenen Mauslinien

Vimentin wird in allen Geweben mesenchymalen Ursprungs, in Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems, Astrozyten und in der embryonalen Mausentwicklung exprimiert (Colucci-Guyon et al., 1994; Dellagi et al., 1983; Franke et al., 1982). Aufgrund der dominant negativen Wirkung der mutierten Vimentin Proteine *in vitro*, konnte von Störungen in der Embryonalentwicklung, der neuronalen Entwicklung oder mit Bindegewebsdefekten gerechnet werden.

Überraschenderweise konnte bei keiner der transgenen Linien zunächst ein offensichtlicher Phänotyp beobachtet werden. Beide Mutanten und die transgene Wildtyp-Linie waren uneingeschränkt fertil und zeigten keine offensichtlichen Zeichen für Defekte in der embryonalen Entwicklung oder Veränderungen in Vimentin exprimierenden Organen und Geweben. Alle Mäuse zeigten ebenfalls eine normale Gewichtszunahme und bestätigten erwartete Bindegewebsdefekte nicht. Somit ergaben sich in der ersten Analyse keine offensichtlichen Phänotypen oder pathologische Effekte nach transgener Vimentin Expression.

4.1.2.1 Proteinexpressionsanalyse von VimWt, VimR₁₁₃C und Vim Δ C2B in Organen und Geweben der Maus

Zur genauen Analyse der transgenen Proteinexpression wurden zunächst alle Vimentin exprimierenden Organe präpariert, Gesamtproteinextrakte hergestellt und im Western-Blot untersucht. Expression des Transgens konnte dabei in Mäusen der VimWt, VimR₁₁₃C und Vim Δ C2B-Linien nur in der Milz und den Augen nachgewiesen werden. Bei den meisten Geweben stellen Vimentin exprimierenden Zellen nur einen geringen Anteil dar. Da diese Zellen nicht angereichert wurden, war die mittels Western-Blot detektierbare Menge an Vimentin zu gering.

4.1.2.2 Immunfluoreszenzanalyse Vimentin exprimierender Organe und Gewebe

Um die Expressionsmuster der Transgene in einzelnen Zellen zu untersuchen, wurden indirekte Immunfluoreszenzfärbungen an Kryoschnitten von Auge, Gehirn, Herz, Lunge, Milz, Leber, Lymphknoten, Niere, Knochenmark, Haut und Darm mit Antikörpern gegen Vimentin und das c-myc-Epitop durchgeführt (Abb. 4-3). In allen untersuchten Organen konnte in einzelnen, spezifischen Zellen der Gewebe transgenes Vimentin detektiert werden. Abb.1-3 zeigt eine Auswahl an Färbungen verschiedener Zelltypen in verschiedenen Geweben von VimR₁₁₃C Mäusen.

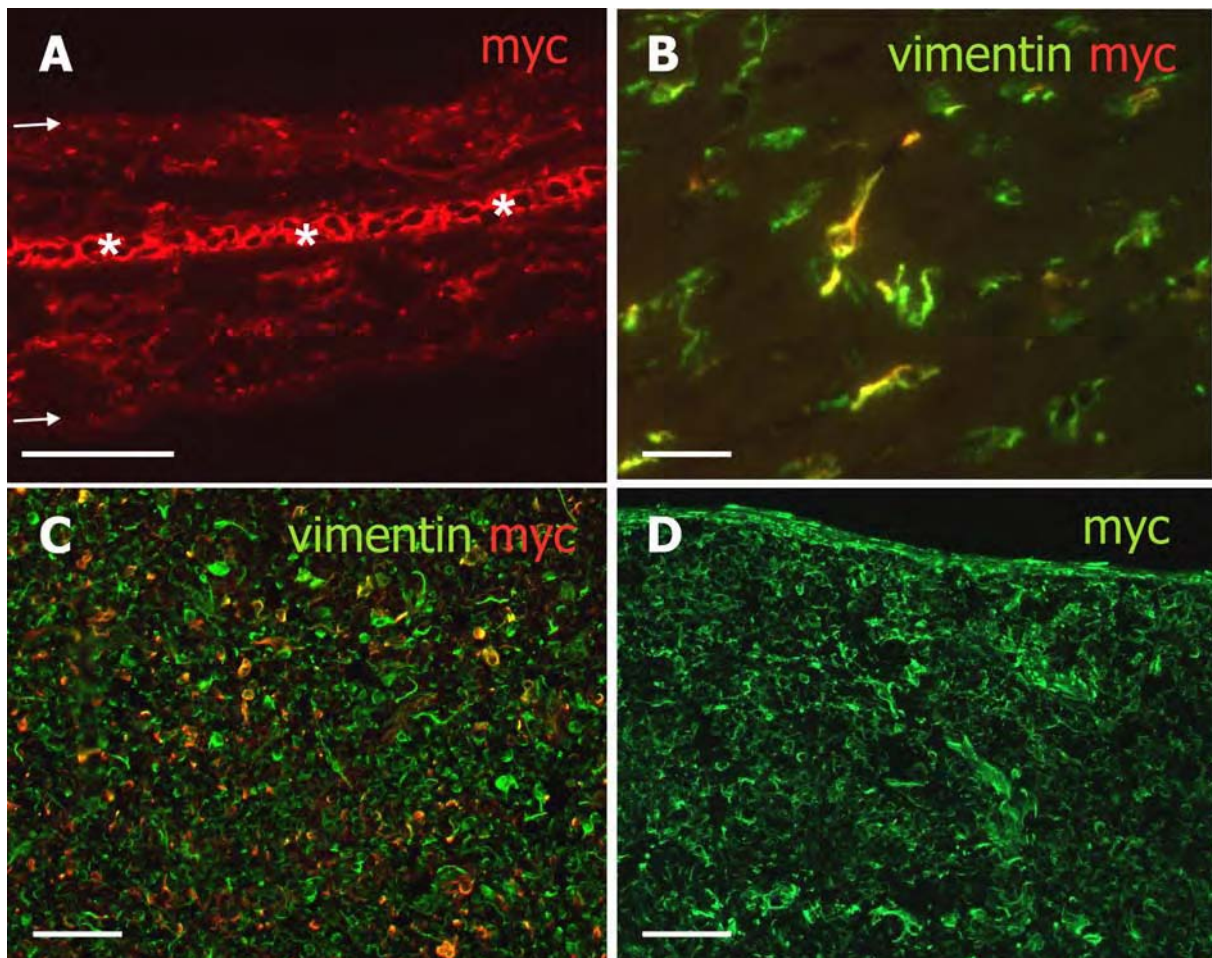


Abb. 4-3 Transgene Vimentin Expression in verschiedenen Geweben der Maus

Kryoschnitte des Ohrs (A), des Herzens (B), der Lymphknoten (C) und der Milz (D) von 4 Monate alten Vim R₁₁₃C Mäusen wurden spezifisch mit Antikörpern gegen Vimentin (grün) und das c-myc-Epitop (rot) (außer in D ist c-myc grün) gefärbt. Das mutierte transgene Vimentin war in denselben Zelltypen wie endogenes Vimentin exprimiert. Deutlich wird die geringere Menge mutiertes Protein, hier gezeigt durch Doppelfluoreszenzfärbungen von Endothelzellen des Herzens und Lymphozyten des Lymphknotens (B und C). Der Stern in A markiert Vimentin exprimierende Lipozyten unterhalb der Dermis im Mausohr. Pfeile markieren die Lage der Epidermis. Balken, 20 µm

Lediglich in den Glomeruli-Zellen der Niere war kein Transgen eindeutig nachweisbar. Transgenes Vimentin wurde in denselben Zellen wie endogenes Vimentin exprimiert, womit die Spezifität der Expression bezeugt war. Das Transgen wurde z.B. in Endothelzellen des Herzens, des Darm oder der Lunge, sowie in Makrophagen der Milz, in Adipozyten des Fettgewebes, in Fibroblasten der Epidermis, Linsenzellen des Auges und speziellen Gliazellen der Retina nachgewiesen. Der endogene Promotor vor den mutierten Vimentin Genen VimR₁₁₃C, VimΔC2B und vor dem VimWt-Konstrukt, gewährleistete somit die zellspezifische Regulation der Proteinexpression *in vivo* in verschieden Zelltypen. Eindeutige Vimentin Aggregate oder der Kollaps des Zytoskeletts, wie sie *in vitro* für die Mutationen

gezeigt wurden (Schietke et al., 2006), konnten nur in Linsenfasern der Augenlinse von transgenen $VimR_{113}C$ und $Vim\Delta C2B$ Mäusen beobachtet werden.

4.1.3 Pathologie transgener $VimR_{113}C$ und $Vim\Delta C2B$ Mäuse

Obwohl in Immunfluoreszenzanalysen teilweise Vimentin Aggregationen in einzelnen Zellen gezeigt werden konnten, schien dies keine pathologischen Folgen für die Gewebe zu haben. Vermutlich war die Expression des Transgens zu gering, um toxisch auf die Zellen zu wirken oder die Differenzierung oder Entwicklung im gesamten Gewebeverbund zu beeinflussen. Aufgrund des erheblichen Vorkommens von Vimentin in der Linse wurde eine mögliche Pathologie der transgenen Vimentin Expression in den Linsenfasern vermutet. Zudem zeigte sich nach ersten Immunfluoreszenzen in den Linsenfasern die größte Ansammlung aggregierter Proteine.

4.1.3.1 Juveniler Katarakt in transgenen $VimR_{113}C$ und $Vim\Delta C2B$ Mäusen

Nach drei Monaten wurde in transgenen Mäusen äußerlich eine Pathologie sichtbar. $VimR_{113}C$ und $Vim\Delta C2B$ Mäuse entwickelten eine Trübung der Linse, die als überreifer Katarakt bezeichnet wird, wenn dieser von außen als grauer Schleier sichtbar ist (Abb. 4-4).

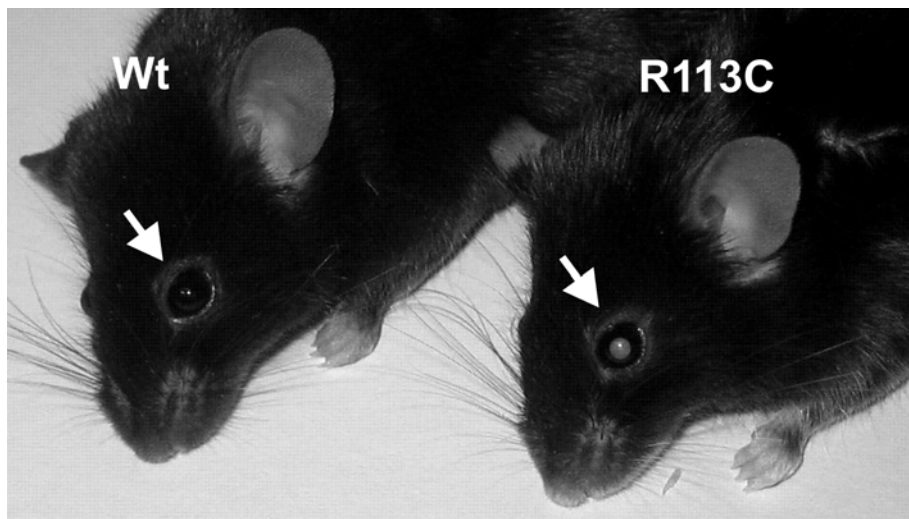


Abb. 4-4 Katarakt Entwicklung und Linsentrübung in Vimentin transgenen Mäusen
S/W-Digitalfotografie von 5 Monate alten transgenen $VimR_{113}C$ und $VimWt$ Mäusen. Deutlich ist die Trübung der Linse als weißer Schleier im Auge der $VimR_{113}C$ transgenen Maus zu erkennen. Im Vergleich dazu das normale „schwarze“ Auge der $VimWt$ Maus. (Siehe Pfeile).

4.1.3.2 Ophthalmologische Spaltlampenuntersuchung der Linsen

Zur weiteren Diagnose wurden 2,5 bis 6,5 Monate alte Mäuse einer Spaltlampenuntersuchung unterzogen. Die Untersuchung mit der Spaltlampe erlaubt eine mikroskopische Betrachtung des vorderen Auges und kann durch ihre spezielle Lichtführung einen optischen Schnitt durch das Auge legen, so dass Veränderungen der verschiedenen Strukturen der Linse beurteilt werden können.

Alle untersuchten VimWt Mäuse zeigten eine normale Struktur der Linse. Auch die Linsen der 6 Monate alten VimWt Tiere waren klar und unauffällig, wie bei Wildtyp Mäusen erwartet wurde. Bei den 2,5 Monate alten VimR₁₁₃C Mäusen konnte schon bei einer von drei untersuchten Mäusen mit der Spaltlampe gespinstartige Ablagerungen erkannt werden, die von kleiner Struktur und intrazellulär lokalisiert waren. Zudem konnte ebenfalls eine erhöhte Anzahl undifferenzierter Linsenfasern beobachtet werden. Weiterführende Folgen konnten im jungen Alter von 3 Monaten bei den Vim Δ C2B Mäusen festgestellt werden. Vier von fünf Vim Δ C2B Mäusen zeigten im Alter von 3 Monaten eine klinische Pathologie in der Linse. Dies äußerte sich in geringer bis starker Trübung der Linse, wobei Einschlüsse hauptsächlich den sekundären Faserzellen zugeordnet werden konnten. Aber auch zu diesem Zeitpunkt wurden bei einer Vim Δ C2B Maus im Ansatz schon Trübungen im Kernbereich der Linse beobachtet.

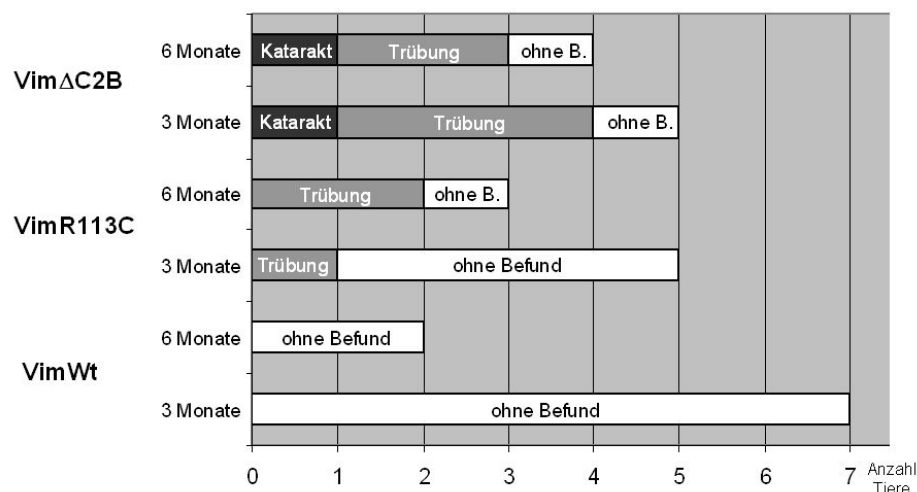


Tabelle 4-1 Diagnose der Kataraktentwicklung durch Spaltlampenuntersuchung

Im Alter von 6 Monaten wurde bei 4 von 5 untersuchten VimR₁₁₃C Tieren eine leicht bis stark ausgeprägte Trübung der Linse diagnostiziert. Die Linse einer Vim Δ C2B Maus war nach 6 Monaten komplett trüb. Außerdem war die Vorkammer des Auges erweitert, was auf eine Degradation der Linse hindeutete (siehe EM Analyse der Linse). Zudem waren die äußeren

posterioren Linsenfasern deformiert. Zusammengefasst zeigten fast alle mutierten transgenen Mäuse in der Spaltlampenuntersuchung eindeutige Anzeichen für fortschreitende Kataraktentwicklung, während die VimWt Kontrollmäuse völlig ohne Krankheitsbild blieben. Zu erwähnen ist hierbei, dass die Katarakte in verschiedenen Mäusen gleichen Genotyps eines Wurfs verschieden stark ausgeprägt waren, unabhängig von ihrem Lebensalter. Diese unterschiedlichen Grade der juvenilen Katarakte machen den individuellen Charakter des Fortschreitens der Pathologie deutlich und zeigten einen deutlichen temporär abhängigen Verlauf.

4.1.3.3 Endogene vs. transgene Proteinexpression in der Linse

Aufgrund der eindeutigen Diagnose der Katarakt-Entwicklung in mutierten transgenen Mäusen wurden die Linsen der Mäuse präpariert und zunächst biochemischen Analysen unterzogen. Ein generelles Phänomen in Mausmodellen die transgen für in der Linse exprimierte Proteine sind, ist die Bildung von Katarakten, häufig hervorgerufen durch Überexpression des Transgens. So führte auch die 20fache Überexpression von transgenen Hühner-Vimentin in der Maus zur Störungen der Linsenfaserdifferenzierung (Capetanaki et al., 1989).

Um pathologischen Konsequenzen durch Überexpressionsartefakte in den transgenen Mäusen auszuschließen, wurden die transgenen Vimentin Proteinmengen in der Linse durch densitometrische Messungen überprüft. Dafür wurden Zytoskelettprotein-Präparationen von Augen der Neugeborenen und von Linsen der drei und zwölf Monate alten transgenen Mäuse hergestellt.

Gleiche Proteinmengen aus Präparationen transgener VimR₁₁₃C, Vim Δ C2B und VimWt Linsen drei Monate alter Tiere, wurden nach Western Blot einer densitometrischen Messung unterzogen. Der Antikörper gegen Vimentin erkennt endogenes sowie transgenes Vimentin gleichermaßen, was die Untersuchung der relativen Proteinmengen auf nur einem Blot erlaubt. Dabei konnte das VimWt und VimR₁₁₃C transgene Protein durch sein verändertes Laufverhalten, bedingt durch die Größenzunahme von ca. 1 kDa aufgrund des c-Myc-Epitops, einfach von endogenem Vimentin unterschieden werden (Abb. 4-5). Vim Δ C2B läuft aufgrund seiner Deletion von 159 Aminosäuren bei eine Größe von 38 kDa.

Die densitometrischen Auswertungen der Proteinmengen ergab ein Verhältnis von 1:4 für mutiertes Protein zu endogenem Protein in der Linse der VimR₁₁₃C Mäuse. Dadurch konnte in VimR₁₁₃C Mäusen die Pathologie auf die Funktion des transgenen Vimentins bezogen

werden und Überexpressionsartefakte ausgeschlossen werden. Die bei $\text{Vim}\Delta\text{C2B}$ Mäusen schneller fortschreitende Pathologie ist möglicherweise auf die in der Messung offensichtlich gewordenen erhöhten Dosis des transgenen Proteins zurückzuführen. Da von $\text{Vim}\Delta\text{C2B}$ nur eine Mauslinie zur Verfügung stand, konnte das Fortschreiten der Pathologie nicht weitergehend in Abhängigkeit von der Expressionsmenge von $\text{Vim}\Delta\text{C2B}$ untersucht werden.

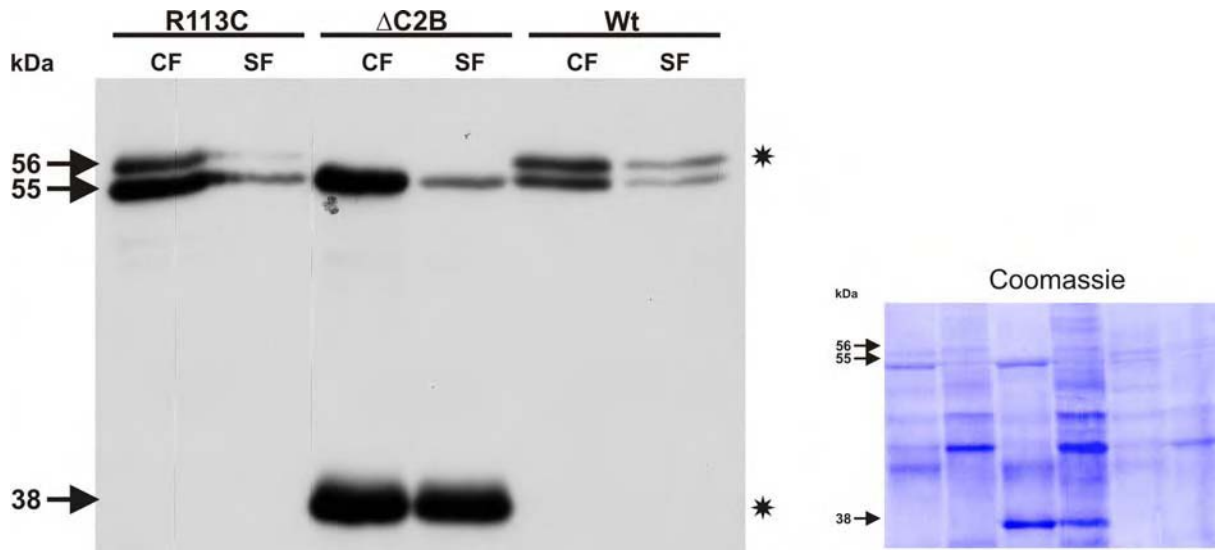


Abb. 4-5 Western Blot-Analyse von endogenem und transgenem Vimentin von VimWt , $\text{VimR}_{113}\text{C}$ und $\text{Vim}\Delta\text{C2B}$ Mäusen.

Zytoskelettfractionen (CF) und lösliche Fractionen (SF) wurden in gleichen Proteinmengen geladen. Die Immundetektion wurde mit einem Antikörper gegen Vimentin durchgeführt, der sowohl das endogene wie auch das transgene Protein erkennt. Transgenes Protein ist auf seiner Laufhöhe mit einem Stern gekennzeichnet und hat für VimWt und R_{113}C eine Größe von 56 kDa. Transgenes $\text{Vim}\Delta\text{C2B}$ läuft aufgrund seiner verkürzten Form bei 38 kDa. Densitometrische Messungen ergaben ein Verhältnis in der CF Fraction von transgenem zu endogenem Protein von 1:4 in $\text{VimR}_{113}\text{C}$ Mäusen, bei $\text{Vim}\Delta\text{C2B}$ von 1 zu 0,75 und bei VimWt von 1:1. Gleiche Verhältnisse ergaben sich für die löslichen Fractionen bei $\text{VimR}_{113}\text{C}$ und VimWt Präparationen. Lediglich in der SF von $\text{Vim}\Delta\text{C2B}$ Linsen befand sich überproportional viel transgenes Protein. Auffällig ist die Umschichtung von transgenem $\text{VimR}_{113}\text{C}$ von der löslichen (SF) in die Zytoskelettfraction (CF). Als Ladekontrolle ist die Coomassie-Färbung der Membran nach dem Western Blot gezeigt.

Aufgrund der Zeitabhängigkeit der Kataraktentstehung und um Aufschluss über den Zeitpunkt der beginnenden Trübung der Linse zu bekommen, wurden gleiche Messungen auch mit Neugeborenen und 6 Monat alten Tieren vorgenommen. Die Verhältnisse der Proteinmengen als auch das native Vorkommen von transgenem und endogenem Vimentin blieb dabei unverändert im Bezug auf das Alter der Tiere. Somit hängt der Krankheitsverlauf nicht von dem Verhältnis von endogenem zu transgenem Vimentin Protein in den

Linsenfaserzellen ab, sondern muss von äußeren Einflüssen gesteuert sein, die entweder Vimentin selbst modulieren oder von einem intakten Vimentin Filamentsystem abhängig sind.

4.1.3.4 Histologische Veränderungen der Linse

Zur ersten Bestimmung der Auswirkung der transgenen Proteinexpression wurden Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbte Seriidünnschnitte der Augen analysiert. Die Linsen der 5 Monate alten $VimR_{113}C$ und $Vim\Delta C2B$ Tiere zeigten, im Vergleich zu $VimWt$ Linsen, eine weichere Konsistenz und höhere Fragilität. Zudem konnten deutliche Rupturen und morphologische Veränderungen unter dem Binokular beobachtet werden (Abb. 4.6)



Abb. 4-6. Dünnschnitte der Augen 5 Monate alter transgener Vimentin Mäuse

Gezeigt sind Dünnschnitte paraffinierter Augen von $VimWt$, $VimR_{113}C$ und $Vim\Delta C2B$ Mäusen nach HE-Färbung. Deutlich zeigt sich in Linsen der $R_{113}C$ Mäuse die veränderte disruptierte Morphologie und höhere Fragilität. Besonders deutlich wird die veränderte mechanische Instabilität bei den $Vim\Delta C2B$ Linsen, die nicht als ganzes auf den Objektträger zu überführen waren.

Weiterführende Veränderungen der $VimR_{113}C$ oder $Vim\Delta C2B$ Linsen, hinsichtlich ihrer Größe oder Formgebung konnten, in den Übersichten nicht beobachtet werden. Ebenso waren umliegende Gewebe im Auge anscheinend durch die veränderten Linsenbeschaffenheiten anatomisch nicht betroffen.

4.1.4 Aggregatbildung in Linsen transgener $VimR_{113}C$ und $Vim\Delta C2B$ Mäuse

Nachdem makroskopisch und in histologischen Übersichtsschnitten die altersabhängige Kataraktentwicklung in $VimR_{113}C$ und $Vim\Delta C2B$ Linsen gezeigt werden konnte, und für die exprimierten Proteinmengen keine unterschiedliche Expressionsstärke in Neugeborenen und adulten Tieren festgestellt wurde, stellte sich die Frage nach dem Expressionsmuster des transgen Proteins und der mikroskopischen Korrelation des Krankheitsverlaufes in Abhängigkeit vom Alter der Tiere.

Zur Untersuchung der Verteilung und der Lokalisation in den Linsenfaserzellen wurden Kryoschnitte der Linsen von Neugeborenen und bis 6 Monate alten Tieren hergestellt und mit einem Antikörper gegen Vimentin gefärbt (Abb. 4-7).

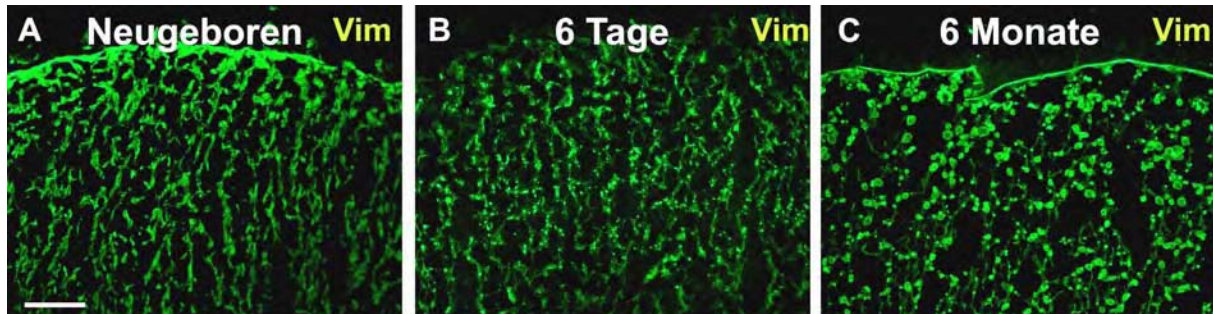


Abb. 4-7 Mutiertes Vimentin bildet zeitabhängig Aggregate in der Linse transgener Mäuse

Kryoschnitte der Linse von $Vim\Delta C2B$ Mäusen unterschiedlichen Alters wurden mit einem Antikörper gegen Gesamt-Vimentin (grün) gefärbt. A, zeigt die Linse eines $Vim\Delta C2B$ Neugeborenen mit normalen Vimentin-Zytoskelett und Proteinverteilung in den Faserzellen. In B ist die beginnende Aggregation des Vimentin in der Linse einer 6 Tage alten $Vim\Delta C2B$ Maus durch die punktuelle Färbung neben der Zytoskelettfärbung deutlich zu erkennen. C, zeigt großen Vimentin Aggregate in sekundären Faserzellen der Linse einer 6 Monate alten $Vim\Delta C2B$ Maus und den daraus resultierenden Zusammenbruch des Vimentin Zytoskeletts. Balken, 50 μ m.

Dabei zeigte sich, dass die Expression transgener $VimR_{113}C$ und $Vim\Delta C2B$ Proteine zu kugelförmigen Aggregaten in den Linsenfaserzellen führt. Die Vimentin Aggregate wurden kurz nach der Geburt sichtbar und mit dem Alter der Tiere fortschreitend größer. Dabei konnten sie teilweise das gesamte Querschnittsvolumen einer Faserzelle einnehmen. Außerdem waren mehrere Aggregate verschiedener Größe in einer einzelnen Faserzelle lokalisiert. Die Bildung und das „Assembly“ von dynamischen IF-Zytoskeletten in der Zelle ist noch nicht vollständig verstanden, aber nach heutigem Wissensstand nicht lokal an den Synthesort des Proteins gebunden, sondern findet sehr wahrscheinlich durch Assimilation von löslichen IF-Komponenten in das bestehende Zytoskelett an der Zellperipherie statt. Dementsprechend konnte auch keine feste Lokalisation der Vimentin Aggregate in den Faserzellen determiniert werden.

Durch Western-Blot Analyse konnte in Neugeborenen die gleichen Verhältnisse und Mengen des transgenen zu endogenem Protein wie in adulten Tieren festgestellt werden. Trotzdem waren in gefärbten Schnitten der Linse Neugeborener noch keine Aggregate zu erkennen. Somit wurden Doppelfluoreszenzen an Kryoschnitten von Linsen fortschreitender Alterstufen durchgeführt, um die Verteilung und Lokalisation des transgenen Proteins genauer zu bestimmen.

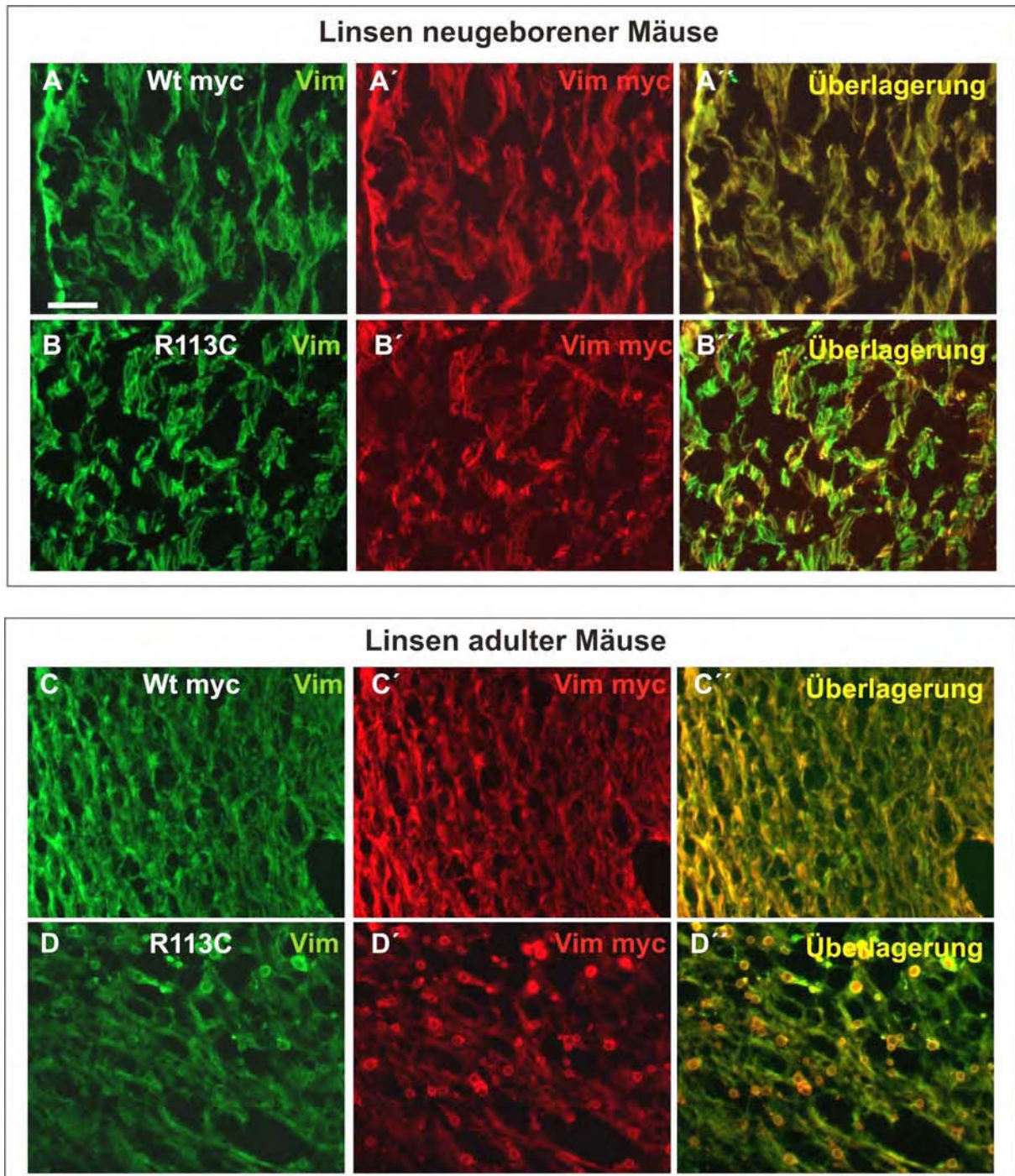


Abb. 4-8 Expression von transgenem und endogenem Vimentin in der Linse neugeborener und adulter Mäuse

A bis D, Doppel-Immunofluoreszenz Analyse von Linsen neugeborener und adulter transgener Mäuse. Kryoschnitte von Neugeborenen und 4,5 Monate alter VimWt und VimR₁₁₃C-Linsen wurden mit Antikörpern gegen das gesamte Vimentin (grün) und c-myc-Epitop (rot) gefärbt. A und C, zeigen die normale Lokalisation und Expression von endogenem und transgenem Vimentin Protein in den Linsenfasern von Wildtyp Mäusen. B und D, zeigen die endogene und transgene Vimentin Expression in VimR₁₁₃C Linsen. In Linsen Neugeborener ist die Verteilung des mutierten VimR₁₁₃C Proteins noch gleich der des endogenen Vimentins, aber weniger homogen als im VimWt. Keine Veränderungen hinsichtlich des Verhältnisses von endogenem zu transgenem Protein über die Zeit waren feststellbar. D, in adulten Linsen zeigen sich deutliche Aggregate in den Linsenfasern der 4,5 Monate alten VimR₁₁₃C Tiere, während in C, VimWt Vimentin ein perfektes submembranständiges Zytoskelett bildet. Balken, 20µm.

In Neugeborenen konnte zuerst gezeigt werden, dass transgenes Protein in den Zellen vorhanden ist und ein Anteil des mutierten Proteins fähig war, in das bestehende Zytoskelett eingebaut zu werden (Abb 4-8, B). Dies war für die VimR₁₁₃C Mutante in größerem Maße möglich als für die VimΔC2B Mutante, was sich an der späteren Entwicklung von Aggregaten in diesen Linsenfasern zeigte. In VimWt Neugeborenen bildet transgenes und endogenes Protein ein völlig einheitliches, membranständiges Zytoskelett, wie die Überlagerung der spezifischen Immunfärbungen in Abb. 4-8 A'' zeigt.

In neugeborenen transgenen VimR₁₁₃C Mäusen hat die Bildung von Aggregaten noch nicht begonnen. Das Vimentin Zytoskelett aus transgenem und endogenem Vimentin erscheint aber inhomogen und nicht zu gleichen Anteilen aufgebaut. Transgenes mutiertes Vimentin ist entweder nicht in gleichem Maße fähig in das Filament-„Assembly“ eingebunden zu werden, oder es wird in einzelnen Faserzellen unabhängig stark exprimiert.

In adulten transgenen VimR₁₁₃C und VimΔC2B Linsen sind große Vimentin Aggregationen zu erkennen. In der Überlagerung wird ersichtlich, dass die Aggregate sowohl aus transgenem als auch endogenem Protein bestehen. Transgenes mutiertes Protein ist also in der Lage, endogenes Protein am „Assembly“ zu hindern und sondert dieses zusammen in den Aggregaten ab. Gleichzeitig ist, bei noch intaktem Zytoskelett, anteilig Kolokalisation von mutiertem Protein in den Filamenten zu erkennen (Abb. 4-8 D). Somit ist der Prozess der Aggregation und Filamentbildung von endogenem und mutiertem Vimentin Protein untereinander *in vivo* möglich. Mutiertes Vimentin Protein aggregiert somit nicht ausschließlich, sondern wird *in vivo*, möglicherweise in Abhängigkeit vom Mengenverhältnis zu Wildtyp Vimentin, in Filamente eingebaut.

4.1.5 Morphologie der Linse transgener VimR₁₁₃C und VimΔC2B Mäuse

Um die Basis der Kataraktentwicklung zu verstehen und die Auswirkungen der Aggregation des Vimentin Proteins in Linsenfasern zu analysieren, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen der Linsen durchgeführt. Dafür wurden 5 Monate alte Tiere durch Ganzkörperperfusion fixiert und anschließend Semi- und Ultradünnschnitte der zu untersuchenden Organe hergestellt (Abb 4-9).

Die sorgfältige Analyse von Semidünnschnitten bestätigte die Ergebnisse der Immunfluoreszenzen. Durch die Fixierung des gesamten Präparats vor dem Schneiden sind wesentlich bessere histologische Merkmale in den Schnitten zu erkennen, da die Morphologie größtenteils erhalten blieb. Auch in den Semidünnschnitten waren in Linsenfasern die

Vimentin Aggregationen deutlich als runde, dichte Einschlüsse zu erkennen. Obwohl Vimentin auch in der Epithelschicht der Linse exprimiert wird, tauchen die ersten Aggregate überraschenderweise erst in den differenzierenden Linsenfäsern auf. In den Vimentin exprimierenden, proliferierenden Zellen der Linsenepithelschicht konnten keine Aggregate festgestellt werden.

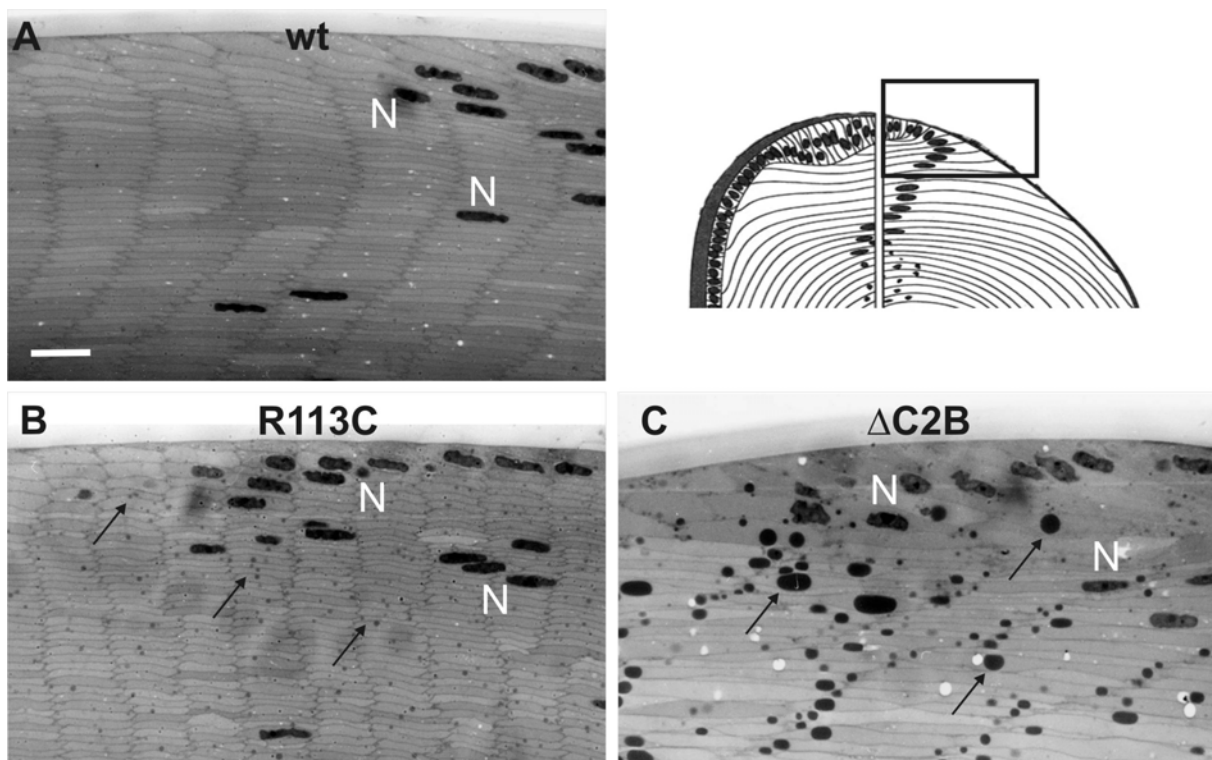


Abb. 4-9 Semidünnschnitte der Linsen von VimWt, VimR₁₁₃C und VimΔC2B transgenen Mäusen

Das Rechteck in der Schemazeichnung oben rechts verdeutlicht die Region der Schnitte. Semidünnschnitte der Augen aus Linsen 5 Monate alter Tiere. A, zeigt die dichtgepackte, hochorganisierte Anordnung der Linsenzellen mit Zellkernen (N). B, und C, zeigt Aggregate (Pfeile) in Faserzellen transgener Mäuse und die früher beginnende Degradation der Zellkerne. Bar, 10µm.

Die Abbildungen zeigen, dass die VimΔC2B Mutante nach 6 Monaten im Vergleich mit der VimR₁₁₃C ein wesentlich ausgeprägtere Aggregation des mutierten Proteins aufwies. Dadurch waren die Pathologie und die Kataraktentwicklung erheblich weiter fortgeschritten. Die VimΔC2B Mutante entwickelt die Pathologie im Vergleich zur milderen VimR₁₁₃C Mutation gewissermaßen im Zeitraffer.

In den histologischen Untersuchungen wurde schnell deutlich, dass die Trübung der Linsen und die Ausprägung eines Kataraktes nicht nur auf Aggregateinschlüsse des mutierten Proteins im Zytoplasma der Zellen zurückzuführen war, sondern, auch dramatische Umorganisation der Linsenfasermorphologie und Zellgestalt eintrat. In VimWt Linsen sind

die Faserzellen nach ihrer Elongation und Differenzierung in dichtgepackter, hochorganisierter polygonaler Struktur angeordnet (Abb 4-10 A).

Als Folge der Vimentin Aggregationen und des kollabierten Zytoskeletts zeigten die Faserzellen in den $\text{VimR}_{113}\text{C}$ und $\text{Vim}\Delta\text{C2B}$ Tieren eine amorphe Struktur und den Verlust des geordneten organisierten Aufbaus. Der Prozess der Elongation der Linsenfaser, der essentiell für die Struktur der gesamten Linse ist, war deutlich gestört. Die Linsenfaserzellen der $\text{VimR}_{113}\text{C}$ und $\text{Vim}\Delta\text{C2B}$ Tiere wiesen eine Verdopplung der Zellgröße auf, was an der Messung ihrer Höhe in Abb. 4-10 deutlich wird. Dieses erhöhte Zellvolumen trägt ebenfalls zur Reorganisation der Linsenfaser in der gesamten Linse bei.

Ein besonderes Merkmal der Linse ist der Verlust der Zellkerne und Organellen im Laufe der Differenzierung der Faserzellen. Sorgfältige Analyse von Serienschritten durch die Linse von $\text{VimR}_{113}\text{C}$ und $\text{Vim}\Delta\text{C2B}$ ergaben Anzeichen einer vorzeitigen Eukleation und somit einen Hinweis auf die Beteiligung von Vimentin in diesem Prozess, analog der vorgeschlagenen Rolle bei der Blutzellendifferenzierung.

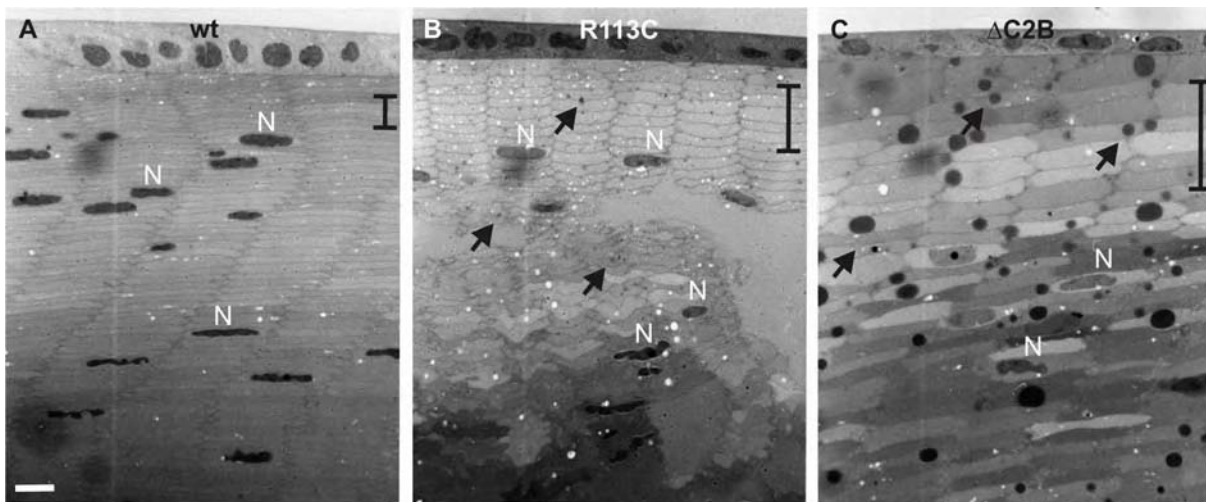


Abb. 4-10 Veränderte Faserzellmorphologie und vorzeitige Eukleation in Vimentin transgenen Mäusen

Semidünnschnitte der Äquatorregion von VimWt , $\text{VimR}_{113}\text{C}$ und $\text{Vim}\Delta\text{C2B}$ Linsen. Die Pfeile markieren Vimentin Aggregate. Kerne sind mit (N) gekennzeichnet. Der vertikale Balken umspannt jeweils 5 Faserzellen. A, VimWt Kontrolle. B und C, deutlich sind die Vimentin Akkumulationen als dunkle runde Einschlüsse in den Faserzellen zu erkennen. Dies führt zu einer veränderten Morphologie der Zellmembranen und der Zellgröße, wie an der Messung der Zellhöhen deutlich wird. Vertikaler Balken in A, 7 μm ; in B, 14 μm und in C, 20 μm . Die transgenen Linsen zeigen den Verlust der geordneten, polygonalen Faserzellstruktur und verfrühte Eukleation. Bar, 10 μm .

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Linsenfaserzellen brachten Aufschluss über die Beschaffenheit der Aggregate im Kontext des Differenzierungsgrades und somit auch des Alters der Linsenfaser. Auffällig war ihre unterschiedliche Größe in Faserzellen gleicher Lage und damit gleichen Alters (Abb 4-10 C und Abb 4-11 A). Der fortschreitende, altersabhängige Prozess der Aggregation ist demnach nicht zwingend durch Akkumulation von mutiertem Protein in allen Faserzellen gleich intensiv. Ebenso konnten eindeutig mehrere Aggregate in einer Zelle bestätigt werden, wie sie schon in der Immunfluoreszenz beobachtet wurden.

Zudem waren die Aggregate eindeutig nicht von Membranen umschlossen. Damit konnte ein Einschluss in Vesikel lysosomaler oder exozytotischer Art ausgeschlossen werden. Zugleich konnte keine Assoziation mit Plasmamembranen oder deren Komponenten festgestellt werden. Die Aggregate werden also nicht dem lysosomalen Abbau zugeführt.

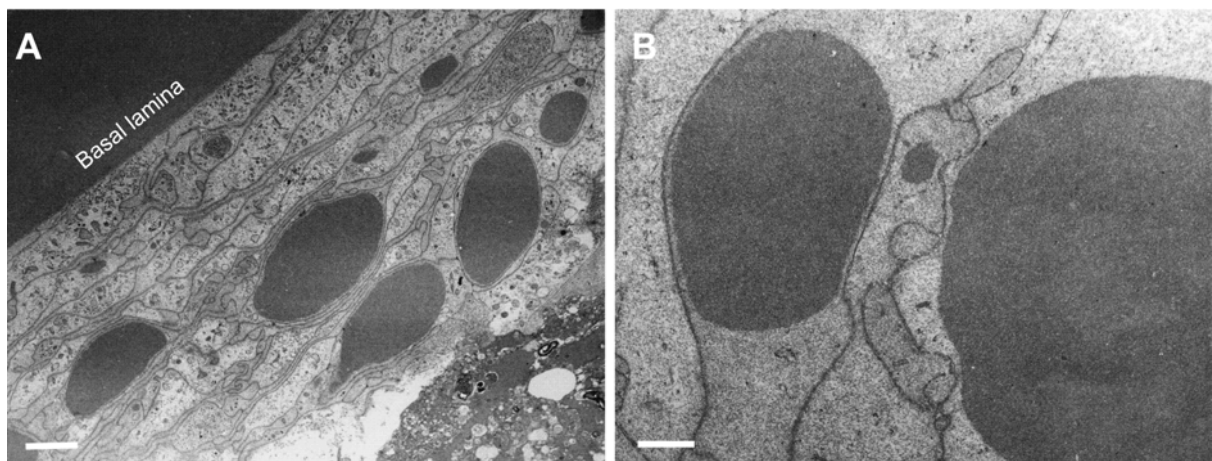


Abb. 4-11 Ultrastrukturanalyse von Vimentin Aggregaten in Linsenfaser der VimR₁₁₃C Mäuse

Ultradünnschnitte der Linsen transgener Mäuse wurden elektronenmikroskopisch untersucht.

A, Vimentin Aggregate wurden durch Elektronenmikroskopie bestätigt. Die Aggregate sind kugelförmig und führen zu der Umstrukturierung und Faltung der Plasmamembran. Balken, 3µm. B, zeigt die Vimentin Aggregate und die mehrfach gefaltete Plasmamembran in starker Vergrößerung. Die Aggregate sind rund, dicht und nicht von Membranen umgeben. Ebenso sind die Aggregate nicht an der Plasmamembran assoziiert. Balken, 1µm.

Histologisch konnte schon in Semidünnschnitten die veränderte Linsenfasermorphologie beobachtet werden. In der Elektronenmikroskopie zeigte sich als Ursache eine starke Unordnung der Plasmamembran mit zahlreichen Einstülpungen und Verformungen (Abb 4-11). Dies war jedoch kein Resultat der direkten Interaktion von mutiertem Vimentin mit linsenspezifischen Zell-Junctions (Straub et al., 2003) und wurde auch nicht durch Zerstörung des membranassoziierten Aktin-Filamentsystems oder des Beaded-Filament-Zytoskeletts hervorgerufen (siehe folgende Resultate).

Als finale Pathologie führten die Vimentin Aggregate in der Linse zum Reißen der Linsenkapsel im posterioren Bereich (Abb. 4-12). Ein Semidünnschnitt einer 6 Monate alten *Vim Δ C2B* Linse ist in Abb 4-12 gezeigt. Dabei durchbrechen die Linsenfaserzellen die Basalmembran und füllen den Glaskörper des Auges aus. Dort erscheinen sie makroskopisch wie eine zweite Linse oder ein weißer Schneeball. Dieser Phänotyp wird in humanen Katarakten entsprechend als Schneeballkatarakt beschrieben (Eshagian et al., 1981).

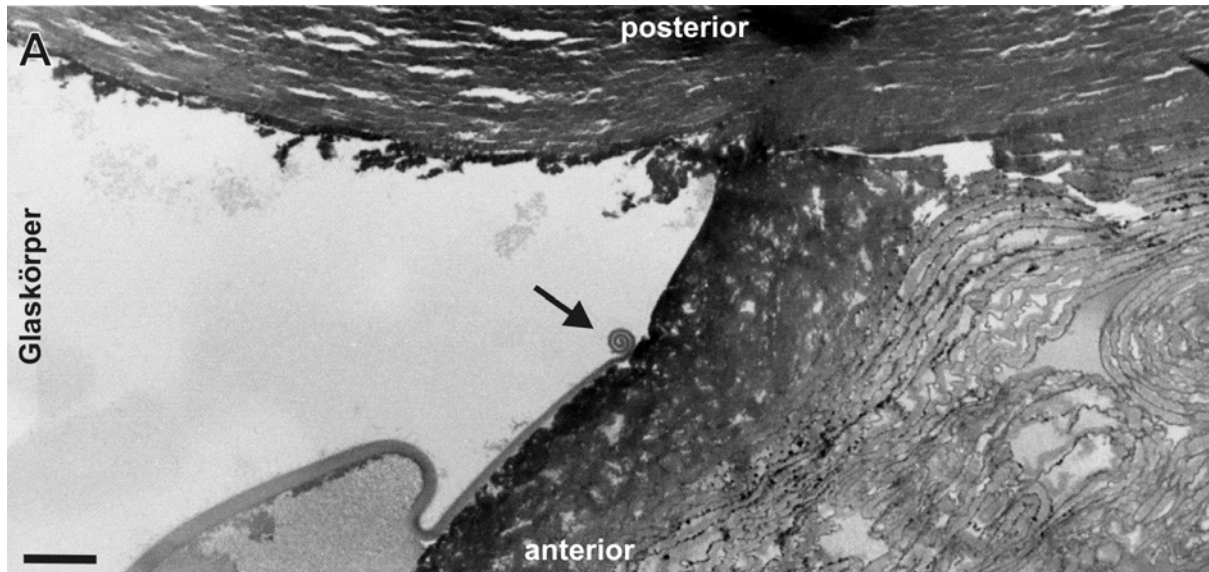


Abb. 4-12 Dorsale Kapselruptur in Linsen von *Vim Δ C2B* Mäusen

Semidünnschnitt der Linse einer 6 Monate alten *Vim Δ C2B* Maus. Der Pfeil markiert die zurückgerollte Linsenkapsel nach der Ruptur. Als Folge durchbrechen die Linsenfaser die Basallamina und gelangen posterior in den Glaskörper des Auges. Balken, 10 μ m.

4.1.5.1 Vimentin und Membran assoziierte Proteine in der Linse transgener Mäuse

Die Integrität und Stabilität von Geweben wird durch verschiedenste extrazelluläre Zell-Zellkontakte vermittelt. Diese Kontaktpunkte der Zellen sind wiederum im Zytoplasma mit dem internen Filamentsystemen der Zellen verknüpft und sorgen somit für den Zusammenhalt im gesamten Zellverbund. Für Vimentin sind verschiedene mögliche Assoziationen und Verknüpfungen über Linkerproteine und assoziierte Proteine beschrieben. Im folgenden wurden deshalb die für die Integrität verantwortlichen Proteine in der Immunfluoreszenz auf ihre Struktur hin überprüft.

Aufgrund der postulierten Schlüsselrolle von Synemin in der Vernetzung von IF untereinander und mit anderen Proteinen (Tawk et al., 2003) wurden von Kryoschnitten 5 Monate alter transgener Mäuse Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen Synemin und das c-myc-Epitop durchgeführt (Abb. 4-13).

In den VimWt Mäusen zeigte Synemin eine gleiche Verteilung wie endogenes Vimentin und konnte in der Überlagerung mit transgenem VimWt als kolokalisiertes Protein nachgewiesen werden. In VimR₁₁₃C und VimΔC2B Linsen zeigte sich zusätzlich partielle Kolokalisation in den Aggregaten des mutierten Vimentins. Somit wird Synemin teilweise aus seiner postulierten Lokalisation an der Membran verdrängt. Die Interaktion von Synemin mit Vimentin ist demnach stärker als die Interaktion die es im kortikalen, membranständigen Zytoskelett in VimWt Linsenfasern halten.

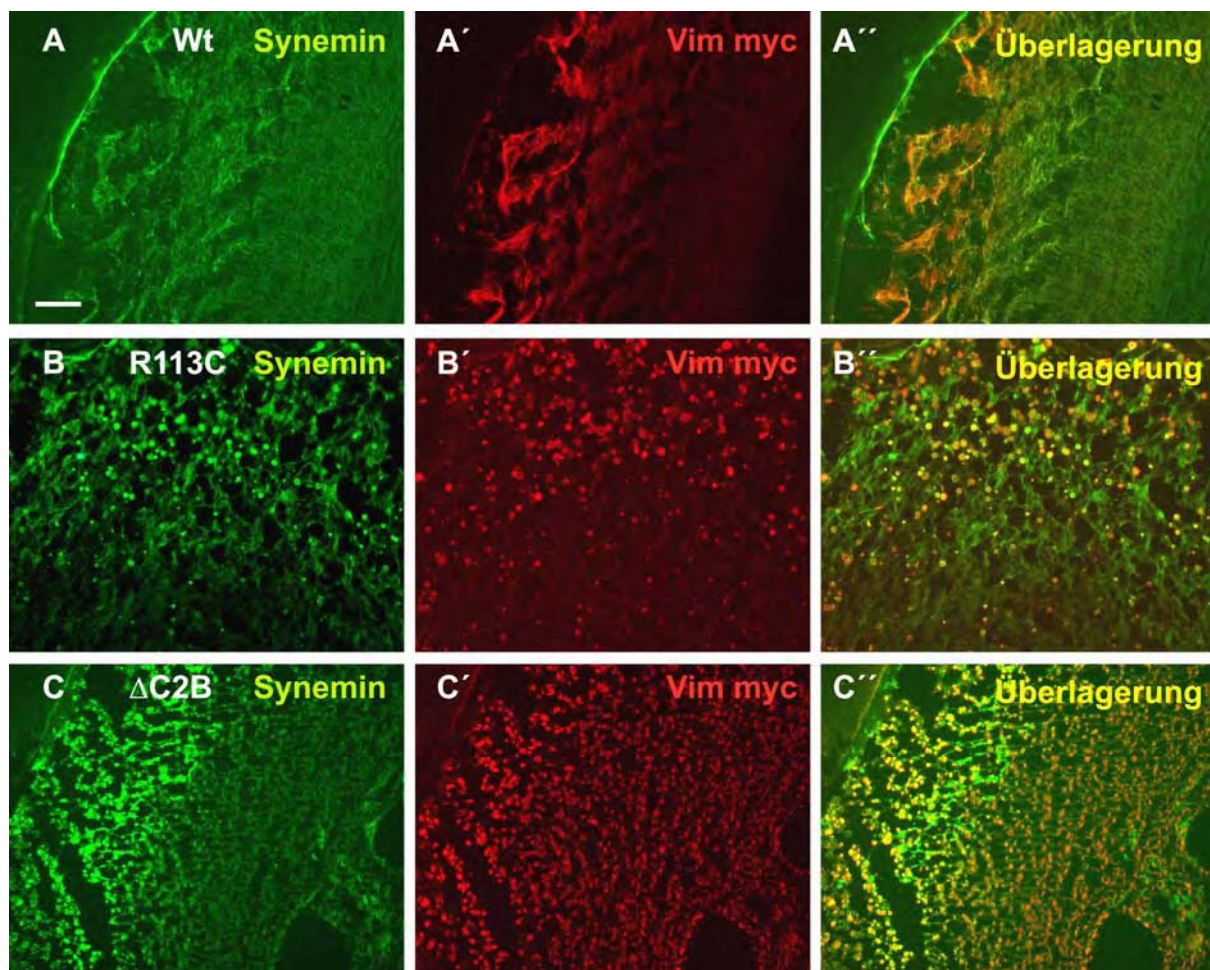


Abb. 4-13 Kolokalisation von Synemin mit VimR₁₁₃C und VimΔC2B Aggregaten

Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen von Linsen 5 Monate alter transgener Mäuse mit Antikörpern gegen Synemin (grün) und das c-myc-Epitop (rot). A, zeigt die normale Verteilung und Kolokalisation von Synemin und VimWt Vimentin. B, und C, partielle Kolokalisation von Synemin mit VimR₁₁₃C und VimΔC2B in Aggregaten. Balken, 50µm.

Das Linkerprotein Plektin ist in der Lage mit allen drei Zytoskelettsystemen der Zelle zu interagieren und verbindet diese mit in der Plasma-Membran liegenden Membranadhäsionskomplexen. Plektin vermittelt somit die Interaktion von Vimentin und dem Aktinzytoskelett, Mikrotubuli und der Plasmamembran (Foisner et al., 1995; Svitkina et

al., 1996; Wiche, 1998). Eine weitere indirekte Verbindung von Vimentin mit dem Aktinzytoskelett wird über das Aktin-Bindeprotein Filamin hergestellt (Brown and Binder, 1992). Um mögliche Auswirkungen von VimR₁₁₃C und Vim Δ C2B auf die direkten oder indirekten Interaktionspartner zu gewinnen wurden Immunfluoreszenzfärbungen von Plektin, β -Aktin und γ -Aktin in der Linse durchgeführt.

Dabei zeigte sich eine normale, in der Linse typische membranständige Verteilung von Aktin (Abb 4-14). In Doppelfluoreszenzen mit einem Antikörper gegen Vimentin und Aktin konnte keine Kolokalisation mit Vimentin Aggregaten gefunden werden. In Western Blot-Studien konnte ebenso keine Veränderung der Aktin Mengen in den Linsen von Vim Δ C2B oder VimR₁₁₃C detektiert werden. Die morphologische Veränderung und die Pathologie der Linse beruht demnach nicht auf Veränderungen des Aktin Zytoskeletts.

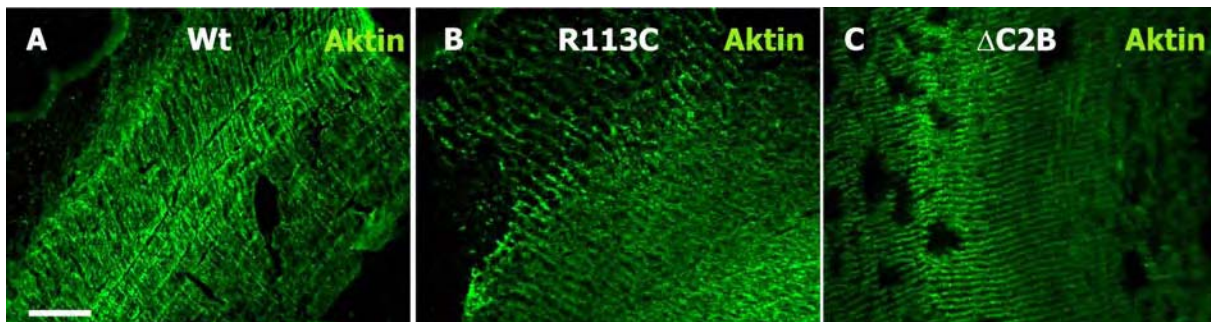


Abb. 4-14 Aktin ist unverändert in der Linse exprimiert und lokalisiert

Kryoschnitte der Linse von VimWt, VimR₁₁₃C und Vim Δ C2B Mäusen im Alter von 3,5 Monaten wurden mit einem Antikörper gegen Aktin (grün) gefärbt. A bis C, zeigt die gleichbleibende Verteilung von Aktin in der Linse der transgenen Tiere. Balken, 20 μ m

Mechanische Stabilität von Geweben wird entscheidend durch Zell-Zellkontakte mit Adhäsionskomplexen vermittelt, die wiederum mit intrazellulären Zytoskeletten verbunden sind. Über die Vernetzung von Vimentin an Adhäsionskomplexen in der Linse ist allerdings noch wenig bekannt. Das entscheidende Linkerprotein, welches Vimentin mit anderen Zellkomponenten wie Aktin, Mikrotubuli und Membranadhäsionskomplexen direkt mechanisch verbindet, ist Plektin. Eine Vernetzung von Vimentin über Plektin mit dem kortikalen Adhäsionskomplexen, dem Ezrin-Periplakin-Periaxin-Desmoyokin-Komplex (EPPD), ist wahrscheinlich (Straub et al., 2003). Der EPPD-Komplex ist einer von zwei Haupt-Adhäsionskomplexen, der vorwiegend in den Längsseiten der Linsenfaserzellen lokalisiert ist.

In Doppel-Immunfluoreszenzen der Linsenfaserzellen in VimR₁₁₃C und Vim Δ C2B zeigte Plektin eine normale membranständige Verteilung. Es konnte keine Veränderungen der

Anordnung von Plektin an den EPPD-Komplexen festgestellt werden. (Abb. 4-15). Auch in Anwesenheit großer Mengen akkumulierten Proteins in den Faserzellen der Vim Δ C2B Linsen blieb die membranständige Lokalisation erhalten. Zudem konnte keine Überlagerung von Plektin mit den Aggregaten gezeigt werden (Abb 4-15 B). Plektin wird demnach nicht von mutiertem Vimentin in irgendeiner Weise über seine Proteinbindung in den Aggregaten abgefangen. Durch die normale unveränderte, kortikale Lokalisation von Plektin kann indirekt durch seine postulierte Interaktion mit Adhäsionskomplexen auch von intakter Lokalisation der Adhäsionskomplexe der Linse ausgegangen werden (Fuchs and Karakesisoglou, 2001). Es konnte somit kein Hinweis für die veränderte Morphologie der Linsenfasern durch eine Relokalisation oder Zerstörung der Komplexe und als Folge ihrer Zell-Zell Kontaktpunkte gefunden werden.

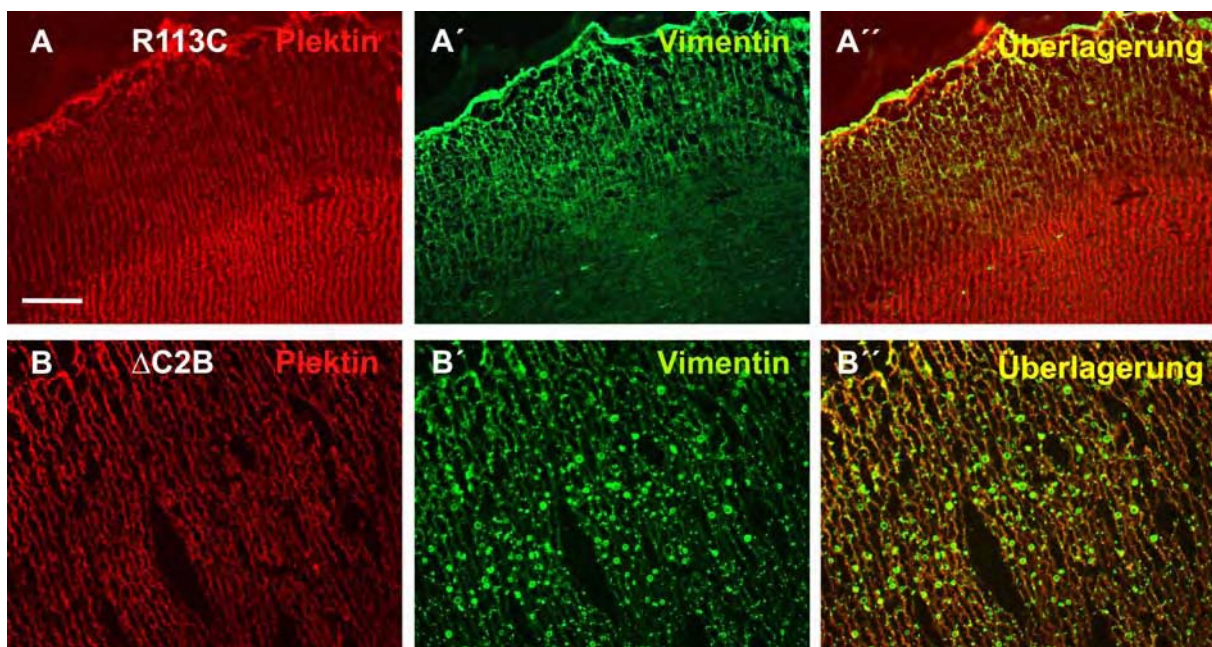


Abb. 4-15 Plektin ist unverändert an Plasmamembran-Komplexen der Linse lokalisiert

Kryoschnitte der Linse von Vim R_{113C} und Vim Δ C2B Mäusen wurden mit Antikörpern gegen Plektin (rot) und Vimentin (grün) gefärbt. A, zeigt die gleichbleibende Verteilung von Plektin an den Längsseiten der Linsenfasern der Vim R_{113C} Tiere bei beginnender Aggregation. B, zeigt die normale Lokalisation von Plektin bei fortgeschrittener Vimentin Aggregation in Vim Δ C2B Tieren. Balken, 20 μ m

4.1.5.2 Normale Beaded-Filament Struktur in Faserzellen transgener Linsen

Neben Vimentin werden in der Linse weitere IF-Filamente exprimiert. Die linsenspezifischen Proteine Filensin und CP49 bilden durch Heteropolymere ein Filamentsystem neben dem Vimentin Zytoskelett in Linsenfasern aus. Dabei bilden CP49 und Filensin zusammen mit dem

„small Heatshock“ Protein α B-Kristallin, die sogenannten „Beaded-Filaments“. Aufgrund von „knockout“-Studien wird ihnen eine Schlüsselrolle für die strukturelle Integrität und die optischen Eigenschaften der Linse zugeschrieben (Perng and Quinlan, 2005). Sie sind, im Gegensatz zu Vimentin, durchgängig während der Linsenfaserzell-Differenzierung exprimiert und werden proteolytisch prozessiert und intrazellulär relokalisiert. Aufgrund der Pathologie in $Vim\Delta C2B$ und $VimR_{113C}$ Mäusen wurden deshalb Veränderungen des „Beaded Filament“-Zytoskeletts vermutet.

CP49 und Filensin

Zunächst wurden CP49 und Filensin einer biochemische Analyse unterzogen um Aufschluss über die Proteinmengen und die charakteristischen proteolytischen Spaltprodukte zu bekommen. Dafür wurden Zytoskelettpräparationen von $VimWt$, $VimR_{113C}$ und $Vim\Delta C2B$ Linsen nach dem Western Blot mit einem Antikörper gegen Filensin und CP49 immundetektiert (Abb 4-16).

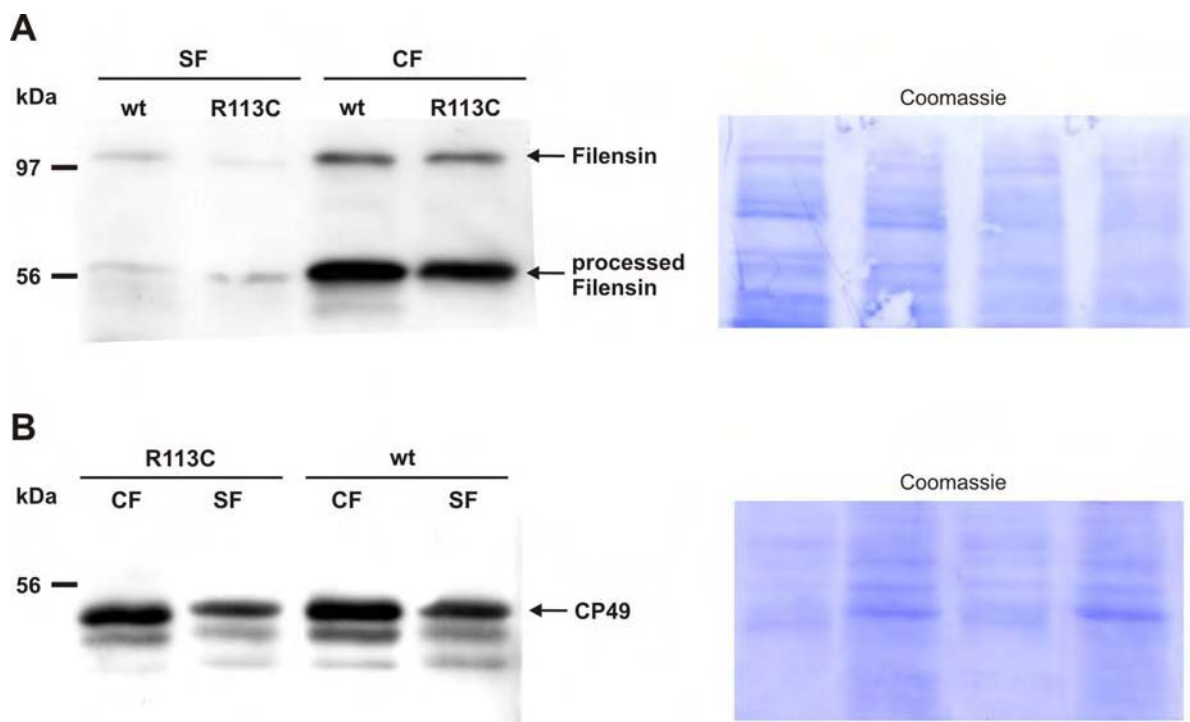


Abb. 4-16 Western Blot Detektion von Filensin und CP49 von $VimWt$ und $VimR_{113C}$ Linsenextrakten

Zytoskelettfraktionen (CF) und lösliche Fraktionen (SF) von $VimWt$ und $VimR_{113C}$ wurden in gleichen Proteinmengen geladen. Die Immundetektion wurde mit einem Antikörper gegen Filensin (A) und CP49 (B) durchgeführt. A, zeigt die unveränderten Filensin Proteinmengen in löslicher und unlöslicher Fraktion, sowie die gleichbleibende proteolytische Prozessierung. B, zeigt die ebenfalls unveränderten CP49 Proteinmengen, sowie seine unveränderte Prozessierung. Als Ladekontrolle ist die Coomassie-Färbung der Membran nach dem Western-Blot gezeigt.

Die biochemische Analyse zeigt für Filensin gleich exprimierte Mengen in VimWt und VimR₁₁₃C Linsen. Dies bezieht sich sowohl auf die lösliche, wie auch unlösliche Fraktion. Ebenso ist keine Tendenz zu einer Verlagerung von löslicher zu unlöslicher Fraktion von Filensin in den VimR₁₁₃C Linsen zu erkennen, was nach Aggregation des Proteins der Fall wäre. Deutlich wird auch, dass die Prozessierung des Proteins zu niedermolekularen Formen in VimR₁₁₃C Linsen gleichermaßen gewährleistet ist (Abb. 4-16 A). Ein ähnliches Bild ergab sich für das Filensin Partnerprotein CP49. Auch hier konnten keine signifikanten Veränderungen der Proteinmengen oder der CP49 Prozessierung in löslicher und unlöslicher Fraktion beobachtet werden (Abb. 4-16 B).

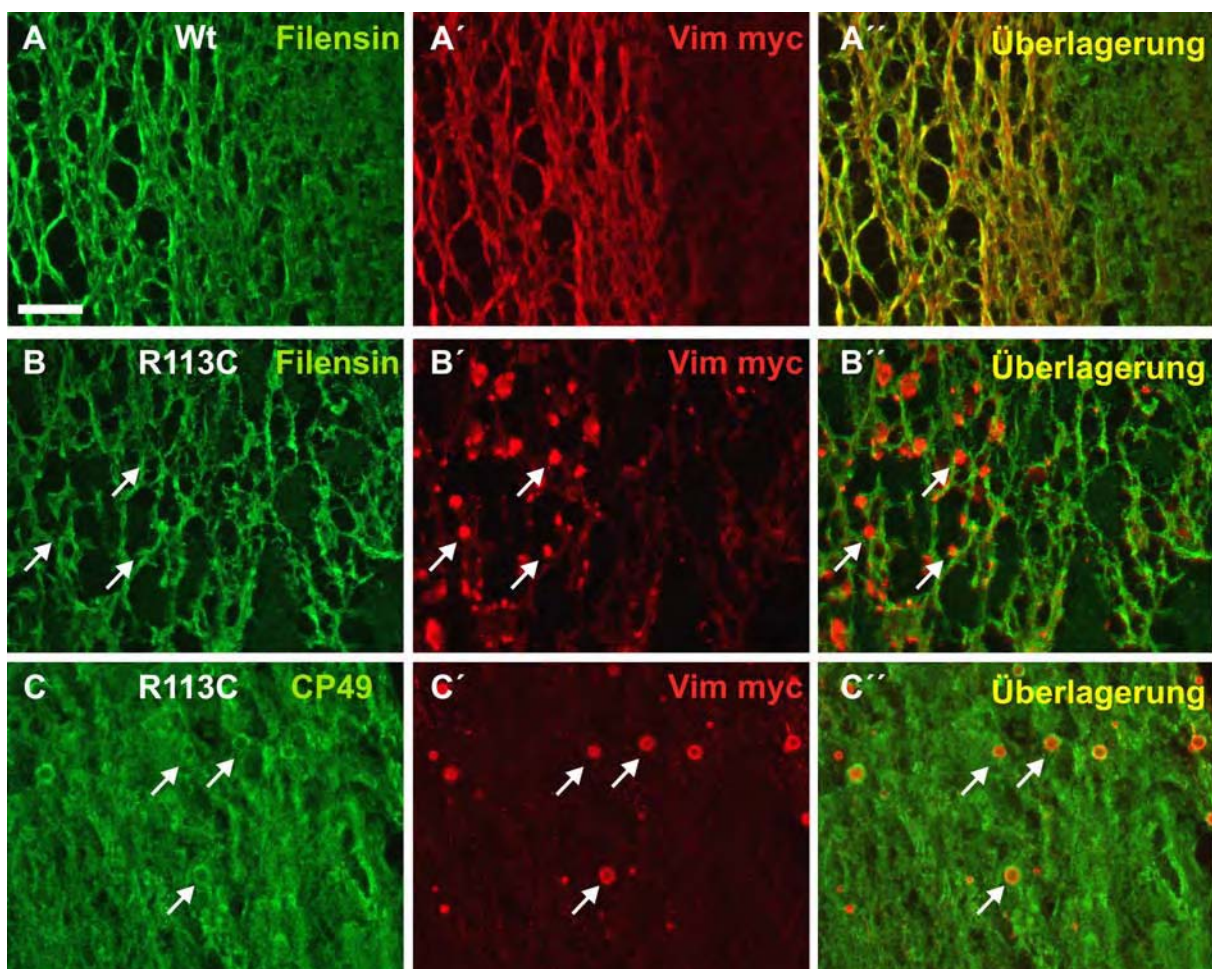


Abb. 4-17 Unveränderte Beaded-Filament Strukturen in Linsen transgener Mäuse

Kryoschnitte der Linse von 5 Monate alten VimWt und Vim R₁₁₃C Mäusen wurden mit Antikörpern gegen Filensin und CP49 (grün) und das c-myc Epitop (rot) gefärbt. A, zeigt die Verteilung und Struktur von Filensin als Komponente der Beaded-Filaments in den VimWt Kontrolltieren. A' und A'', VimWt Vimentin formt ein unverändertes und unabhängiges membranständiges Zytoskelett. B und C, zeigen die unveränderte Struktur und Lokalisation von Filensin und CP49 auch in der Anwesenheit großer Vimentin Aggregationen. Pfeile markieren von Beaded-Filaments käfigartig umschlossene Aggregate, aber keine Kolokalisation in der Überlagerung. Balken, 20µm.

Zur Untersuchung der Auswirkung der transgenen Proteinexpression auf die „Beaded-Filament“-Struktur und seine intrazelluläre Lokalisation wurden zudem Kryoschnitte der Linsen mit einem Antikörper gegen das c-myc Epitop und Filensin oder alternativ CP49 gefärbt. Dabei zeigte sich in den VimWt-Linsen eine homogene membranständige Verteilung von Filensin und CP49 und die Bildung von normale Zytoskelettstrukturen. Transgenes VimWt Vimentin war ähnlich lokalisiert und bildete ein weiteres, unabhängiges Zytoskelett aus, ohne mit den „Beaded Filaments“ kolokalisiert zu sein (Abb. 4-17 A).

In transgenen Linsen mit mutiertem Vimentin zeigte sich überraschenderweise die gleiche Verteilung der „Beaded-Filament“ Strukturen. Auch in Anwesenheit von großen VimR_{113C} und Vim Δ C2B Aggregaten konnte keine Veränderung der Zytoskelettstrukturen, weder von Filensin noch von CP49 festgestellt werden. In Abb 4-17 ist dies exemplarisch für VimR_{113C} Linsen dargestellt. Durch konfokale Mikroskopie konnte zudem gezeigt werden, dass CP49 und Filensin nicht mit Vimentin kolokalisieren. Vielmehr umschließt das intakte „Beaded-Filament“-Netzwerk die Aggregate käfigartig in den Linsenfasern. Dies ist deutlich in Abb 4-17 B und C in der Doppelfluoreszenz von mutiertem Vimentin und Filensin oder alternativ CP49 zu beobachten. Gleiche Ergebnisse konnten in den Vim Δ C2B Mäusen bestätigt werden. Mutiertes Vimentin Protein scheint die Formation des „Beaded-Filament“-Systems nicht zu stören.

α B-Kristallin

α B-Kristallin ist ein kleines Hitzeshock Protein, welches neben einer großen Anzahl weiterer Kristalline (α -, β -, γ -Kristalline) für die Aufrechterhaltung der optischen Funktion in der Linse sorgt. Durch seine weitere Funktion als Chaperon ist es in der Lage, fehlgefaltetes Protein in seine richtige Konformation zurückzufalten. Damit erfüllt es eine wichtige Schutzfunktion vor fehlgefalteten Proteinen in den metabolisch kaum aktiven, differenzierten Linsenzellen. Ebenso ist α B-Kristallin ein weiterer Bestandteil der „Beaded-Filaments“ und möglicherweise in Reorganisationsprozessen von Intermediärfilamenten beteiligt (Perng et al., 1999). Aufgrund seiner Funktionen wurde eine mögliche Reaktion des Proteins als Stressantwort mit den Vimentin Aggregaten unabhängig von den Beaded-Filaments angenommen.

In Abb 4-18 sind Doppel-Färbungen an Kryoschnitten der VimWt und Vim Δ C2B Linsen gezeigt. Auch hier konnten keine Veränderungen der Expression oder der Lokalisation von α B-Kristallin in Vim Δ C2B Linsen beobachtet werden. α B-Kristallin ist homogen in

Zytoplasma und an der Membran lokalisiert und interagiert nicht mit Vim Δ C2B Aggregaten (Abb 4-18 B). Gleichzeitig konnten in Western Blot-Studien keine Veränderungen der Proteinmengen von α B-Kristallin in VimR₁₁₃C und Vim Δ C2B Linsen beobachtet werden.

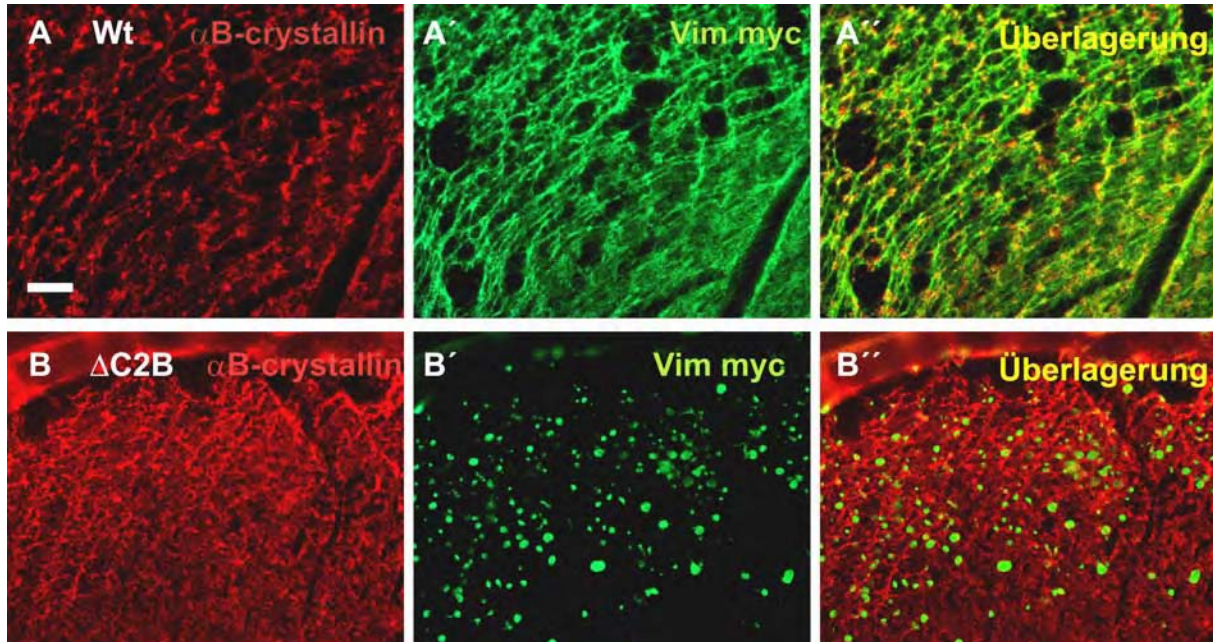


Abb. 4-18 Unveränderte α B-Kristallin Expression und Lokalisation in Linsen transgener Mäuse
Kryoschnitte der Linse von 5 Monate alten VimWt und VimR₁₁₃C Mäusen wurden mit Antikörpern gegen α B-Kristallin (rot) und das c-myc Epitop (grün) gefärbt. A, zeigt die Verteilung und Struktur von α B-Kristallin als Komponente der „Beaded-Filaments“ in den VimWt Kontrolltieren. B, zeigt die unveränderte Lokalisation von α B-Kristallin, auch in der Gegenwart großer Vimentin Akkumulationen. Balken, 20 μ m.

Zusammengefasst machen die erzielten Resultate deutlich, dass neben dem gestörten Vimentin Zytoskelett ein völlig intaktes, unabhängiges „Beaded-Filament“-Netzwerk in Linsenfaserzellen der VimR₁₁₃C und Vim Δ C2B Mäuse erhalten bleibt. Daraus resultiert, dass Filensin und CP49 die mechanische Integrität der Linse in Anwesenheit von mutiertem Vimentin nicht aufrecht erhalten und somit die Pathologie nicht verhindern können. Daraus ergibt sich wiederum eine entscheidende Funktion für Vimentin zur Erhaltung der Integrität und mechanischen Stabilität in der Linse und ordnet CP49 und Filensin eine untergeordnete Rolle in dieser Funktion zu.

4.1.6 *VimR113C* und *VimΔC2B* Aggregate sind reversible Strukturen

Bildung von Aggregaten in Folge von Mutationen in IF Genen sind eine des öfteren auftretende Ursache für pathologische Folgen in den betroffenen Geweben. So führen Mutationen im GFAP-Gen zu Aggregation, den sogenannten Rosenthal-Fasern, in den Gliazellen der weißen Substanz der cerebralen Hemisphäre und letztendlich zu Alexander'schen Krankheit (Messing et al., 2001). Ebenso sind fortschreitende Akkumulation von Neurofilamenten pathologische Kennzeichen einer Reihe von humanen neurologischen Erkrankungen wie Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) (Hirano, 1991; Julien, 1999, 2000), der Parkinson'schen Erkrankung (Goldman et al., 1983; Schmidt et al., 1991) und der Alzheimerschen Erkrankung (Lee et al., 1988; Pollanen et al.; 1994). Das Fortschreiten der Krankheit wird dabei von der Anhäufung der Proteinaggregate begleitet. Wie diese persistierenden Aggregationen zur Pathologie beitragen ist bis jetzt noch nicht geklärt.

Gleichzeitig konnte für Keratinaggregate ein sehr geringe Halbwertszeit von unter 15 min in Zellkultur nachgewiesen werden (Werner et al., 2004). Dies lässt auf eine transiente Struktur dieser Aggregate schließen und beweist ihre hoch dynamische Struktur.

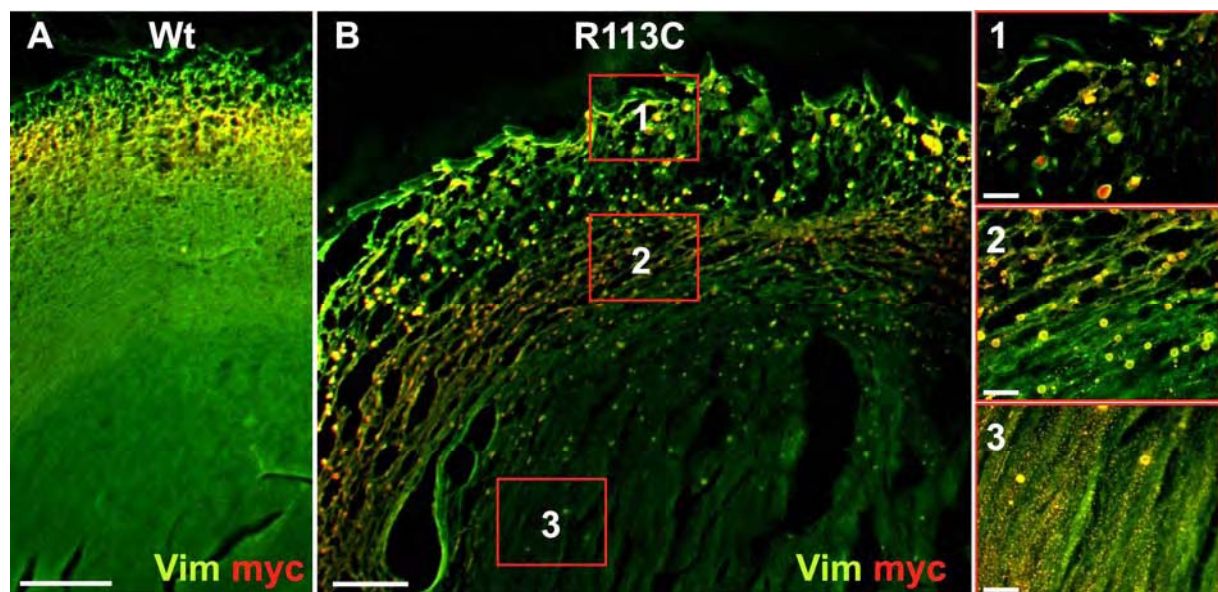


Abb. 4-19 Vimentin Aggregate sind keine statischen Strukturen

Kryoschnitte der Linse von 5 Monate alten *VimWt* und *VimR_{113C}* Mäusen wurden mit Antikörpern gegen das c-myc-Epitop (rot) und Vimentin (grün) gefärbt. A, zeigt die Verteilung von endogenem und transgenem Vimentin in der Überlagerung in *VimWt* Kontrolltieren. B, zeigt eine Übersichtsaufnahme der Linse und die Verteilung der Vimentin Aggregate in den verschiedenen Linsenfasern. Die Bilder 1 bis 3 zeigen Ausschnitte desselben Schnittes in starker Vergrößerung. Deutlich ist die Volumenabnahme der Aggregate zum Linseninneren, und damit zu den ältesten Zellen hin erkennbar. Balken, 20µm.

Diese Beobachtungen veranlassten eine genauere Betrachtung der VimR₁₁₃C und VimΔC2B Aggregate in Bezug auf ihre Größe und Verteilung, unter Berücksichtigung der gesamten Linse und der Differenzierungsstadien der Faserzellen. Dafür wurden zunächst Kryoschnitte von Linsen 4 Monate alter VimWt, VimR₁₁₃C und VimΔC2B Tiere mit Antikörpern gegen Vimentin und das c-myc-Epitop gefärbt.

Entgegen den Erwartungen, dass die Aggregate im Laufe der Zeit ihr Volumen vergrößern würden und in den ältesten Zellen im Zentrum der Linse ihre Maximalgröße erreichen, zeigte sich das Gegenteil. VimR₁₁₃C und VimΔC2B Aggregate nahmen zunächst äquivalent zur Vimentin Expression in differenzierenden Faserzellen in Menge und Größe zu, um dann wieder in älteren Faserzellen kleiner zu werden (Abb. 4-19 B 1-3). In den ältesten Zellen, den primären Faserzellen im Zentrum der Linse, waren nur vereinzelt kleinste Aggregate zu finden. In Abb. 4-19 B ist die Linse in der Übersicht gezeigt. Deutlich kann in hoher Vergrößerung die Abnahme der Aggregatvolumina mit dem Alter der Faserzellen beobachtet werden. Dieses Ergebnis konnte auch in jüngeren und älteren Tieren beobachtet werden. Die Degradation oder der Abbau der Aggregate ist also ein aktiver Prozess in Abhängigkeit vom Alter in einzelnen Faserzellen.

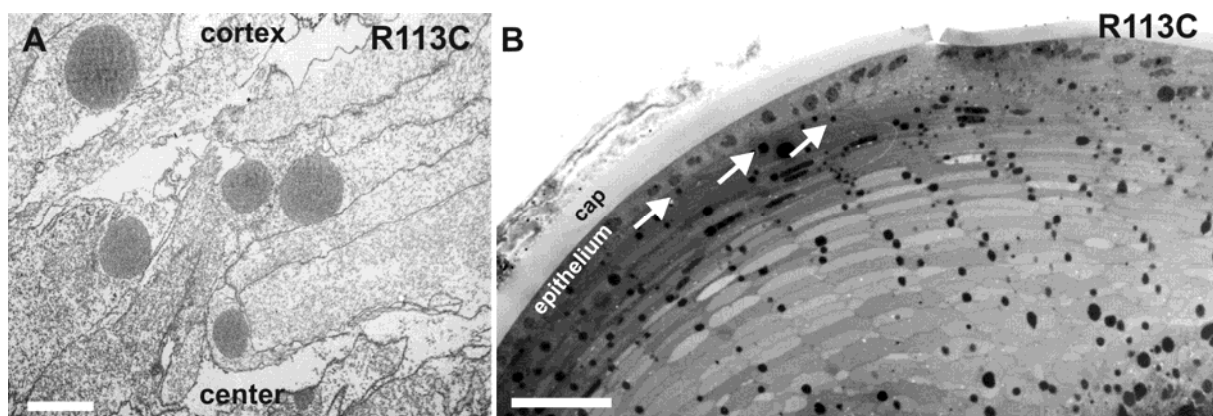


Abb. 4-20 Elektronenmikroskopische Analyse der Vimentin Aggregate in Linsenfasern transgener Mäuse

Elektronenmikroskopische Analyse der Linse einer adulten VimR₁₁₃C Maus. A, zeigt den Rückgang der Aggregatvolumina vom inneren Cortex zum Zentrum der Linse hin, wo sich die ältesten Linsenfasern befinden. Balken, 4µm

B, zeigt den Semidünnschnitt der gleichen Linse des VimR₁₁₃C Tieres. Deutlich werden die Aggregate erst in den ersten differenzierten Faserzellen visualisierbar (Pfeile), während die proliferierende Epithelschicht keine Aggregate aufweist. Balken, 40µm.

Die in der Immunfluoreszenz gewonnenen Erkenntnisse konnten durch elektronenmikroskopische Analysen bestätigt werden. Linsen 5 Monate alter VimWt, VimR₁₁₃C und VimΔC2B wurden durch Ganzkörperperfusion fixiert, in Epon eingebettet und Serien-

Dünnschnitte hergestellt. In Abb. 4-20 A sind die einzelnen Aggregate deutlich als schwarze Einschlüsse in den Faserzellen der VimR₁₁₃C Linse zu erkennen. Ihre Größe nimmt zum Zentrum der Linse hin ab und zeigt die größten Aggregate in den Bereichen des Linsen-Cortex. Gleiche Ergebnisse wurden in Serienschnitten der VimΔC2B Mutante gefunden. In Semidünnschnitten der VimR₁₁₃C Linsen konnte der Beginn der Aggregation nur in den differenzierenden Linsenfaserzellen beobachtet werden. Im einschichtigen Linsenepithel, in dem ebenfalls Vimentin exprimiert wird, wurden keine Aggregate gefunden. Auf diesen Punkt wird später in dieser Arbeit genauer eingegangen.

4.1.7 Zelluläre Kontrollsysteme und die Stressantwort in Linsen transgener VimR₁₁₃C und VimΔC2B Mäuse

Die Daten der Immunfluoreszenz und Elektronenmikroskopie ergaben erste Hinweise, dass Vimentin Aggregate keinen irreversiblen Strukturen sind und im Laufe der Zeit durch die Linsenfaserzellen aktiv abgebaut werden. Die Verringerung der Anzahl der Aggregate und die kleinere Größe würden einen aktiven Abbau der Proteinakkumulationen in den Linsen transgener Tiere voraussetzen. Ausgeschlossen werden kann der Abbau der Linsenfaseraggregate über den lysosomalen Weg, da die Aggregate in der Elektronenmikroskopie nicht von Membranen umschlossen waren. Die Verringerung der Akkumulation des mutierten Proteins kann demnach nicht dem Phagosom/Lysosomensystem der Zelle zugeordnet werden. Somit wurden im folgenden weitere mögliche Abbauwege für mutiertes Vimentin oder seine Modifikation in der Linse und ihre möglichen Inhibitoren untersucht. Dazu zählen das Ubiquitin/Proteasom System, Caspasen und molekulare Chaperone.

4.1.7.1 Unveränderte Caspase und Transglutaminaseaktivität in transgenen VimR₁₁₃C und VimΔC2B Linsen.

Vimentin ist als ein Zielprotein für die kovalente Vernetzung durch Transglutaminase in Rinderlinsenzellen beschrieben worden (Clement et al., 1998). Dabei erzeugt die kalziumabhängige kovalente Verknüpfung durch intrinsische Transglutaminase in Linsen verschiedene, höhermolekulare Vimentin-Proteinformen. Sollte dies in VimR₁₁₃C und VimΔC2B Linsen ebenfalls erfolgen, würde diese Verknüpfung die Degradation des Proteins verhindern. Dies würde die Persistenz der Aggregate und somit die Kataraktentwicklung

fördern, aber gleichzeitig den postulierten Abbau der transgenen Vim Δ C2B und VimR₁₁₃C Aggregate in Frage stellen.

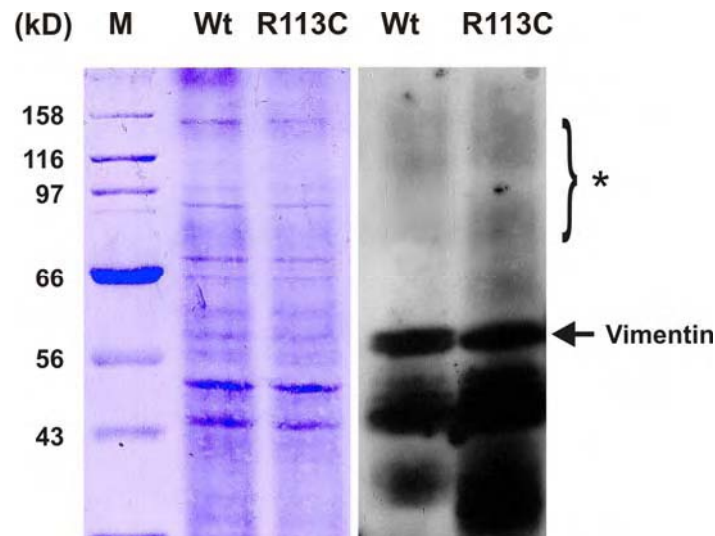


Abb. 4-21 Indirekte Transglutaminasebestimmung in Linsen transgener Mäuse

Zytoskeletthomogenisate von Vim Wt und VimR₁₁₃C Linsen wurden ÜN bei 37°C in Kalziumpuffer inkubiert und anschließend in gleichen Proteinmengen geladen. Die Immundetektion wurde mit einem Antikörper gegen Vimentin durchgeführt. Links ist die Proteinfraktion in der Coomassie-Färbung zu sehen, rechts die Immunoblotdetektion. Die Klammer mit Stern gibt die Zone der Molekulargewichtgrößen der erwarteten Vimentin Banden nach kovalenter Vernetzung an. Weder in der Proteinfärbung noch in der spezifischen Immundetektion konnte quervernetztes Vimentin in den VimWt und VimR₁₁₃C Linsen detektiert werden. M, Marker.

Zur Bestimmung der Transglutaminaseaktivität wurden Proteinlysate von Linsen der VimWt, VimR₁₁₃C und Vim Δ C2B Tiere untersucht. Bei kovalenter Quervernetzung des Vimentin Proteins würde dies durch Detektion hochmolekularer Banden im Western Blot sichtbar werden. Hier konnte jedoch keinerlei signifikante Transglutaminaseaktivität in den Mäuselinsen festgestellt werden. Schon in der Coomassiefärbung der Proteinextrakte konnte kein Unterschied der VimWt und der VimR₁₁₃C Fraktionen in der Proteinkomposition bestimmt werden. Die Immundetektion mit einem Antikörper gegen Vimentin in Abb. 4-21 zeigte keinerlei Banden im markierten höhermolekularen Bereich über 56 kDa. Der Blot wurde stark überexprimiert um auch mögliche schwache Banden zu detektieren. Somit konnten nur dem apparenten Molekulargewicht entsprechendes Vimentin und seine Abbauprodukte in den Lysaten nachgewiesen werden. Gleiche Ergebnisse wurden für Vim Δ C2B erzielt.

Die Degradation von Vimentin wird demnach nicht durch kovalente Verknüpfung verhindert. Zusätzlich konnte auch ein weiterer Mechanismus, der die Aggregation von Vimentin fördert, ausgeschlossen werden, der über das gestörte „Assembly“ des mutierten Vimentin-Proteins zur Formung höherer Strukturen hinausgeht.

Ein weiterer möglicher Abbauweg von Vimentin in der Linse ist durch seine proteolytische Spaltung durch Caspasen vorstellbar. So konnte in Zellkulturexperimenten gezeigt werden, dass Vimentin ein Zielprotein für Caspase 3, 6 und 7 ist und zudem nach induzierter Apoptose vermehrt gespalten wird (Byun et al., 2001). Dies führt zum Abbau des Vimentin-Zytoskeletts in den Zellen, was auch als positiver Katalysator der Apoptose wirkt.

Zur Analyse der Caspase Aktivität wurde ein auf Lumineszenz basierender Assay mit Linsenhomogenaten von VimWt, VimR₁₁₃C und Vim Δ C2B Tieren durchgeführt. Parallel wurde ebenfalls die Caspaseaktivität im Zellkulturmodell untersucht. Dafür kamen stabil mit den VimWt und VimR₁₁₃C Konstrukt transfizierte 3T3-L1 Mausfibroblasten zum Einsatz. Die VimWt Zelllinie bildet perfekte Vimentin Zytoskelette aus und zeigte keinerlei Unterschied zu Wildtyp 3T3-L1 Fibroblasten. Die Expression von VimR₁₁₃C dagegen führt zu Aggregatbildung durch verhinderte Filamentbildung, die die Ausbildung des Vimentin-Zytoskeletts inhibiert (Schietke et al., 2006).

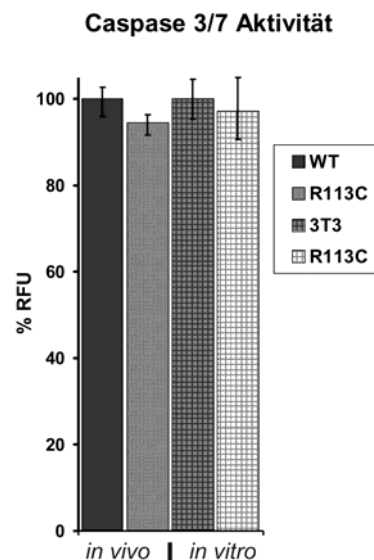


Abb. 4-22 Caspase Aktivität in VimR₁₁₃C exprimierenden Linsen und Zellen

Mit Linsenhomogenate von VimWt und VimR₁₁₃C Linsen sowie mit stabil transfizierten 3T3-L1 Zellen wurde ein Caspase-Glow-Assay durchgeführt. Die Ergebnisse sind prozentual in relativen Lichteinheiten (RFU) angegeben. Die VimWt Ergebnisse wurden dabei zum Vergleich auf 100% gesetzt. In beiden Versuchsaufbauten konnte weder in VimR₁₁₃C Linsen noch in VimR₁₁₃C Zellen eine erhöhte Caspaseaktivität festgestellt werden.

Im Balkendiagramm der Abb. 4-22 sind die Caspaseaktivitäten der Vim R₁₁₃C und VimWt Linsen als auch der 3T3-L1 Fibroblasten in prozentualem Auftrag gezeigt. Die Caspaseaktivitäten in VimR₁₁₃C und VimΔC2B Linsen als auch mit VimR₁₁₃C stabil transfizierten 3T3-L1 Zellen zeigten dabei in Vergleich mit den Wildtypkontrollen keinen signifikanten Unterschied. Somit konnten Caspasen als Hauptbeteiligte für den Abbau der Vimentin Aggregate ausgeschlossen werden. Da Caspase 3 und 7 Schlüsseffektoren in der Apoptose sind, kann zusätzlich das Auftreten vermehrter Apoptose in den VimR₁₁₃C Linsen ausgeschlossen werden.

4.1.7.2 Erhöhte Proteasom-Aktivität in VimR₁₁₃C Linsen und 3T3-L1 Fibroblasten und Ubiquitinierung von transgenem VimR₁₁₃C und VimΔC2B Vimentin

Das Ubiquitin-Proteasom-System ist eines der zentralen Proteinabbau-Systeme der Zelle. Es ist verantwortlich sowohl für den kontrollierten Abbau regulatorischer Proteine als auch für den Abbau falschgefalteter Proteinmoleküle im Sinne einer Qualitätskontrolle. Dabei werden zum Abbau vorgesehene Proteine zunächst mit mehreren Ubiquitinmolekülen markiert und dann durch das Proteasom, das die katalytischen Einheit dieses Systems darstellt, in Peptide abgebaut.

Um den möglichen Abbau der Vim R₁₁₃C und Vim ΔC2B Aggregate in der Linse durch das Ubiquitin-Proteasom System zu untersuchen, wurde eine Immunpräzipitation mit einem Vimentin Antikörper durchgeführt. Ubiquitinierung ist die Voraussetzung für den Abbau im Proteasomkomplex der Zelle. Bei vermehrtem Abbau durch das Proteasomsystem müssen auch die Vimentin-Aggregate durch vermehrte Ubiquitinierung markiert sein.

Die Immundetektion mit dem Ubiquitin Antikörper der Linsenhomogenate von transgenen Mäusen zeigte das erwartete Muster von zahlreichen ubiquitinierten Proteinen. In VimWt Linsen waren diese Signale allerdings nur schwach ausgebildet, was eine Folge des natürlichen geringen Metabolismus in den Linsenfaserzellen darstellt. In VimR₁₁₃C und VimΔC2B Homogenaten dagegen konnte schon ein deutlicher Anstieg der Ubiquitinierung festgestellt werden. Die veränderte Morphologie und ihre Pathologie hat demnach auch einen Einfluß auf die Qualitätskontrollmaschinerie der Zelle. Demnach sind nicht nur Vimentin Aggregate allein, sondern auch die durch Folgeschäden entstandenen, zerstörten Zellbestandteile in transgenen Linsen zu entsorgen.

In Abb 4-24 ist die Immundetektion nach Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen Vimentin für Vim Wt und Vim R₁₁₃C gezeigt. Eine starke Zunahme der Ubiquitinierung der Vimentin Aggregate konnte detektiert werden. Die Spezifität der Banden konnte anschließend mit einer Immundetektion gegen das c-myc-Epitop noch bestätigt werden.

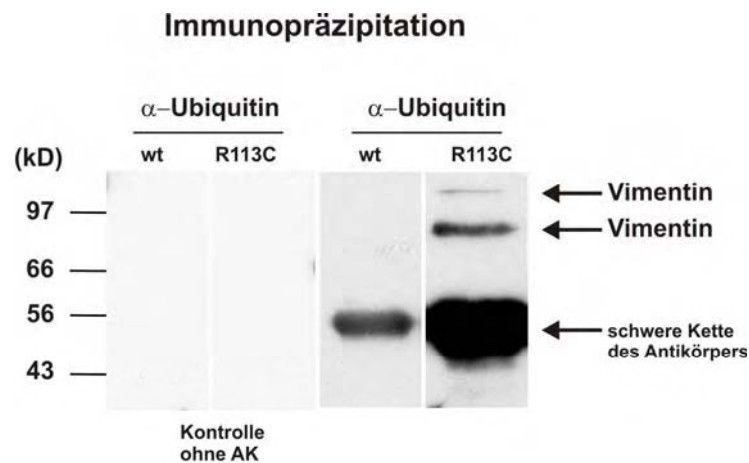


Abb. 4-23 Immundetektion gegen Ubiquitin von Linsenextrakten nach Immunpräzipitation und SDS-PAGE mit einem Vimentin Antikörper

Mit Linsenhomogenaten von VimWt und VimR₁₁₃C Linsen wurde eine Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen Vimentin durchgeführt. Die Abbildung zeigt die Immundetektion mit einem Antikörper gegen Ubiquitin. Links ist die Kontrolle der Immunpräzipitation ohne Antikörper gezeigt. In den Linsen der VimR₁₁₃C transgenen Mäuse konnte eine starke Zunahme der Ubiquitinierung von Vimentin gezeigt werden (Pfeile). Das Signal bei 55 kD resultiert aus dem Nachweis der schweren Kette des Antikörpers gegen Vimentin.

Desweiteren wurde ein Proteasom-Aktivitäts-Assay durchgeführt. In Abb. 4-23 ist die Proteasomaktivität im Balkendiagramm dargestellt. Dabei zeigte sich in VimR₁₁₃C Linsen und transgenen VimR₁₁₃C 3T3-L1 Zellen eine signifikant erhöhte Proteasomaktivität von über 30% im Vergleich zu den Kontrolltieren und Kontrollzellen.

Die Ergebnisse aus der Immunpräzipitation und dem Proteasomaktivitäts-Assay zeigen somit den Abbauweg der Vimentin Aggregate in den transgenen VimR₁₁₃C und VimΔC2B Linsenzellen auf. Mutiertes Vimentin wird demnach gezielt dem Proteasom-Abbau zugeführt, was die transiente Existenz der Aggregate erklärt.

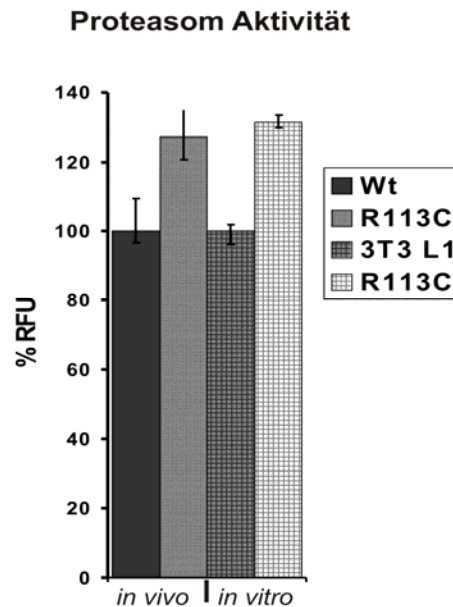


Abb. 4-24 Erhöhte Proteasomenaktivität in VimR₁₁₃C exprimierenden Linsen und Zellen

Mit Linsenhomogenaten von VimWt und VimR₁₁₃C Linsen sowie mit stabil transfizierten 3T3-L1 Zellen wurde ein auf Fluoreszenz basierender Proteasome-Assay durchgeführt. Die Ergebnisse sind in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) angegeben. Die VimWt Aktivität wurde dabei auf 100% festgelegt. In beiden Versuchsaufbauten konnte in VimR₁₁₃C Linsen und VimR₁₁₃C Zellen eine erhöhte Proteasomenaktivität von über 30% festgestellt werden.

Proteasomenblock mit MG-132

Zum Test des Abbaus von Vimentin Aggregaten und um die möglichen Induktion von Apoptose in mutiertem Vimentin exprimierenden Zellen zu untersuchen, wurden die mit VimR₁₁₃C stabil transfizierten 3T3-L1 Fibroblasten mit MG132 geblockt und somit als pathologischer Multiplikator genutzt. MG-132 ist ein zellpermeabler, reversibler Proteasom-Inhibitor, der den Abbau ubiquitiniertes Proteine durch Bindung an den 26S Proteasom-Komplex verhindert. Anschließend wurden die VimR₁₁₃C und Wildtyp Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz untersucht. Gleichzeitig wurde als Marker für Apoptose ein Caspase-Assay mit MG-132 inkubierten Zellsaten durchgeführt.

In Abb. 4-25 ist die Immunfluoreszenzanalyse der VimR₁₁₃C 3T3-L1 Zellen zu sehen. Deutlich sind zum unbehandelten Zeitpunkt die Vimentin-Aggregate in den VimR₁₁₃C Zellen zu erkennen. Morphologisch und in der Fähigkeit zu Proliferation waren jedoch keine Unterschiede zu Wildtyp Zellen vorhanden.

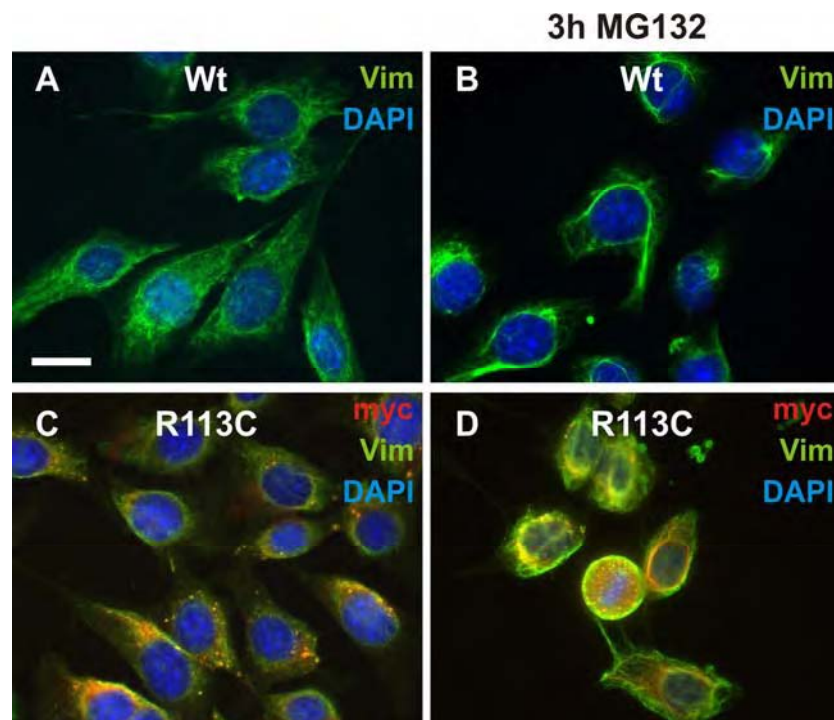


Abb. 4-25 Immunfluoreszenzfärbung von Wildtyp und Vim_{R113C} 3T3-L1 Zellen vor und nach 3h Proteasomenblock mit MG-132

Wildtyp 3T3-L1Fibroblasten und Vim_{R113C} Fibroblasten wurden mit Antikörpern gegen Vimentin (grün), das c-myc-Epitop (rot) und DAPI gefärbt. C, Die Vim_{R113C} Fibroblasten zeigen trotz der Vimentin Aggregate die gleiche Zellmorphologie wie Wildtyp Zellen in A. D, Nach 3 Stunden Proteasomenblock zeigen die Vim_{R113C} Zellen eine wesentlich schlechtere Morphologie und erhöhte Mortalität im Vergleich zu Wildtyp Zellen in B. Balken 20µm.

Drei Stunden nach Inkubation mit MG-132 und Induktion des Proteasomenblocks zeigte sich eine verstärkte Mortalität bei den Vim_{R113C} exprimierenden Zellen und eine deutlich schlechtere Zellmorphologie. Es verloren fast alle Vim_{R113C} Zellen ihre natürliche Gestalt und waren stärker geschrumpft als Wildtypzellen. Ebenso lösten sich die Vim_{R113C} Fibroblasten nach Blockierung des Proteasoms vom Untergrund ab. Dies ist möglicherweise auf die Toxizität der sich nun vermehrt akkumulierenden Vimentin Aggregate zurückzuführen.

Die erhöhte Caspase Aktivität in Vim_{R113C} Zellen im Vergleich zu Wildtyp 3T3-L1 Zellen gab zudem einen indirekten Hinweis für erhöhte Induktion von Apoptose in den transgenen Zellen (Abb. 4-26). Dies unterstreicht, zusätzlich zu den *in vivo* Daten, die Bedeutung des Ubiquitin-Proteasom-Komplexes für den Abbau der Vim_{R113C} und Vim Δ C2B Aggregate in transgenen Zellen.

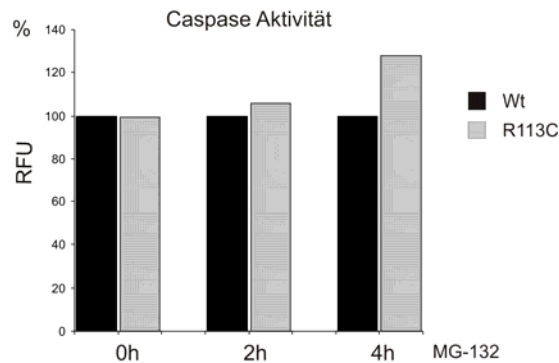


Abb. 4-26 Caspase Aktivität in Wildtyp und VimR₁₁₃C Fibroblasten nach Proteasomblock mit MG-132

Zellhomogenate von Wildtyp und VimR₁₁₃C Fibroblasten wurden nach 2 und 4 h Inkubation mit MG-132 in einen Caspase-Glow-Assay eingesetzt. Die ermittelte Caspaseaktivität der Wildtyp Homogenate wurde als Referenz auf 100% festgelegt. Nach 2 Stunden zeigt sich eine leichte Erhöhung der Caspase Aktivität in VimR₁₁₃C Homogenaten, die nach 4 Stunden auf einen 25% höheren Wert ansteigt. Der MG-132 Proteasomblock treibt die mutiertes Vimentin exprimierenden Zellen in eine vermehrte Apoptose.

4.1.7.2 Rekrutierung von Chaperonen in Linsen transgener Mäuse

Aufgrund der Pathologie in Linsen transgener VimR₁₁₃C und Vim Δ C2B Mäuse, bedingt durch die Proteinaggregationen, ist eine weitere mögliche Stressantwort der Zelle, neben dem Lysosomen-Phagosomen-System und dem Ubiquitin-Proteasom-System, die Rekrutierung von Chaperonen. Chaperone haben auch schon unter normalen Bedingungen Einfluss auf die Bildung und Organisation von IF. Bisher wurde die Interaktion von mehreren kleinen Hitzeschockproteinen (small heat shock proteins, sHSP), verschiedenen α -Kristallinen und HSP27 und HSP70, mit IF-Proteinen wie Vimentin, GFAP, Desmin und auch Keratinen gezeigt. In Zellkultur ist der Einfluss von Chaperonen auf die Filamentbildung von Vimentin und GFAP gut untersucht (Coulombe und Omary, 2002; Perng et al., 1999). Zudem bindet α B-Kristallin an Vimentin unter Stressbedingungen und remoduliert so möglicherweise das Zytoskelett (Djabali et al., 1997). Hsp70 und sein Kochaperon Hsp40 sind im Komplex an der Stressantwort der Zelle beteiligt und vermitteln dabei vermutlich die korrekte Faltung von Proteinen und verhindern Aggregationen.

Durch die Akkommodation der Linse sind die Linsenfasern häufig mechanischem Stress ausgesetzt. Um den möglichen Einfluß der Chaperone auf die Stresssituationen in Vim R₁₁₃C und Vim Δ C2B Mäusen zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzen mit Antikörpern gegen Hsp70 und Hsp40 an Kryoschnitten der Linse durchgeführt. Der Antikörper HSP70 erkennt die konstitutiv exprimierte Isoform Hsc70, sowie die nach Stress induzierte Form Hsp70.

In den Immunfluoreszenzen der VimWt Tiere konnte kaum Hsp40 und Hsp70 nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine geringe, vorwiegend membranständige Lokalisation in den Linsenfaserzellen. Auch konnte keine direkte Kolo­kalisierung mit Vimentin in der Überlagerung erkannt werden (Abb.4-27 A). In VimR₁₁₃C und VimΔC2B Linsen konnte jedoch ein Anstieg der Hsp70 und Hsp40 Expression festgestellt werden. In Abbildung 4-27 ist die vermehrte Expression und Kolo­kalisierung von Hsp70 Proteinen mit Vimentin Aggregaten in den Linsenfaser­n gezeigt. Dabei zeigte sich eine durchgängige Kolo­kalisierung mit den Aggregaten, aber auch eine vermehrte Lokalisation an den Membranen.

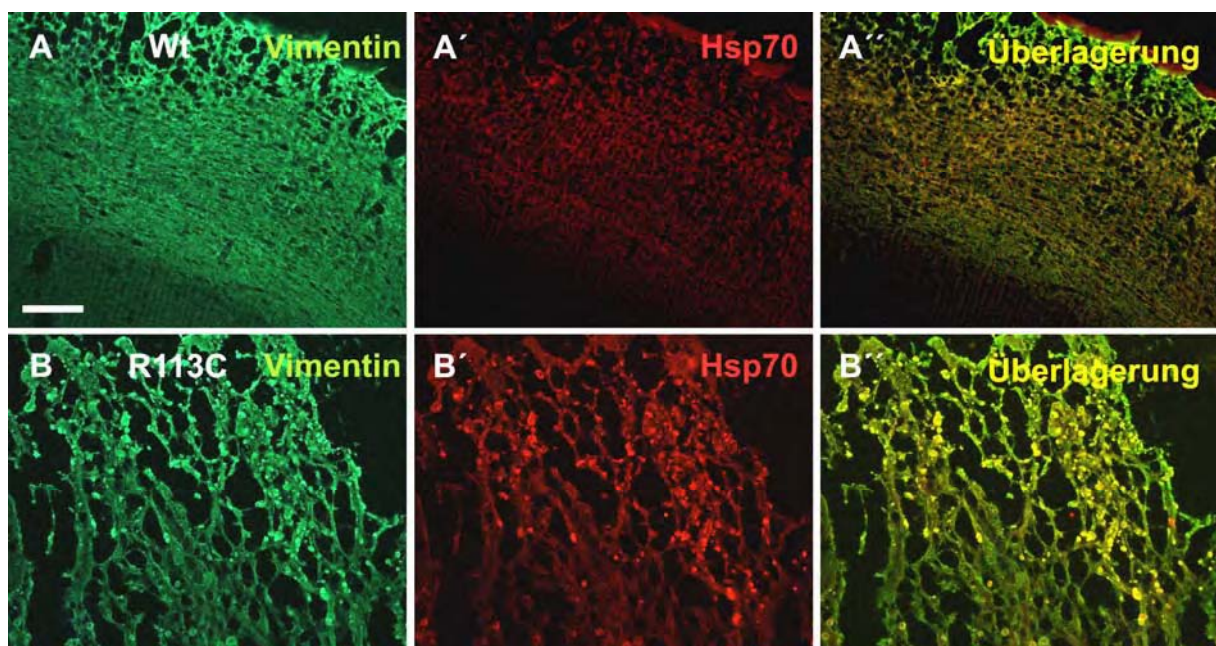


Abb. 4-27 Akkumulation von Chaperonen in Linsen transgener Mäuse

Kryoschnitte der von VimWt und VimR₁₁₃C Mäusen wurden mit Antikörpern gegen Vimentin (grün) und Hsp70 (rot) gefärbt. A', zeigt die geringe membranständige Expression und Verteilung von Hsp70 in VimWt Kontrolltieren. A'', in der Überlagerung konnte keine direkte Kolo­kalisierung detektiert werden. In B', ist die starke Expressionszunahme von Hsp70 zu erkennen und in der Überlagerung (B'') die Kolo­kalisierung mit Vimentin. Balken , 20µm.

Die vermehrte Expression des Hitzeschockproteins Hsp70 konnte auch biochemisch bestätigt werden. Dafür wurden Zytoskelettpräparationen von Linsen hergestellt und nach SDS-PAGE und Western Blot einer Immundetektion mit dem Antikörper gegen Hsp70 eingesetzt. In Abb. 4-28 sind die deutlich intensiveren Signale in den VimR₁₁₃C Linsenextrakte, sowohl in der löslichen als auch in der unlöslichen Fraktion zu erkennen. Die enorme Zunahme der Signalstärke in der unlöslichen Fraktion dokumentiert die Rekrutierung der Chaperone in der Stressantwort in den VimR₁₁₃C Linsen.

Der starke Anstieg der Hsp70 Proteinmenge in den Linsen transgener Mäuse und die eindeutige Kolokalisation von Hsp70 und Hsp40 in der Immunfluoreszenz machen eine Beteiligung der Chaperon-Mechanik als Kofaktor im Abbau der Aggregate sehr wahrscheinlich und zeigen die Induktion der Stressantwort in den transgenen Mäusen.

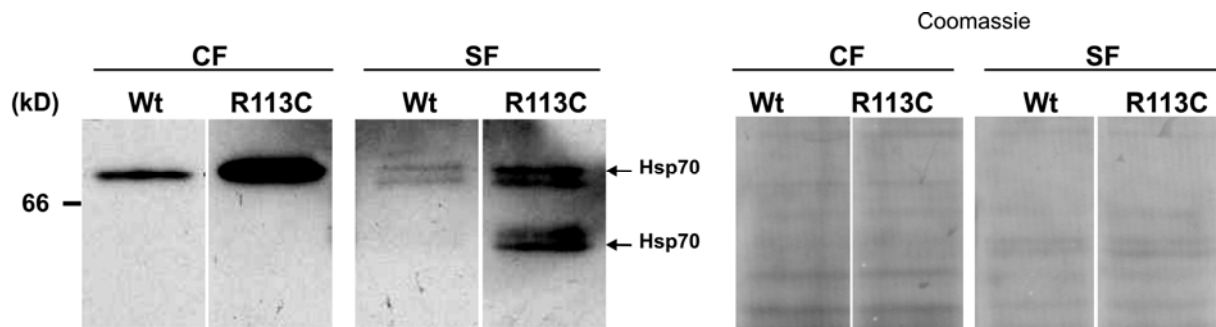


Abb. 4-28 Western Blot-Analyse der Linsenextrakte von VimWt und VimR₁₁₃C Mäusen.

Zytoskelettfractionen (CF) und lösliche Fractionen (SF) von VimWt und VimR₁₁₃C wurden in gleichen Proteinmengen geladen. Die Immundetektion wurde mit einem Antikörper gegen Hsp70 durchgeführt, der aktiviertes Hsp70 als auch natives Hsc70 erkennt. Deutlich ist die Zunahme der Signale in VimR₁₁₃C Fractionen zu erkennen. Als Ladekontrolle ist die Coomassie-Färbung der Membran nach dem Western Blot gezeigt.

4.1.8 Vimentin Aggregate und die Stressantwort in der Linse

Ebenso unerwartet wie die Beobachtung, dass im in den ältesten Zellen der Linse keine Aggregate aufgrund ihres kontinuierlichen Abbaus im Zentrum der Linse mehr zu finden waren, ist die Abwesenheit der Aggregate in der Vimentin exprimierenden Epithelschicht der Augenlinse (Abb. 4-20 D). Eine Besonderheit dieser Zellen in der Linse ist ihre Fähigkeit zur Proliferation. Die mögliche Abwesenheit der Aggregate könnte demnach durch eine erhöhte Proliferationsrate und somit durch einen erhöhten Metabolismus in den Zellen am Linsenbogen im Vergleich zu differenzierten Zellen des Linsenzentrums erklärbar sein. Zudem hätte eine vermehrte Zellbildung einen möglichen Effekt auf die Morphologie der Linse und ihre mechanische Stabilität. Um die Proliferationsrate der Linsenzellen zu bestimmen wurden Dünnschnitte transgener Linsen hergestellt und mit einem Antikörper gegen Ki67 inkubiert. Ki67 ist ein Proliferationsmarker und wird zu allen Zeitpunkten des aktiven Zellzyklus exprimiert. Somit werden alle Zellen, die sich in einem aktiven Teilungszyklus befinden, detektiert.

In der Abb. 4-29 A ist die sehr geringe Proliferationsrate der Linsenepithelzellen im Bereich des Linsenbogens zu sehen. Eine ebenso geringe Anzahl von nur einer Zelle mit Ki67

Nachweis konnten in den Vim^{R113C} und Vim^{ΔC2B} Linsen gefunden werden. Die Spezifität des Nachweises wurde durch die multiplen Kernfärbungen in den Zellen der Cornea dokumentiert. Eine erhöhte Proliferationsrate in den Linsenepithelzellen und ein damit verbundene erhöhte Metabolismusrate und Proteinumsatz konnte damit als Ursache für das Fehlen der Vimentin Aggregate ausgeschlossen werden.

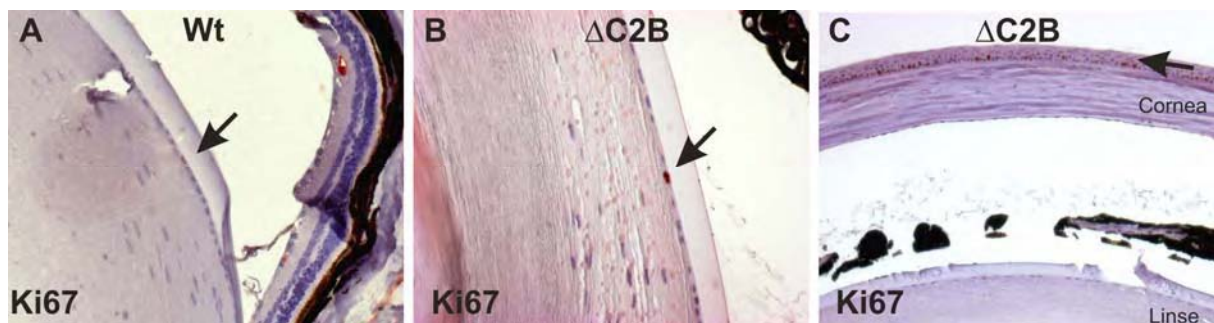


Abb. 4-29 Immunhistochemische Detektion von Ki67 in der Linse transgener Mäuse.

Histologische Dünnschnitte von transgenen Vim^{Wt} und Vim^{ΔC2B} Linsen wurden mit einem Antikörper gegen Ki67 gefärbt. Der Nachweis erfolgte über das DAB-Cromagen, welches in einen braunen Niederschlag resultiert. A und B, deutlich ist die Anfärbung nur eines Zellkerns, sowohl in Vim^{Wt} als auch Vim^{ΔC2B} Linsen zu erkennen. Die Proliferationsrate ist bei beiden Linsenepithelien gleich gering. C, verdeutlicht durch die Färbung zahlreicher Zellkerne (Pfeil) in der Cornea desselben Präparates die Spezifität des Nachweises.

4.1.8.1 Erhöhte GFAP-Expression im Linsenepithel transgener Mäuse

Eine weitere Besonderheit in der Linse ist die Expression von einem weiteren Typ-III-Intermediärfilament in Linsenepithelzellen, namentlich GFAP. GFAP wird normalerweise hauptsächlich in Gliazellen des ZNS gebildet und formt dort zusammen mit Vimentin das Zytoskelett der adulten Zellen. Linsenepithelzellen sind dagegen die einzigen Zellen im Säuger nicht neuronalen Ursprungs und ohne morphologische Gemeinsamkeiten zu Astrozyten, die ebenfalls GFAP exprimieren (Hatfield et al., 1984).

Die sorgfältige Analyse von GFAP „knockout“ Mäusen hat eine enge Wechselbeziehung von Vimentin und GFAP beschrieben. Dies gilt in besonderem Maße in der Situation nach Induktion von Stress und Verletzung des ZNS. Dabei wurde ihnen speziell in der reaktiven Gliose, wobei beide Proteinen vermehrt exprimiert sind, eine Schlüsselrolle zugeschrieben (Pekny and Pekna, 2004). Um Mögliche Veränderungen der GFAP Expression und Lokalisation in den transgenen Vim^{R113C} und Vim^{ΔC2B} Mäusen zu analysieren, wurden Kryoschnitte von Linsen hergestellt und einer Immunfluoreszenzanalyse mit einem Antikörper gegen GFAP unterzogen. Im folgenden sind die Ergebnisse für die Vim^{ΔC2B}

Mäuse gezeigt, die im Vergleich mit den VimR₁₁₃C Mäusen in der Linse den gleichen aber verstärkten Phänotyp aufwiesen, was sich durch größere und zahlreichere Aggregate in den Linsenfasern dokumentierte.

In Abb. 4-30 B ist die Immunfluoreszenz der Linse einer Vim Δ C2B Maus zu sehen, die im Linsenepithel eine eindeutig erhöhte GFAP Expression aufwies. In umliegenden oder angrenzenden Linsenfaserzellen war GFAP allerdings, wie in der Wildtyp Situation, nicht detektierbar. In Doppelfluoreszenzen mit Vimentin zeigte sich eine geringe Expression von Vimentin in den Linsenepithelzellen als in differenzierten Linsenfasern und nur geringe, lokal auf einige Epithelzellen der Linse beschränkte Kolo-kalisation mit GFAP. Die Vimentin Aggregation wird entweder von der Überexpression des GFAP verhindert oder es zeigt sich eine Induktion der GFAP Transkription, obwohl noch keine Vimentin Aggregationen im Linsenepithel vorhanden sind.

Die Befunde aus der Immunfluoreszenz wurden anschließend durch Immundetektion von Linsenhomogenaten nach Western-Blotting bestätigt. So konnte in Gesamtproteinlysaten von Vim Δ C2B Linsen eine intensive Bande mit einem Antikörper gegen GFAP detektiert werden, während im Vergleich in VimWt Linsen noch kein GFAP Protein nachweisbar war (Abb. 4-30 C).

Zur Analyse der Ursache der vermehrten GFAP Proteindetektion wurde eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt. Dafür wurde RNA aus den Linsen transgener Tiere präpariert, durch reverse Transkription cDNA hergestellt und mit spezifischen Primern gegen die GFAP mRNA ein Fragment von 179bp in der PCR amplifiziert. Mögliche DNA Kontaminationen, die zu falschen Werten führen würden, konnten durch Intron-umspannende Primer überprüft werden. Als Referenz der eingesetzten RNA Mengen wurde parallel eine β -Aktin PCR durchgeführt. Nach 35 PCR-Zyklen zeigte sich nur eine geringe Amplifikation des GFAP Fragmentes in VimWt Tieren, während in Vim Δ C2B eine große Menge vorhanden war (Abb. 4 30 D). In den Vim Δ C2B Linsen konnte somit indirekt eine deutliche Zunahme der GFAP mRNA nachgewiesen werden. Die vermehrten Proteinmengen im Linsenepithel sind folglich auf erhöhte Transkription des GFAP Gens zurückzuführen. Dies impliziert eine Beteiligung von mutiertem Vimentin in die transkriptionelle Kontrolle der GFAP Expression *in vivo*. GFAP wird durch den Jak/Stat-Signalweg reguliert, der wiederum von MAP-Kinasen induziert werden kann. In Vimentin transgenen Zelllinien konnte eine Aktivierung der MAP-Kinasen nach Stressinduktion beobachtet werden, was eine Beteiligung von transgenem Vimentin postuliert (Schiecke, Diplomarbeit, 2004). Somit beeinflusst möglicherweise

Vim Δ C2B die transkriptionelle Regulation von GFAP durch Einleitung eines Gewebereparaturmechanismus im Linsenepithel der Mäuse.

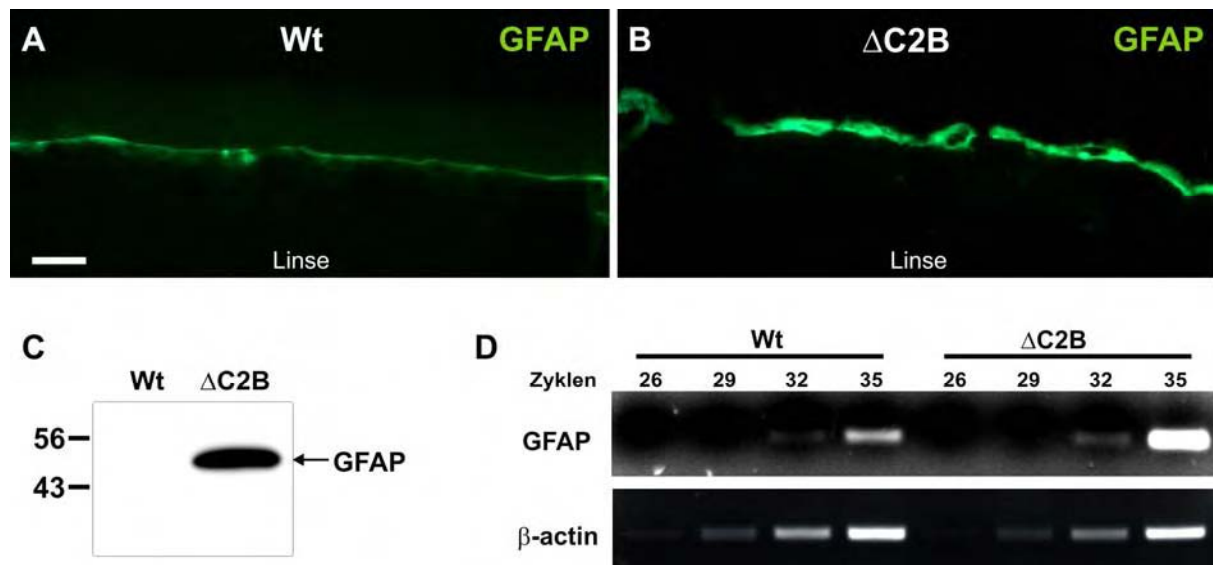


Abb. 4-30 Erhöhte Expression von GFAP im Linsenepithel.

Die erhöhte Expression von GFAP im Linsenepithel wurde durch Immunfluoreszenzanalyse, Western-Blot und semiquantitativer RT-PCR bestimmt.

A und B, zeigen die Immunfluoreszenzdetektion mit einem Antikörper gegen GFAP (grün) in der Epithelschicht der Linse. Eindeutig ist die intensivere Fluoreszenz bei gleicher Belichtungszeit im Epithel der Vim Δ C2B Mäuse zu erkennen. Balken, 20 μ m.

C, zeigt die Western Blot-Analyse von Linsenhomogenaten. VimWt und Vim Δ C2B Lysate wurden mit gleichen Proteinmengen geladen. Deutlich ist das intensivere Signal in den Vim Δ C2B Linsenextrakten zu erkennen.

D, semiquantitative RT-PCR Analyse von mRNA-Mengen in transgenen Mauslinsen und anschließender Agarose-Gelelektrophorese. Ein für die mRNA von GFAP spezifisches Amplikon von 179 bp war in VimWt Linsen nach 35 Zyklen nur schwach detektierbar, während es in Vim Δ C2B Linsen reichlich vorhanden war. Die Kontrolle der eingesetzten RNA Menge erfolgte über das β -Aktin Amplikon.

4.1.9 Aktivierte Müller-Glia und Astrozyten in der Retina transgener Mäuse

Aufgrund der bekannten Studien zu GFAP und Vimentin in Gliazellen und ihrer bekannten Funktion in der reaktiven Gliose war eine Untersuchung dieser Zelltypen in den transgenen Mäusen naheliegend. Im Auge lokalisierte Gliazellen befinden sich in der Retina, die entwicklungsgeschichtlich betrachtet einen Ausläufer des ZNS darstellt. Vimentin exprimierenden Zellen in der Retina sind die Müller-Gliazellen, die eine Stützfunktion für die Photorezeptoren, Ganglion-, Bipolar-, Amakrin- und Horizontalzellen in der Retina übernehmen und eine spezielle Form der Astroglia darstellen. Im Normalzustand exprimieren

Müller-Zellen nur wenig GFAP, welches in deren Endfüßchen lokalisiert ist. Weitere Vimentin exprimierende Zellen sind die in der Ganglionzellschicht lokalisierten Astrozyten. Die Astrozyten der Retina exprimieren hauptsächlich das IF-Protein GFAP und nur in geringeren Mengen Vimentin. Bei Gewebereparaturmechanismen nach Verletzung des ZNS oder der Retina, unterlaufen Astroglia einige charakteristische morphologische Veränderungen, die sich durch Zunahme ihrer Zellmasse und Bildung von Zellfortsätzen auszeichnet. Diese Hypertrophie geht mit einer verstärkten IF-Expression einher. Dazu zählt GFAP, aber auch die normalerweise nur in unreifen Astroglia reichlich gebildeten Proteine Nestin und Vimentin .

In Immunfluoreszenzanalysen mit Antikörpern gegen GFAP und Vimentin konnte in VimWt Retinae die normale Verteilung der Proteine gezeigt werden (Abb. 4-31 A). Vimentin ist in den Müller-Zellen im gesamten Zytoplasma präsent und bildet ein intaktes Zytoskelett. GFAP konnte wie erwartet in den Endfüßchen der Müller-Zellen und in Astrozyten der Ganglionzellschicht gefunden werden.

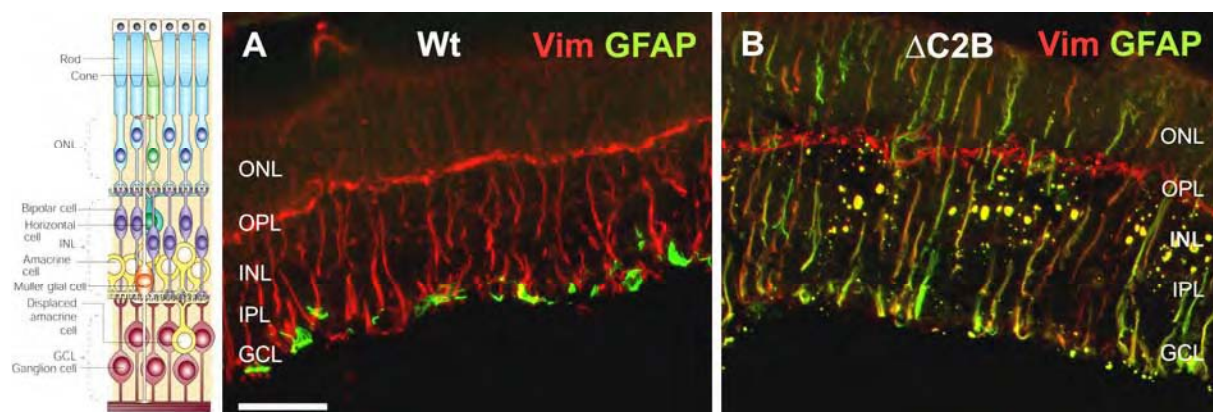


Abb. 4-31 Aktivierte Astrocyten und Gliazellen in der Retina von Vim Δ C2B Mäusen.

Doppel-Immunfluoreszenzdetektion von Vimentin (rot) und GFAP (grün) in der Retina von VimWt und Vim Δ C2B Mäusen. In der VimWt Retina ist die Expression von GFAP auf die Astrozyten der Ganglionzellschicht (GCL) und die Endfüßchen der Müller-Zellen beschränkt. Vimentin ist in der Retina ausschließlich in Müller-Zellen und Astrozyten vorhanden. In der Vim Δ C2B Retina wird GFAP im gesamten Zellkörper der Vim Δ C2B exprimierenden Müller-Zellen vermehrt gebildet. Zudem kolokalisiert GFAP mit Vim Δ C2B Aggregaten in Müller-Zellen. Balken, 50 μ m. Das Schema links verdeutlicht den Aufbau der Retina und seiner verschiedenen Zellschichten (modifiziert nach Dyer et al., 2001).

In Vim Δ C2B Retinae wurden bei 5 Monate alten Mäusen große Aggregate von Vimentin in den Müller-Glia gebildet (Abb. 4-31 B). Die Aggregate waren überwiegend im Zellkörper im Bereich des INL zu finden, wo die geringste Verzweigungen der Müller-Zellen im Zellkompartiment vorliegen. Gleichzeitig war die GFAP Expression in diesen Zellen stark

hochreguliert. Dies ist ein Kennzeichen für die Aktivierung der Müller-Glia nach Stressinduktion in der Retina transgener Mäuse.

Zudem war in den zytoplasmatischen Vimentin Akkumulationen ebenfalls GFAP koaggregiert, was in der Überlagerung in Abb. 4-31 B deutlich wird. In Gegensatz zur Situation in der Linse, in der mutiertes Vimentin die „Beaded Filament“-Organisation nicht beeinflusste, reorganisiert $\text{Vim}\Delta\text{C2B}$ das GFAP in die Aggregate und verhindert sein „Assembly“ in Filamentstrukturen. Zugleich konnte eine Veränderung in der Lokalisation von GFAP gezeigt werden. In $\text{Vim}\Delta\text{C2B}$ exprimierenden Müller-Zellen ist GFAP von den Endfüßchen in eine gesamt zytoplasmatische Verteilung umorganisiert. Überraschenderweise sind in dieser speziellen Situation GFAP und Vimentin kolokalisiert und bilden in der Immunfluoreszenzfärbung auch normale Filamente, trotz der Anwesenheit von $\text{Vim}\Delta\text{C2B}$.

Die Befunde der Immunfluoreszenzanalyse wurden anschließend in Elektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigt. In horizontalen Ultradünnschnitten der Retina von 6 Monate alten $\text{Vim}\Delta\text{C2B}$ Mäusen konnten die VimentinAggragate gefunden werden. Diese unterschieden sich in der Elektronenmikroskopie nicht von Aggregaten in Linsenfaserzellen, obwohl sie noch zusätzlich aus GFAP bestehen. Auch die Aggregate in den Müller-Zellen waren dichtgepackt und nicht von Membranen umschlossen. Ebenso konnte keine Plasmamembranassoziation festgestellt werden. Abb. 4-32 A zeigt eine solche Müller-Zelle mit IF-Aggregaten im Cytoplasma.

Zellmorphologisch konnten keine Veränderungen der Müller-Glia festgestellt werden. Die erhöhte Expression von GFAP und die Bildung der Aggregate haben demnach keine direkten Auswirkungen auf die Gestalt der Müller-Zellen in der Retina. Auch eine Zunahme der Zellgröße, ein Merkmal bei aktivierte Astroglia, konnte in betroffenen aktivierten Müller-Glia nicht beobachtet werden.

In der elektronenmikroskopischen Analyse von Astrozyten wurden ebenfalls die Aggregate im Zytoplasma gefunden. Auch hier gelten dieselben morphologischen Befunde wie für die Müller-Zellen beschrieben. In Respektive der morphologischen Befunde und den Ergebnissen aus den Immunfluoreszenzen, kann eine Aussage über pathologische Fehlfunktionen für die Retina nicht getroffen werden.

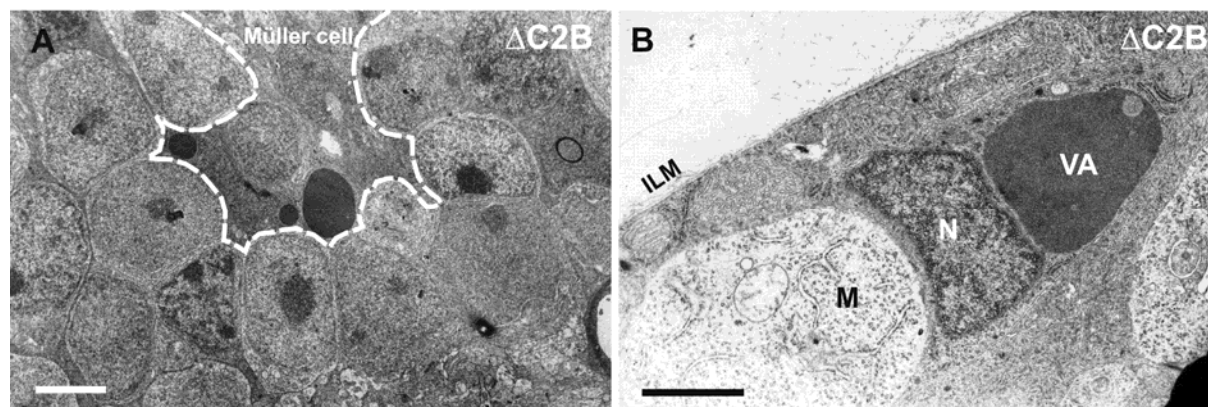


Abb. 4-32 Elektronenmikroskopische Analyse von Astrozyten und Müller-Gliazellen in der Retina von Vim Δ C2B Mäusen.

Ultradünnschnitte der Retina von Vim Δ C2B Mäusen wurden Elektronenmikroskopisch auf das Vorkommen der von Vimentin-Aggregaten und auf morphologische Veränderungen überprüft.

A, zeigt einen horizontalen Ultradünnschnitt durch die Retina. Die Umrisse der Zellmembranen einer Müller-Zelle sind mit der gestrichelten Linien gekennzeichnet und grenzen diese von den umliegenden bipolaren, horizontalen und amakrinen Zellen ab. Deutlich sind die dunklen Vim Δ C2B Aggregate ausschließlich im Zellkörper der Müller-Zelle zu erkennen. Balken, 50 μ m.

B, zeigt einen Ultradünnschnitt der apikalen Ganglionzellschicht. Deutlich ist die Vimentin-Aggregation (VA) in einem Astrozyten zu sehen. M, Mitochondrium. N, Nukleus. ILM, Innere limitierende Membran. Balken, 4 μ m.

4.1.9.1 Aktivierung des Transkriptionsfaktors Stat3 in der Retina transgener Mäuse

Die Aktivierung der Müller-Glia in der Retina Vimentin mutierter Mäuse stellt die Frage nach der Regulation der vermehrten GFAP Expression. Dem Transkriptionsfaktor Stat3 wird hierbei, im speziellen Fall der reaktiven Gliose, eine entscheidende Rolle für die Hochregulation von GFAP zugesprochen (Sriram et al., 2004). Dabei wurde gezeigt, dass eine Signalkaskade über den Jak/Stat-Signalweg die Transkription von GFAP induziert, dessen Promotor Stat3-Bindungsstellen aufweist. Stat3 wird durch an gp130-Rezeptoren vermittelte Phosphorylierung im Zytoplasma aktiviert, gelangt als Dimer in den Zellkern und initiiert dort die Transkription seiner Zielgene. Um die Aktivierung der GFAP Expression in Müller-Zellen der Retina über den JAK/Stat-Signalweg nachzugehen, wurden Semidünnschnitte von Retinae 5 Monate alter VimWt und Vim Δ C2B Mäuse histochemischen Untersuchungen mit einem Antikörper gegen Stat3 unterzogen (Abb. 4-33).

In Vim Δ C2B Retinae konnte eine deutliche intensivere Vorkommen im Zytoplasma und die eindeutige Translokation von Stat3 in die Zellkern der Gliazellen detektiert werden. Dies traf sowohl auf Müller-Zellen als auch auf die Astrozyten der Ganglionzellschicht zu.

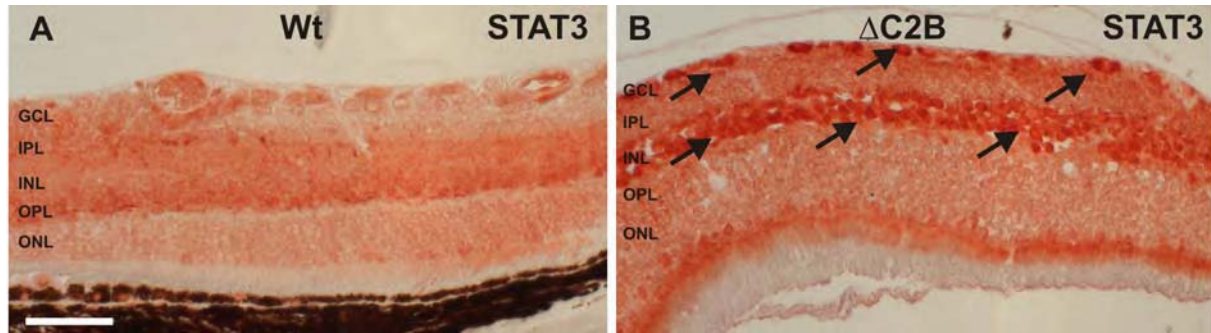


Abb. 4-33 Immunhistochemische Detektion von Stat3 in der Retina transgener Mäuse.

Histologische Dünnschnitte von transgenen VimWt und Vim Δ C2B Retinae wurden mit einem Antikörper gegen Stat3 gefärbt. Der Nachweis erfolgte über das AEC-Cromagen, welches in einen roten Niederschlag resultiert. A, zeigt die geringe zytoplasmatische Verteilung von Stat3 in der Retina von VimWt Mäusen. B, deutlich ist die starke Aktivierung mit einhergehender Lokalisation von Stat3 in den Zellkernen von Müller-Zellen und Astrozyten zu erkennen (Pfeile). Balken, 50 μ m.

Um die Stat3 Ergebnisse transgener Mäuse zu verifizieren, wurden Proteinlysate von VimWt, VimR₁₁₃C und Vim Δ C2B 3T3-L1 Zellen hergestellt und biochemisch untersucht. Das Zellkultursystem wurde hier gewählt um Aufschluss darüber zu erhalten, ob die Antwort der Gliazellen der Retina intrinsischer oder extrinsischer Natur sind und möglicherweise *in vivo* nur aus der Zerstörung der Linsen hervorgehen. In Abb. 4-34 ist die Analyse der Zellysate der VimR₁₁₃C und Vim Δ C2B 3T3-L1 Zellen gezeigt. Auch im Zellkultursystem konnte eine Zunahme der Stat3 Proteinmengen eindeutig durch densitometrische Messung der Signalstärken der Immundetektionen bestimmt werden. Dabei zeigte sich ein dreifach erhöhter Wert in Vim Δ C2B Zellen und eine Verdopplung in VimR₁₁₃C Fibroblasten im Vergleich mit Wildtyp 3T3-L1 Zellen.

Die Ergebnisse deuten auf eine von mutiertem Vimentin selbst hervorgerufenen Stresssignal hin, dass aktivierend in den Jak/Stat-Signalweg eingreift und diesen induziert. Dies ist übereinstimmend mit Ergebnissen aus *in vitro* Experimenten von Vim R₁₁₃C 3T3-L1 Zellen, die die mitogen aktivierte Stresskinase Erk-1 in erhöhter Menge exprimieren (Schiecke, Diplomarbeit 2004). Erk1 kann Stat3 durch Phosphorylierung aktivieren und vermittelt somit möglicherweise die Stressantwort in den aktivierten Glia der Retina.

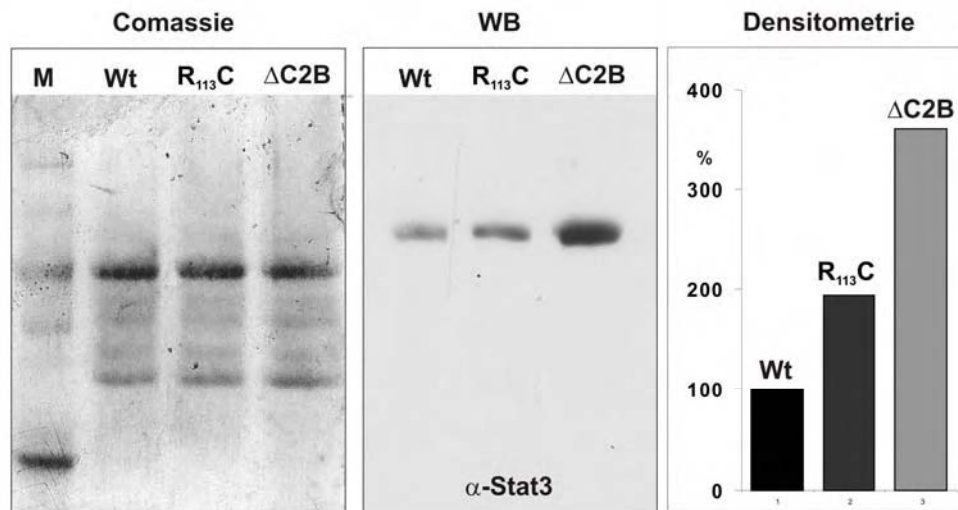


Abb. 4-34 Stat-3 Immundetektion von Zellextrakten transgener 3T3-L1 Fibroblasten

Proteinhomogenate von stabil transfizierten 3T3-L1 Fibroblasten wurden in der SDS-Page aufgetrennt und anschließend mit einem Antikörper gegen Stat3 immundetektiert. Die Coomassie Färbung der PVDF Membran nach dem Transfer dokumentiert die gleichen Auftragsmengen für alle drei Zellfraktionen. Im Western-Blot ist deutlich die schwache Detektion der von Stat3 in VimWt Proteinfraktion zu erkennen. In den VimR₁₁₃C und VimΔC2B Fraktionen konnten deutlich vermehrte Stat3 Proteinmengen gemessen werden. Im Balkendiagramm der Densitometriemessung zeigt sich eine 260%ige Stat3 Zunahme in VimΔC2B und eine 93%ige Zunahme in VimR₁₁₃C Zellen im Vergleich mit Wildtyp Zellen.

4.1.10 Aktivierte Gliazellen im optischen Nerv transgener Mäuse

Die Aktivierung der Gliazellen in der Retina als Stressantwort auf die Aggregatbildung in diesen Zellen wirft die Frage nach der Situation in anderen Vimentin exprimierenden Gliazellen der transgenen Mäuse auf. Grundsätzlich gibt es drei verschiedene Typen von Gliazellen. Oligodendrozyten bilden die Myelinscheiden um Nervenfasern. Sie isolieren die Nervenfasern elektrisch und ermöglichen dadurch die neuronale Signalübertragung. Mikrogliazellen sind die immunkompetenten Zellen des Gehirns. Sie sind die ersten Zellen, die auf pathologische Ereignisse reagieren und die Immunantwort des Gehirns einleiten. Und die Astrozyten, sie regulieren unter anderem die molekulare Zusammensetzung des Extrazellulärraumes und beeinflussen damit den Gleichgewichtszustand im Gehirn. Mit ihren Zellfortsätzen umschließen sie das Blutgefäß-System und vermitteln den Austausch der wesentlichen am zellulären Stoffwechsel beteiligten Stoffe.

Vimentin ist hauptsächlich in Vorläuferzellen der Glia exprimiert, wird aber auch in adulten Astrozyten gebildet. Im Gehirn sind das die Astrozyten der weißen Substanz und die Radialglia (Bergmann Glia), die speziellen Astrozyten des Kleinhirns. Zudem wird Vimentin in den Astrozyten des optischen Nerves exprimiert (Hutchins and Casagrande, 1989). GFAP dagegen ist generell in allen Gliazellen nachweisbar (Calvo et al., 1990; Eng et al., 2000).

4.1.10.1 Transgene Vimentin Expression in Astroglia

Immunfluoreszenzanalysen der Gehirne von transgenen $\text{Vim}\Delta\text{C2B}$ und $\text{VimR}_{113}\text{C}$ Mäusen zeigten keine Auffälligkeiten in der Morphologie oder Vimentin Expression. Zudem war das Transgen nur sehr gering in den Bergmann Glia des Kleinhirns oder Astrozyten der weißen Substanz exprimiert.

In den Astrozyten des optischen Nerven zeigte sich jedoch in der Immunfluoreszenzfärbung von Kryoschnitten 3,5 Monate alter transgener Mäuse, die Expression des mutierten Vimentin Proteins.

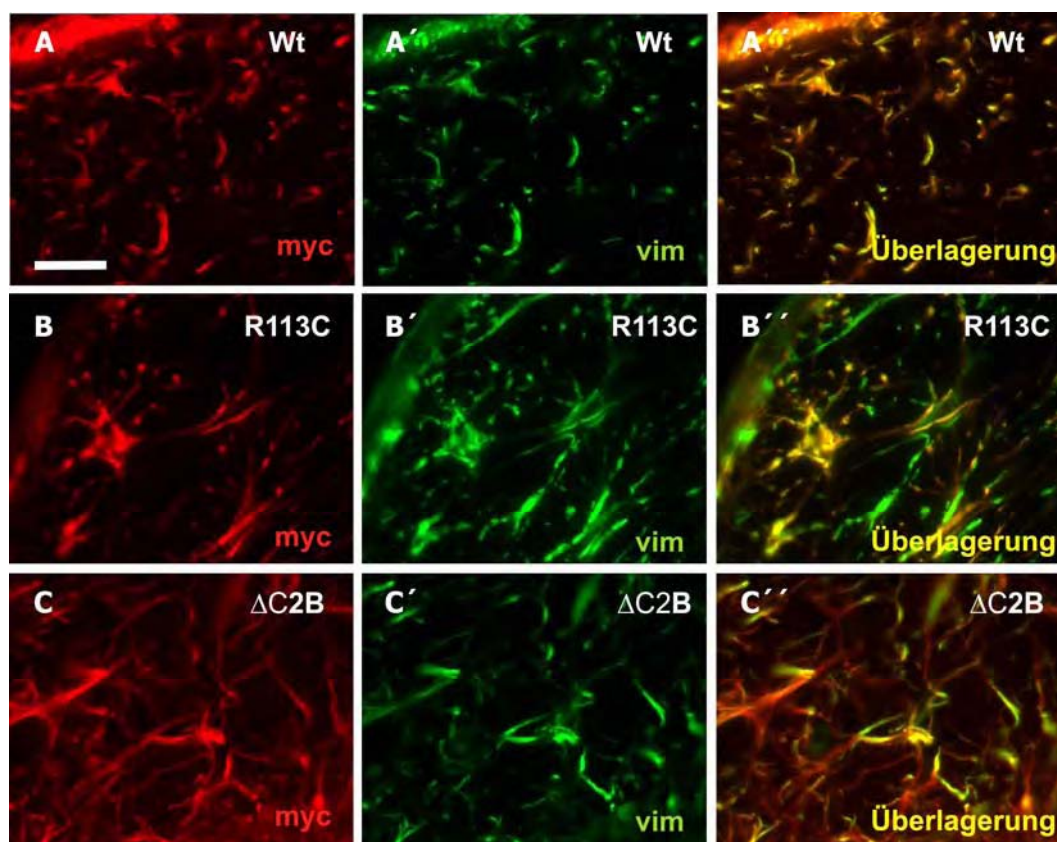


Abb. 4-35 Transgene Vimentin Expression in Astrozyten des optischen Nerven

Doppel-Immunfluoreszenzdetektion von Vimentin (grün) und gegen das c-myc-Epitop (rot) im optischen Nerven von VimWt , $\text{VimR}_{113}\text{C}$ und $\text{Vim}\Delta\text{C2B}$ Mäusen. Die Kryoschnitte wurden in transversaler Ebene durchgeführt. A, zeigt die Vimentin Expression in Gliazellen des optischen Nerven von VimWt Tieren. Transgenes (rot) und endogenes Vimentin bilden dabei homogene Filamente und sind in gleichen Mengen präsent. B, im Vergleich zu VimWt Tieren ist vermehrte Expression von Vimentin in den Gliazellen zu erkennen. $\text{VimR}_{113}\text{C}$ bildet jedoch keine Aggregate im optischen Nerven aus. C, In $\text{Vim}\Delta\text{C2B}$ Mäusen zeigte sich ebenfalls eine vermehrte Vimentin Expression mit einem noch höheren Anteil transgenem Protein als in $\text{VimR}_{113}\text{C}$ Mäusen und ebenfalls keine Aggregatbildung. Balken, 20 μm .

In Abb. 4-35 sind die Immunfluoreszenzfärbungen mit einem Antikörper gegen Vimentin und das c-myc-Epitop gezeigt. Dabei konnte in VimWt , $\text{VimR}_{113}\text{C}$ und $\text{Vim}\Delta\text{C2B}$ Astrozyten des optischen Nerven transgenes Vimentin Protein nachgewiesen werden. Wie in der

Überlagerung der endogenen und transgenen Immunfluoreszenzfärbung deutlich wird, ist die transgene Expression in VimR₁₁₃C und Vim Δ C2B Mäusen im Vergleich zum VimWt wesentlich inhomogener und nicht in allen Zellen gleich stark ausgeprägt. Trotz der relativ starken Expression von mutierten Protein waren jedoch keine Aggregate zu erkennen. Das transgene Protein schien vielmehr in das bestehende endogene Filamentsystem integriert zu sein (Abb. 4-35 C''). Deutlich wird aber schon in der alleinigen Vimentin Färbung, dass die Expression von endogenen Vimentin insgesamt in VimR₁₁₃C und Vim Δ C2B Astrozyten stark hochreguliert ist. Ob die Astrozyten eine Stressreaktion wie die Müller-Glia in der Retina zeigten, wurde im nächsten Schritt durch eine Doppelimmunfluoreszenz mit einem Antikörper gegen GFAP erörtert.

4.1.10.2 Erhöhte GFAP Expression in Astrozyten des optischen Nerven

In den Doppel-Immunfluoreszenzen gegen GFAP und Vimentin an transversalen Schnitten des optischen Nerven vor dem Chiasma konnte eine starke Zunahme der GFAP Expression festgestellt werden. In der Übersicht der Abb. 4-36 ist die Detektion der intensiven Färbung von GFAP und Vimentin im gesamten optischen Nerven der VimR₁₁₃C und Vim Δ C2B Mäuse zu sehen, während in VimWt nur geringe Mengen Protein gefärbt werden konnten.

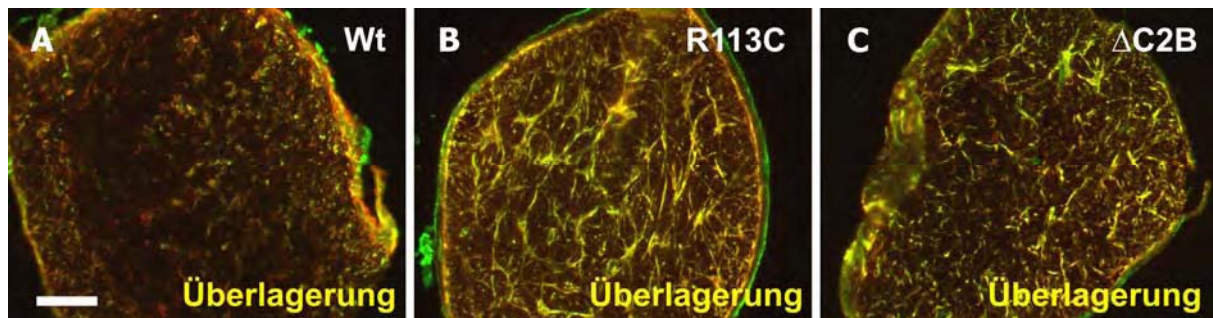


Abb. 4-36 Vermehrte GFAP Expression im optischen Nerven transgener Mäuse

Doppel-Immunfluoreszenzdetektion von Vimentin (grün) und gegen GFAP (rot) im optischen Nerven von VimWt, VimR₁₁₃C und Vim Δ C2B Mäusen. Die Kryoschnitte wurden in transversaler Ebene durchgeführt. A, zeigt in der Überlagerung die geringe Vimentin und GFAP Expression in Gliazellen des optischen Nerven von VimWt Tieren., B, im Vergleich zu VimWt Tieren ist eine vermehrte Expression von GFAP und Vimentin in den Gliazellen zu erkennen. C, in Vim Δ C2B Mäusen zeigte sich ebenfalls eine vermehrte GFAP und Vimentin Expression. Balken, 20 μ m

Bei hoher Vergrößerung (Abb. 4-37) zeigt sich die stark vermehrte Expression und Relokalisation von Vimentin und GFAP in Astrozyten der mutanten Vimentin exprimierenden Mäuse. Vimentin und GFAP sind dabei fast ausschließlich kolokalisiert anzutreffen und bilden ein dichtes heteropolymeres Filamentnetzwerk in den Astrozyten aus.

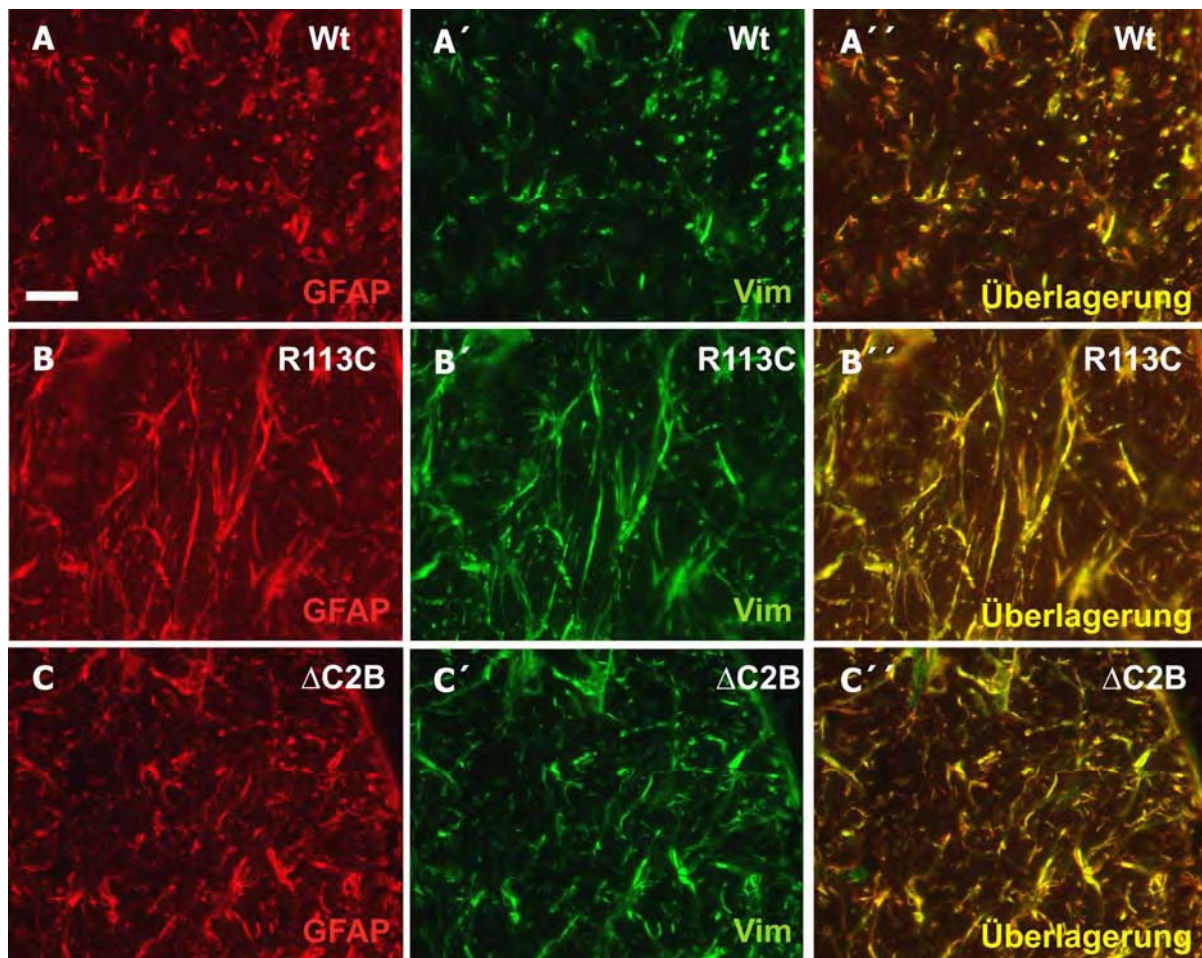


Abb. 4-37 Aktivierte Gliazellen im optischen Nerv transgener Mäuse.

Doppel-Immunfluoreszenzdetektion von Vimentin (grün) und GFAP (rot) in optischen Nerven von 3 Monate alten VimWt, Vim_{R113C} und Vim Δ C2B Mäusen. Die Kryoschnitte wurden in transversaler Ebene durchgeführt. A, zeigt die normale GFAP und Vimentin Expression in Gliazellen des optischen Nerven von VimWt Tieren. B, im Vergleich zu VimWt Tieren ist stark vermehrte Expression von GFAP und Vimentin in den Gliazellen zu erkennen. Sie bilden dabei, wie in der Überlagerung zu sehen, ein ausgeprägtes Filamentsystem aus. C, in Vim Δ C2B Mäusen zeigte sich ebenfalls eine vermehrte GFAP und Vimentin Expression. Dies kennzeichnet die Aktivierung der Gliazellen. Balken, 20 μ m.

Zudem zeigte sich in den Astrozyten, die für reaktive Astrozyten charakteristischen dicken GFAP und Vimentin Filamentbündel und sternförmigen Zellfärbung. Sehr wahrscheinlich wird mutiertes Vimentin in dieser Konstellation in das von endogenem Vimentin und GFAP gebildete Zytoskelett integriert und in diesem auch toleriert, ohne dass es zum Zusammenbruch der Filamente kommt. GFAP hat hier, wie im Linsenepithel, einen kompensatorischen Effekt auf das mutierte Vimentin. Trotz der in der Immunhistologie nicht detektierbaren Vimentin Aggregate reagieren die Astrozyten des optischen Nerven mit charakteristischen Merkmalen aktivierter Astrozyten, was als die Antwort dieser Zellen auf das durch mutiertes Vimentin hervorgerufene Stresssignal angenommen werden muss.

4.1.10.3 Ultrastruktur des optischen Nerven von *Vim Δ C2B* Mäusen

Aufgrund der erhöhten GFAP Expression in den Astrozyten des optischen Nerven von *VimR₁₁₃C* und *Vim Δ C2B* Mäusen, können die Astrozyten als aktiviert bezeichnet werden. Extreme metabolische Aktivierung von Astroglia im ZNS nach Induktion von starkem Stress durch Ursachen wie Verletzung, neurotoxische Substanzen oder Ischämie hat in der reaktiven Gliose auch eine Veränderung der Zellmorphologie zur Folge. Zur Klärung der Zellmorphologie der aktivierten Astrozyten in den transgenen Mäusen, wurden Ultradünnschnitte des optischen Nerven einer 6 Monate alten *Vim Δ C2B* Maus hergestellt, in der die größten morphologischen Veränderungen erwartet wurden.

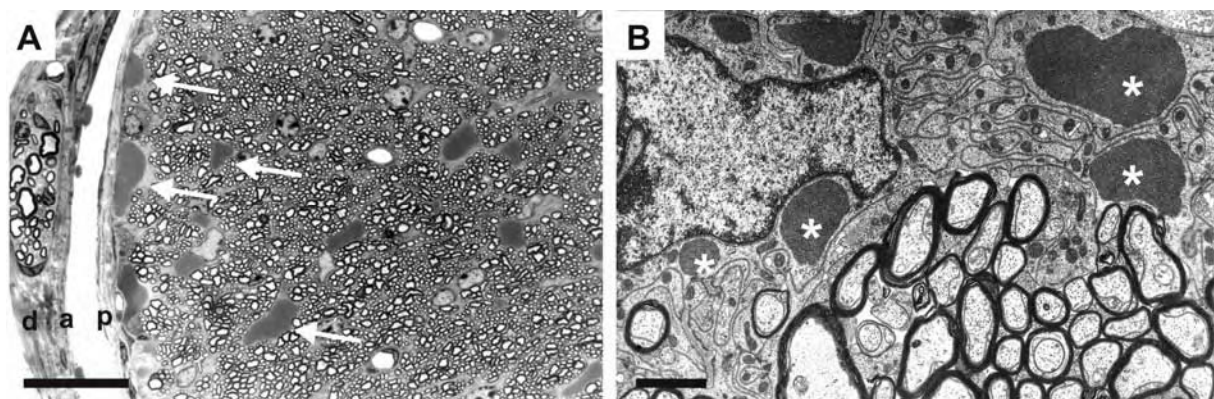


Abb. 4-38 Ultrastrukturanalyse des optischen Nerven von *Vim Δ C2B* Mäusen

Elektronenmikroskopische Analyse transversaler Ultradünnschnitte des optischen Nerven 6 Monate alter *Vim Δ C2B* Mäuse. A, zeigt die normale Morphologie des Nerven und seiner Kompartimente. Das Auftreten der Aggregate in Astrogliazellen ist durch Pfeile markiert. D, Dura mater. A, Arachnoidea. P, Pia mater. Balken, 25 μ m. B, zeigt die dichten Aggregate in den Astrogliazellen in großer Vergrößerung (Sterne) und die völlig intakten Myelinscheiden der Nervenzellaxone, sowie die unveränderte Zellmorphologie der restlichen Zellen im optischen Nerven. Balken, 1,5 μ m

Die Ultrastrukturanalyse ist in Abb. 4-38 dargestellt. In der Gesamtübersicht zeigte sich der optische Nerv makroskopisch in seiner Morphologie und Anatomie unverändert. Der optische Nerv ist als Fortsatz des Gehirns von drei Hirnhäuten umgeben, der Dura mater, der Arachnoidea und die durch einen Zwischenraum getrennte Pia mater, die in den *Vim Δ C2B* Mäusen keine Auffälligkeiten durch eventuelle Vergrößerung des optischen Nerven zeigten (Abb. 4-38 A). Die Axone der Nervenzellen zeigten ebenfalls keine veränderten Strukturen und waren durch Schwannsche Zellen deutlich myelinisiert (deutlich durch die dunklen Ringe um die Axone sichtbar).

Überraschenderweise zeigten sich in den älteren *Vim Δ C2B* Mäusen aber Aggregate in den Astrozyten des optischen Nerven, die in der Immunfluoreszenz jüngerer Tiere noch nicht beobachtet werden konnten. Trotz diese erheblichen Proteinakkumulationen hatten die

Astrozyten eine völlig intakte Morphologie. Auch eine Vergrößerung ihrer Zellmasse konnte nicht eindeutig bestimmt werden. Morphologisch führen demnach die aktivierten Astrozyten im optischen Nerv zu keiner Veränderung. Auch scheinen die Aggregate keine pathologische Folgen in diesem Gewebeverbund hervorzurufen. Weitere biochemische und funktionelle Versuche sind noch erforderlich um diese Fragen zu klären.

4.2 Mutationsscreening zur Analyse von Patienten mit congenitalen Katarakten

Im Hinblick auf die etablierte Beteiligung von GFAP an der Alexander'schen Krankheit, lässt das Vorkommen der Vimentin Aggregaten in transgenen Mäusen den Schluss zu, dass Vimentin Mutationen an humanen Erkrankungen der Linse oder der Retina beteiligt sein können. Ziel war es ein „Screening“ auf der Basis von denaturierender Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (DHPLC-Analyse) zu etablieren um Mutationen in Exons des Vimentin-Gens zu finden.

Zum „Screening“ des Vimentin Gens wurden 10 PCR-Reaktionen mit spezifischen Primern etabliert die in Abb. 4-40 in der Tabelle zusammengefasst sind. Die spezifischen Primer umklammern je ein Exon des Vimentin Gens, wobei ihre Lage bewusst in die Intron Sequenzen gelegt wurde um keine Informationen zu verlieren. Die Spezifität der entstandenen PCR-Produkte wurde durch Gelelektrophorese dokumentiert und durch Datenbank-Sequenzanalyse auf mögliche weitere unspezifische Bindungsstellen hin überprüft. Somit wurde für die neun codierenden Exons des Vimentin Gens, zehn PCR Reaktionen für das Mutationsscreening erfolgreich etabliert.

Nr.	Name	Sequenz	PCR-Produkt (bp)	PCR Annealing-Temp
1	Ex1.1 for2	GAGGGGACCCTCTTTCCTAAC	499	61°C
	Ex1.1 rev	TCTTGAACCTCGGTGTGATGG		
2	Ex1.2 for	CAGGACTCGGTGGACTTCTC	357	66°C
	Ex1.2 rev	CGAGGCCAGCTACTTGCAAT		
3	Ex2 for	GAGCGAATACGTGGTGTGTTG	171	61°C
	Ex2 rev	TGCGAGTGGGAAGAGACTTA		
4	Ex3 for	CCTCCATGCTCTCTTTTCTC	157	66°C
	Ex3 rev	TCATTCCCGAAGTCACTC		
5	Ex4 for	GCTGACCGTCTGCTGTCTCTT	218	66°C
	Ex4 rev	GTTGAAGCCGCACTGATTGG		
6	Ex5 for	ACTGCTCTTCCCTGGCTTT	294	66°C
	Ex5 rev	CCCTCTTTTACTGCAGGGTTG		
7	Ex6 for	GGAACAGCTGGGTTTTCTG	357	61°C
	Ex6 rev	TGACACTGCTTAGAGCCAGT		
8	Ex7 for	TCCAGTGGTTGAAGTATTG	169	61°C
	Ex7 rev	TGCTTTGACATAAACACAGTGG		
9	Ex8 for	TCATTTTGGCCTGTTGTTT	234	61°C
	Ex8 rev	GCATGAATGAAACCTGAACT		
10	Ex9 for	GTCTTTGGCATGTGGCATTAT	465	59°C
	Ex9 rev	AGGACCAAGTAGAGAATTGTT		

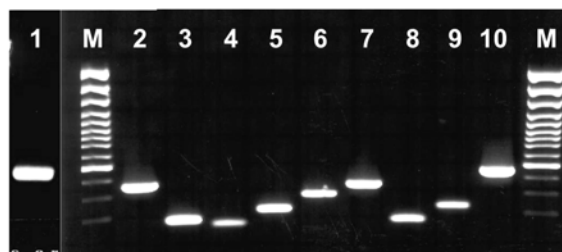


Abb. 4-40 Amplifikation von Exons des humanen Vimentin Gens

Für das humanen Vimentin-Gen wurden 10 PCR-Reaktionen etabliert, die die gesamten Exon bereiche des Gens abdeckten. Exon 1 wurde aufgrund seiner Größe in zwei Reaktionen unterteilt (Nr.1 und 2). Die entsprechenden Primer zur Amplifikation sind in der Tabelle angegeben und wurden nach dem Exon benannt, mit dem sie sequenzhomolog sind. Entstehende Fragmentgrößen und Anlagerungstemperaturen der PCR-Reaktionen sind angegeben. Alle Reaktionen wurden nach folgendem Temperaturprofil durchgeführt. Denaturierung: 95°C, 30 sec. Anlagerung: variabel °C, 30 sec. Verlängerung: 72°C, 30 sec. Im Ansatz befanden sich 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1,25 mM MgCl₂, 250 µM dNTPs, 0,5 µM Primer, 1 U Taq-Polymerase und steriles Wasser. Nur Reaktion Nr.10 enthielt 1,66 mM MgCl₂. Zyklenanzahl 35. Die Gelelektrophorese zeigt den Auftrag der amplifizierten DNS-Fragmente mit genomischer DNS als Matritze. Die Fragmentgrößen im Agarosegel entsprachen den errechneten Größen der Sequenzanalysen und zeigten eine einzige spezifische Bande. Somit konnte das Mutationscreening mit den vorgegebenen Primern durchgeführt werden. M. Marker, 100bp-Leiter.

4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit

Um neue Einblicke in die Funktion von Vimentin *in vivo* zu erhalten, wurde in dieser Arbeit eine Strategie gewählt, die erstmals zur Identifizierung von Keratin Mutationen in Epidermolysis bullosa simplex (EBS) und GFAP Mutationen in der Alexander'schen Krankheit beitrug (Li et al., 2002; Messing et al., 1998; Vassar et al., 1991). Dabei wurde in dieser Arbeit der endogene Vimentin-Promotor benutzt, um gewebsspezifische, native Genexpression von dominant-negativ wirkenden Transgen zu erreichen, die die Identifizierung verschiedener Vimentin Funktionen ermöglichte. Obwohl das Transgen in

allen mesenchymalen Zellen der endogenen Vimentin Expression folgte und auch Aggregate bildete, konnte eine offensichtliche Pathologie nur in Linsenfasern des Auges beobachtet werden. Zudem wurde die Stressaktivierung der Astroglia in der Retina und dem optischen Nerv, analog zur Zellantwort in reaktiver Gliose von transgenem Vimentin induziert. Die Aggregationen in den differenzierten Linsenfasern hatte die vermehrte Bildung und die Kolo-kalisation von dem Chaperon Hsp70 zur Folge, was die Induktion einer Stressantwort unterstreicht. Im Gegensatz zu bisher bekannten humanen IF-Erkrankungen, die durch stetige Proteinakkumulationen hervorgerufen werden, wie z.B. Desminopathien und die Alexander'sche Krankheit, konnte in den transgenen Mäusen zum ersten Mal der Abbau von aggregiertem Protein *in vivo* gezeigt werden. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen zur Dynamik von mutierten Keratinen in Zellkulturexperimenten oder Untersuchungen an Polyglutamin-Einschlußkörperchen (Kim et al., 2002; Werner et al., 2004). Zudem konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Expression eines mutierten IF-Proteins eine Hochregulierung von GFAP auf transkriptioneller Ebene induziert und dies wahrscheinlich über den JAK/Stat-Signalweg moduliert wird.

5. Diskussion

Vimentin ist ein in der Evolution hochkonserviertes Protein und wird im Säuger mannigfaltig in allen Geweben mesenchymaler Herkunft exprimiert. Trotzdem ist seine spezielle Funktion in der Entwicklung und in den Geweben noch weitgehend unverstanden. Überraschenderweise konnte bis dato noch keine Verbindung von Vimentin zu humanen Erkrankungen, wie schon für andere Intermediärfilamente gezeigt, hergestellt werden (Colucci-Guyon et al., 1994; Herrmann et al., 2004). In dieser Arbeit konnte in einem Tiermodell zu ersten Mal gezeigt werden, dass in vielen Zellen und Geweben exprimiertes Vimentin als Folge einer Mutation nur in wenigen Geweben zu pathologischen Veränderungen führt. Die Expression von mutiertem Vimentin führte außerdem zu erhöhter Expression von GFAP in reaktiven Müller-Zellen der Retina durch Relokalisation des Transkriptionsfaktors Stat3. Damit wird zum ersten mal ein Zytoskelettprotein mit der Modulation von Genexpression verknüpft.

5.1 Vimentin und seine Funktion in der Embryonalentwicklung

Entgegen früherer Studien an transgenen Mäusen verschiedener IF (Gomi et al., 1995; Li et al., 1996; Sullivan et al., 1999), weisen neuere Studien die durch Expression dominant negativer Mutationen zu Filamentverlust von IF-Proteinen oder zum Verlust von IF innerer Epithelien führen, auf eine essentielle Bedeutung von IF für die Embryonalentwicklung hin (Hesse et al., 2000).

Der Phänotyp der Vimentin null Maus legte die Vermutung nahe, dass Vimentin keine besondere Rolle in der Embryonalentwicklung spielt (Colucci-Guyon et al., 1994). Andererseits ist Vimentin das einzige Intermediärfilament-Protein ohne gewebsspezifische Zuordnung und wird in vielen Geweben des Embryos exprimiert. Somit geben die differentielle Expression und sein frühes Vorkommen an Tag E8 Hinweise auf die mögliche Bedeutung von Vimentin für die Entwicklung.

Wie Copp zeigte, gibt es während der Embryonalentwicklung der Maus nur wenige kritische Ereignisse die zur Unterbrechung der Entwicklung mit embryonaler Letalität führen (Copp, 1995). Dazu gehören die Formierung der Blastozyste, ihre Implantation, die Entwicklung einer Dottersack-Plazenta, die Herstellung eines primitiven Kreislaufes inklusive Blutbildung und funktionellem Herz, sowie die Ausbildung einer funktionellen Plazenta. Diese Ereignisse können Funktionsstörungen in intraembryonalen oder extraembryonalen Geweben zugeordnet

werden. Zudem lassen sich die Zeitpunkte des Todes im Uterus in drei Entwicklungsfenster einteilen, während der Implantation, während der Organogenese und während der fötalen Periode. Die Vimentin Expression beginnt in der Mitte der Schwangerschaft in Myotomzellen, Myoblasten und in Stammzellen des Neuroepitheliums (Franke et al., 1982) und beginnt somit in der Organogenese. Eine Mortalität durch Expression von mutiertem Vimentin in der ersten Phase der Embryonalentwicklung nach der Einteilung von Copp ist demnach auszuschließen. Daneben wird Vimentin in den Zellen des parietalen Endoderms von E8,5 bis E13,5 zusätzlich zu Keratinen exprimiert, was mit der gesteigerten Motilität durch verminderten Zell-Zell-Kontakt und der Fähigkeit dieser Zellen nach der Trennung vom Epithel zu bestehen, in Verbindung gebracht wird (Lane et al., 1983).

Von entscheidender Bedeutung in der zweiten Phase der Embryonalentwicklung ist das Herz und die Blutbildung im Dottersack, die zur Etablierung eines einfachen Blutkreislaufes führen. Bleibt dieser aus, stirbt der Embryo an Unterversorgung mit Nährstoffen. Unter diesem Aspekt könnte ein weiterer Hinweis für eine distinkte Rolle in der Entwicklung von Geweben oder in der Differenzierung das temporäre Vorkommen von Vimentin in Vorläuferzellen des hämatopoetischen System sein (Dellagi et al., 1983; Eliasson et al., 1999). Zudem wandern die blutbildenden Zellen zu diesem Zeitpunkt in zwei Wellen an Tag E9 und E10 aus dem Dottersack in die embryonale Leber ein, wobei die Störungen der Blutbildung in der Leber zu embryonaler Letalität führen. Eine Störung dieser Prozesse durch mutiertes Vimentin ist hier vorstellbar.

Außerdem konnte in Promotorstudien gezeigt werden, dass Vimentin 20 Sequenzmotive in seinem Promotor enthält, die homolog zu Sequenzmotiven in Promotorelementen von Genen sind, die Transkriptionskontrolle und Proliferation regulieren. Dabei konnte eine Induzierung des Vimentin Gens durch Wachstumsfaktoren gezeigt werden, die z.B durch die AP1/Jun Bindestelle vermittelt werden (Paulin et al., 1990; Rittling and Baserga, 1987). Vermutlich ist eine entscheidende Funktion von Vimentin in der Embryogenese die Modulation der Viskoelastizität der Zellen durch Remodulierung des Zytoskeletts (Duprey and Paulin, 1995), wie es schon bei der Zirkulation von T-Lymphozyten gezeigt wurde (Brown et al., 2001). Dies ist wahrscheinlich von entscheidendem Vorteil für die Zellen in Gewebeverbänden, um Migration im Zusammenhang mit starker lokaler Proliferation, während der Entwicklung aufrecht zu erhalten.

5.2 Transgenes Vimentin in der Entwicklung und Differenzierung der Linsenfasern

Während der Entwicklung in der Differenzierung der Linsenfaserzellen wird Vimentin, wie auch die IF Proteinen CP49 und Filensin, in der Linse unterschiedlich exprimiert und ist verschieden intrazellulär lokalisiert. Dabei ist Vimentin in den proliferierenden Zellen des Epithels und in primären Faserzellen der embryonalen und juvenilen Linse basal und zytoplasmatisch lokalisiert. Mit fortlaufender Differenzierung und Längenwachstum der adulten Linsenfasern ist Vimentin jedoch dominant an der Plasmamembran assoziiert, bevor seine Verteilung in reifen Faserzellen wieder zytoplasmatisch wird. In den ältesten Zellen im Zentrum der adulten Linse ist Vimentin schließlich nicht mehr nachweisbar (Blankenship et al., 2001; Sandilands et al., 1995). Diese Modulation der Expression und Lokalisation macht eine Beteiligung von Vimentin in dem Prozess der Linsefaserelongation mehr als wahrscheinlich, in der die Faserzellen eine Population von migrierenden Zellen darstellen. Dabei verankert der Basalmembran-Komplex die Linsenfasern mit der Linsenkapsel und ermöglicht Adhäsion während der Migration der Linsenfasern. Letztendlich ist der Basalmembrankomplex strukturell an der Formgebung der posterioren Linse, durch sich von der Linsenkapsel lösende und sich untereinander neu verankernde Faserzellen, beteiligt (Bassnett et al., 1999).

In Linsenfasern sind grundsätzlich zwei unterschiedliche Membran-Adhäsionskomplexe beschrieben, die die Interaktion mit den kortikalen Zytoskelett vermitteln. Der erste besteht aus N-Cadherin und Cadherin 11 die mit α - und β -Catenin, Plakoglobin, p120^{ctn} und Vinculin assoziiert sind. Der zweite setzt sich aus Ezrin, Periplakin, Periaxin, Desmoyokin (EPPD) und Spectrin, Moesin und Plektin zusammen und befindet sich dominant an den Längsseiten der Faserzellen (Straub et al., 2003). Im Gegensatz zu den Keratin IF-Proteinen, deren Assoziation mit Desmosomen durch Mutationsstudien und deren Erkrankungen sehr gut untersucht sind, ist für Vimentin und andere IF Proteine wenig über deren Verknüpfung mit Adhäsionskomplexen bekannt (Fuchs and Cleveland, 1998; Getsios et al., 2004). Dennoch gibt es Hinweise aus Zellkulturmodellen, die einige Adhäsionskomplex-Protein-Interaktionen mit Vimentin vorschlagen. So wird in Fibroblasten eine Verknüpfung von Vimentin über p120^{ctn} mit N-Cadherin postuliert (Kim et al., 2005). Außerdem konnte eine Assoziation von Vimentin mit Plakoglobin und Desmoplakin zu VE-Cadherin in Endothelzellen nachgewiesen werden (Kowalczyk et al., 1998; Lampugnani and Dejana, 1997).

In zahlreichen Mutationsstudien von desmosomalen Proteinen konnte gezeigt werden, dass diese nicht nur die Integrität der Desmosomen störten, sondern auch die assoziierten Keratinzytoskelette strukturell beeinflussten (Fuchs and Cleveland, 1998; Vasioukhin et al.,

2001). Unter diesem Aspekt ist eine Verringerung der Assoziation des Vimentin-Zytoskeletts mit Adhäsionskomplexen in VimR₁₁₃C und VimΔC2B Mäusen denkbar, die letztendlich zu der dorsalen Kapselruptur bei den Linsen führte. Immunfluoreszenzanalysen zeigen eine unveränderte Lokalisation von Plektin und Aktin, was gegen eine direkte Schädigung der Adhäsionskomplexe und der Verbindung zum Aktinzytoskelett spricht. Dennoch reichen diese Komponenten nicht aus, um die mechanische Stabilität der Linse aufrecht zu erhalten. Dies zeigte sich insbesondere in der Ultrastrukturanalyse transgener Linsen, die extrem gefaltete Plasmamembranen und eine stark verminderte Interaktion der dorsalen Linsenzellen zum Vorschein brachte. Dies verdeutlicht die essentielle Funktion von Vimentin für den Membran-Adhäsionskomplex und die Zytoskelett-Interaktionen, die letztendlich die Struktur von Faserzellen in der Linse aufrechterhalten.

Unter dem Gesichtspunkt von Keratin-Erkrankungen, die meist eine Folge von mechanisch appliziertem Stress sind, rückt eine weitere Möglichkeit als Auslöser der finalen Pathologie in VimR₁₁₃C und VimΔC2B Mäusen in den Blickpunkt. Durch die Akkomodation der Linse wird diese ständig mechanischem Stress ausgesetzt, der normalerweise durch den Aufbau und die Anordnung der Linsenfaserzellen kompensiert wird. Durch ihre hexagonale Struktur greifen die Linsenfaserzellen wie Zähne an den Längsseiten in einander. Dort ist auch der EPPD Komplex dominant lokalisiert, der über Plektin möglicherweise die Hauptverknüpfung mit Vimentin in Linsenzellen herstellt. Die zentrale Frage ist, welches der Filamentsysteme die mechanische Integrität der Linsenfaser unter mechanischem Stress aufrechterhält. Für das kortikale Aktin/Myosin System, welches entlang der basalen Membran-Zone der posterioren Linsenfaser angereichert ist, ist eine aktive Rolle in der Anpassung bei der Akkomodation vorstellbar. Ebenso wurde ein Beitrag für die mechanische Integrität der linsenspezifischen Intermediärfilamente CP49 und Filensin, die ein heteropolymeres distinktes Zytoskelett ausbilden, postuliert (Perng et al., 2004). Beide Filamentsysteme sind in den transgenen Mäusen intakt geblieben und unverändert lokalisiert. Trotz dieser intakten Systeme, die durch mutiertes Vimentin nicht gestört werden, ist keines in der Lage, die mechanische Integrität in der Linse zu gewährleisten. Dem Vimentin-Zytoskelett kann somit eine Schlüsselrolle in dieser Funktion in der Linse zugesprochen werden.

Möglicherweise wird die mechanische Stabilität über die Verbindung von Vimentin zu Adhäsionskomplexen und gleichzeitiger Interaktion mit dem Aktin-Filamentsystem gewährleistet. Diese Interaktion wurde in Sternzellen der Leber über die Linkerproteine Synemin, Vinculin und Talin gezeigt (Uyama et al., 2006). In VimR₁₁₃C und VimDC2B Linsen ist Synemin mit Aggregaten kolokalisiert und wird somit in der Funktion als

Brückenprotein der Zelle entzogen. Die Zerstörung der Verbindung von Vimentin mit Adhäsionskomplexen und Aktin könnte somit die posterioren Linsenfaserzellen in VimR₁₁₃C und VimΔC2B Mäusen empfindlicher gegen mechanischen Stress machen. Dies würde den temporären Verlauf der Kataraktentwicklung in den transgenen Linsen untermauern.

5.3 Weitere Ursachen der Kataraktentwicklung in transgenen Vimentin Mäusen

Um Transparenz und die homogene Struktur des Linsenkörpers zu erreichen wird eine reguläre Packung und Architektur, wie auch eine definierte zytoplasmatische Proteinexpression, Verteilung und Homogenität in Linsenfaserzellen benötigt. Mutationen in Genen die für Connexine, Membranproteinen, Kristallinen und Homeobox-Proteinen aber auch für das Intermediärfilament CP49 codieren, sind als Ursache für zahlreiche humane congenitalen Katarakterkrankungen bestimmt worden (Graw, 2004). Es stellt sich demnach die Frage, wie diese Komponenten in das in dieser Arbeit erörterte Modell der Kataraktentwicklung einzuordnen sind.

So führt z.B. die Inaktivierung des Connexin 46 Gens zu einem vermehrten Kalzium-Influx in die Faserzellen, der wiederum die proteolytische Prozessierung von γ -Kristallin stört und in seiner Aggregation endet (Baruch et al., 2001). Auch Mutationen im Bfsp2 Gen, das für das linsenspezifische Intermediärfilament CP49 codiert, führen zu Katarakten (Conley et al., 2000; Jakobs et al., 2000). Der Mechanismus der Erkrankung ist allerdings noch ungeklärt und bis jetzt im Tiermodell nicht untersucht. Die Analyse von CP49 und Filensin „knockout“ Mäusen unterstützt aber die Hypothese, dass sie für die Erhaltung der Transparenz in der Linse verantwortlich sind (Alizadeh et al., 2003; Alizadeh et al., 2002).

Um so erstaunlicher war, das CP49 und Filensin in VimR₁₁₃C und VimΔC2B Mäusen keinerlei Veränderungen aufwiesen, sondern sogar ein völlig intaktes Zytoskelettsystem ausbildeten. Die „beaded filament“-Proteine sind demnach in keiner Weise direkt in die Entstehung des Katarakts involviert. Unter dem Aspekt, dass ihnen ein entscheidender Beitrag zur Organisation der besonderen dreidimensionalen Struktur der Linse über ihre Verbindung zur Plasmamembran zugesprochen wurde, ist die Pathologie in VimR₁₁₃C und VimΔC2B transgenen Linsen um so überraschender (Kuszak et al., 2004; Sandilands et al., 2004). Ein intaktes „beaded-filament“-Gerüst war demnach nicht fähig die dreidimensionale Membranorganisation aufrecht zu erhalten und weist ihnen in dieser Funktion eine neue untergeordnete Rolle zu.

5.4 Kristalline und ihre Bedeutung in Katarakterkrankungen

Kristalline sorgen in der Linse durch Bildung einer hochkonzentrierten, homogenen Lösung in den Faserzellen für die optische Transparenz. Zudem sind sie durch ihre Chaperonaktivität an der Modulation der Linsenproteine beteiligt. Somit üben sie eine Art Kontrollfunktion gegen Proteinschädigung in der Linse aus, die sonst durch den stark verminderten Stoffwechsel der Zellen nicht kompensierbar wäre (Sun and MacRae, 2005). Mutationen in humanen und murinen γ -Kristallinen führten zu Aggregation dieser und deren Akkumulation in Zellkernen der primären Linsenfaserzellen. Möglicherweise aufgrund der veränderten Kernlokalisation und Deponierung von amyloiden Einschlusskörperchen, analog zu Morbus Huntington, kann sich demnach ein Katarakt entwickeln. In $VimR_{113C}$ und $Vim\Delta C2B$ Mäusen konnte keine derartigen Veränderungen in der Differenzierung von primären Linsenzellen gefunden werden, was diesen Mechanismus für die Kataraktentwicklung in Vimentin transgenen Linsen unwahrscheinlich macht.

Andere Kristalline, wie αA -Kristallin und αB -Kristallin, sind eng mit dem Zytoskelett von Intermediärfilamenten assoziiert. Zudem wird eine regulatorische Funktion in der Reorganisation von Vimentin postuliert, die auf dem beobachteten Einfluss von Kristallinen auf die Löslichkeit von Vimentin *in vitro* basiert (Nicholl and Quinlan, 1994). In der Tat führen Mutationen von αB -Kristallin zu Katarakten in der Linse und Myopathie, die phänotypisch Ähnlichkeit zu Desminopathien aufweist. Diese Pathologie ist Folge von cytoplasmatischen Proteinaggregationen, die aus IF-Protein und αB -Kristallin bestehen und zeigt die enge Wechselwirkung der Proteine und ihre Fähigkeit zu gegenseitiger Modulation (Litt et al., 1998; Vicart et al., 1998). In Aggregaten der $Vim\Delta C2B$ und $VimR_{113C}$ Mäusen konnte allerdings keine Kollokalisierung mit αB -Kristallin detektiert werden, was einerseits für einen αB -Kristallin unabhängigen Mechanismus der Pathologie spricht und andererseits keine Evidenz für die Einflussnahme zur Modulation von mutierten Proteinaggregaten aufweist. Zudem ist zu erwähnen, dass Mutationen im αB -Kristallin-Gen zu polaren Katarakten führt, während mutiertes Vimentin ein hauptsächlich posterioren Katarakt verursacht.

5.5 Vimentin Aggregate und ihre transiente Natur in Linsen transgener Mäuse

In Genen, die für andere Typ III Intermediärfilamentproteine neben Vimentin codieren, sind eine Reihe von Mutationen gefunden worden, die zu gestörtem Proteinassembly führen, welche letztendlich Auslöser einer humanen Erkrankung sind. Dies wurde z.B. für zahlreiche

Mutationen in Desmin als Auslöser von Desminopathien gezeigt (Omary et al., 2004). Ebenso konnten Mutationen in GFAP-Gen als Ursache der Formierung von Rosenthal-Fasern in Glia-Zellen identifiziert werden, die zu der neuropathologischen Alexander'schen Erkrankung führen (Messing and Brenner, 2003). Das Fortschreiten der Krankheit wird dabei von der Anhäufung der Proteinaggregate begleitet.

In VimR_{113C} und VimΔC2B Mäusen ist die Entwicklung der Pathologie ebenfalls in der Entwicklung zeitabhängig und korreliert mit der Zunahme der Aggregation des mutierten Vimentin Proteins in den Linsenfaserzellen vom Neugeborenen zum adulten Tier. Überraschenderweise zeigte sich jedoch ein Abbau der Aggregate innerhalb des Systems Linse, von jungen zu alten Linsenfäsern. Dies ist besonders bemerkenswert, wenn man die stark verminderte Metabolismusrate in den reifen Linsenzellen berücksichtigt, die zu diesem Zeitpunkt alle Organellen, Zellkerne und sonstigen Zellbestandteile abgebaut haben. Unter diesem Gesichtspunkt konnte aber keine höhere Metabolismusrate in den VimR_{113C} oder VimΔC2B Mäusen durch mögliche erhöhte Zellproliferation gefunden werden, wie die Ki67 Analyse zeigte. Zudem gibt es keine Hinweise für eine erhöhte Halbwertszeit des transgenen Vimentin-Proteins, was in Pulse-Chase-Markierungsexperimenten in stabil transfizierten 3T3-L1 Zellen untersucht wurde. Dabei wurde sowohl für Wildtyp Vimentin, als auch für VimR_{113C} eine Halbwertszeit von etwa 10 Stunden ermittelt (K. Böhse, persönliche Mitteilung).

5.5.1 Die Bedeutung von Proteasen in der Linse transgener Mäuse

Die terminale Differenzierung der Linsenfäsern erfolgt unter dramatischer Umorganisation ihrer Zellkompartimente und dem Abbau der Organellen oder der Umorganisation des Chromatins. Daran sind eine Reihe verschiedenster Proteasen beteiligt, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Differenzierung aktiv sind und bei veränderter Funktion zu Katarakten führen können (Wride et al., 2006).

Der Abbau der Organellen sowie die Degradation der Zellkerne, mit Chromatinkondensation und DNS Fragmentierung zeigen Ähnlichkeiten mit Prozessen in der Apoptose (Bassnett, 2002; Dahm, 1999). Dennoch scheinen Linsenfäserzellen die Apoptose nur in abgemilderter Form zu durchlaufen, bleiben doch das Zytoskelett und die Zellen an sich erhalten (Bassnett and Beebe, 1992). Als Gemeinsamkeit bleibt allerdings das Involvieren von Caspase-3, -6 und -7 Aktivität. Zudem konnte gezeigt werden, dass Aktivierung von Caspasen, wie auch lokal verminderte Aktivität in der Linse, zu Katarakten führen kann (Andersson et al., 2003;

Wei et al., 2004). Vimentin ist ebenfalls ein Zielprotein für die proteolytische Spaltung von Caspasen. Damit könnte ein möglicher Mechanismus analog zur Kataraktentwicklung in Connexin46 defizienten Mäusen in *VimR_{113C}* und *VimΔC2B* Mäusen zur Pathologie beitragen (Baruch et al., 2001; Yin et al., 2001). Dennoch konnte keine veränderte Caspaseaktivität in den transgenen Mäuselinsen festgestellt werden. Mutiertes Vimentin als Caspasesubstrat scheint in dieser Konstellation keine Auswirkung auf die Caspaseaktivität und somit indirekt als Aktivator von Apoptose in der Linse zu haben. Dies steht im Einklang mit neusten Untersuchungen von Caspase-3 und -6 defizienten Mäusen, die auf keine relevante Funktion dieser Proteasen für den Organellabbau in der Linse hinwiesen (Zandy et al., 2005). Dennoch zeigte sich, das analog zu Ergebnissen in Linsenepithelzellen (Andersson et al., 2000), die Blockierung des Proteasoms in *VimR_{113C}* Fibroblasten die Caspaseaktivität erhöht und durch die Toxizität der Aggregate vermehrt Apoptose induzierbar ist.

5.5.2 Das Ubiquitin/Proteasom-System und seine Bedeutung in der Linse transgener Mäuse

Ein weiter möglicher Abbauweg für Vimentin Aggregate in der Linse ist das Ubiquitin/Proteasom-System. Außerdem ist die Bedeutung des Proteasoms in der Linse bekannt und wird vermutlich kalziumabhängig reguliert (Petersen et al., 2004). In Proteasomenaktivitäts-Assays von Linsen wurde eine Verbindung von verminderter Proteasomenaktivität und Entwicklung von Katarakten hergestellt (Zetterberg et al., 2003). Letztere steht im Gegensatz zu den Ergebnissen in *VimR_{113C}* und *VimΔC2B* Linsen, für die eine erhöhte Proteasomenaktivität ermittelt werden konnte. Dies zeigt deutlich, dass die Entwicklung des Kataraktes in Vimentin transgenen Mäusen einem anderen Mechanismus folgt und klärt gleichzeitig den Abbauweg der Aggregate in den Faserzellen auf.

Des weiteren ist die transiente Natur von Intermediärfilament-Aggregaten im Zellkulturmodell gezeigt worden (Werner et al., 2004). Die dominant negativ wirkende Punktmutation K14R_{125C}, die der *VimR_{113C}* Mutation entspricht, führte zur Ubiquitinierung des Keratin 14, induzierte Phosphorylierung der stressaktivierten Kinase c-Jun und zu einer „unfolded protein response“ in HaCaT-Zellen (Yoneda et al., 2004). Ähnliche Stressantworten in den *VimR_{113C}* Protein exprimierenden Linsenzellen und im Zellkulturmodell wurden deshalb ebenfalls erwartet. Tatsächlich konnte in beiden Modellen die Kolokalisation von Hsp70 und *VimR_{113C}* Aggregaten beobachtet werden. Daneben ist eine c-Jun-Kinase-Aktivierung in *VimR_{113C}* exprimierenden Zellen vorhanden (Schietke, Diplomarbeit 2005).

Dies zeigt die Induktion einer Stressantwort des mutierten VimR₁₁₃C und ist zusammen mit der erhöhten Proteasomenaktivität die Hauptursache für die transiente Struktur der Aggregate und trägt somit vermutlich zur fortschreitenden Linsenpathologie bei.

5.6 GFAP kompensiert die Vimentin Aggregation im Linsenepithel transgener Mäuse

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die geringe Expression von VimR₁₁₃C und Vim Δ C2B zu Aggregatbildung in den Linsenfaserzellen führt und in einem temporalen Prozess die juvenile Kataraktentwicklung in der Linse verursacht. Erstaunlicherweise konnte die Akkumulation des transgenen Proteins nur in differenzierten Faserzellen der Linse beobachtet werden. Ebenfalls mutiertes Vimentin exprimierende Zellen des Linsenepitheliums blieben verschont. Eine Besonderheit dieser Zellen ist die Expression von GFAP (Hatfield et al., 1984). Da das Linsenepithel ektodermaler Herkunft ist, sind dies die einzigen bekannten nicht neuronalen Zellen, die GFAP als weiteres Zytoskelettprotein neben Vimentin exprimieren, wobei die Funktion für das Epithel noch nicht verstanden ist.

In den transgenen Mäusen konnte eine starke Zunahme der GFAP Expression festgestellt werden, die eine mögliche Ursache für das Fehlen von Vimentin Aggregaten sein kann. Vimentin wird in der transgenen Linse im Vergleich zu GFAP, basierend auf Western-Blot Daten, nur in geringen Mengen synthetisiert. Zudem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es für mutiertes VimR₁₁₃C und Vim Δ C2B grundsätzlich möglich ist, in das intakte endogene Vimentin Filamentsystem assimiliert zu werden. Dadurch, dass Vimentin und GFAP Heteropolymere ausbilden können, ist aufgrund der Basis der starken Überexpression von GFAP ein kompensatorischer Dosiseffekt wahrscheinlich, der aus dem Einbau in das GFAP Zytoskelett basiert (Pekny and Pekna, 2004). Dies entspricht der natürlichen *in vivo* Situation in Astrozyten, in denen GFAP das dominante IF-Protein in der Ausbildung von heteropolymeren Zytoskeletten ist (Eliasson et al., 1999). Die Bildung von Aggregaten ist demnach vom Verhältnis des transgenen Proteins zu endogenem Protein abhängig, wobei der Assemblypartner von transgenem Vimentin sowohl endogenes Vimentin als auch GFAP sein kann.

Der in dieser Arbeit beschriebene Dosiseffekt des transgenen Vimentins wird durch die Immunfluoreszenzanalysen des optischen Nerven gestützt. Auch in den Astrozyten des optischen Nerven konnte in der Immunfluoreszenz keine offensichtliche Aggregation von Vimentin festgestellt werden. Gleichzeitig, als Reaktion auf die transgene Vimentin Expression, war auch hier die GFAP-Expression stark induziert. Ebenso konnte eine

vermehrte endogene Vimentin-Expression beobachtet werden. Die vermehrte Bildung der Intermediärfilamente Vimentin, GFAP und auch Nestin sind ein Zeichen für die Aktivierung von Astrozyten in der Stressantwort. Die kompensatorische Wirkung von großen Mengen endogenem Vimentin oder GFAP auf geringe transgene Proteinmengen wird von *in vitro* Daten aus Viskosemetrie-Experimenten gestützt. Für Mengenverhältnisse im Versuchsaufbau von 10% VimR_{113C} zu 90% VimWt konnten dabei nur geringe Auswirkung auf die Filamentbildung festgestellt werden (Schietke et al., 2006).

Zudem enthält das Linsenepithel die einzigen undifferenzierten, proliferierenden Zellen in der Linse. Damit geht eine erhöhte Metabolismusrate einher, die vermutlich die starke Akkumulation des Transgens abwendet und somit Folgedefekte verhindert. Dies ist möglicherweise auch die Erklärung für die auf alte differenzierte Zellen der Linse beschränkte, morphologische Pathologie in den transgenen Tieren.

Unter dem Aspekt, dass Intermediärfilamentproteine in löslicher und filamentöser Gestalt vorkommen, zeigt die transiente Struktur der mutierten Aggregate, dass ein vorhandenes endogenes Filamentsystem teilweise fähig ist mutiertes Protein in das System zu integrieren und gleichzeitig Abbau durch das Proteasom und vermutlich Rückfaltung durch Chaperone vollzogen werden. Persistierende Aggregate, die am Ende zur Pathologie führen, bilden sich demnach durch mengenabhängige Expression zu bestimmten Zeitpunkten in der Differenzierung der Linsenfasern, die durch die Stressantwort der Linsenfasern nicht mehr kompensiert werden können.

5.7 Vimentin Aggregate in Gliazellen und die Regulation der GFAP Expression

Eine Reihe von Retina-Erkrankungen sind mit reaktiver Gliose assoziiert, die mit Aktivierung von Müller-Zellen und Astrozyten verbunden ist. Reaktive Gliose hat verschiedene Ursachen und wird durch Ablösung der Netzhaut, Photorezeptorschädigung, Ischämie oder Traumata induziert. Begleitet wird dies intrazellulär durch Herunterregulation von p27^{Kip1} und vermehrter Expression von GFAP und Vimentin (Bringmann and Reichenbach, 2001; Dyer and Cepko, 2000; Fan et al., 2005; Sriram et al., 2004). Müller-Zellen bilden das Stützkorsett innerhalb der Netzhaut. Außerdem regulieren sie die Ionenkonzentration im Extrazellulärraum. So werden unter anderem die von den Bipolarzellen abgegebenen Kalium-Ionen von den Müller-Zellen aufgenommen. In unstimulierten Müller-Zellen ist GFAP in den Endfüßchen angereichert und vermittelt dort mechanischen Schutz zum Glaskörper

(Lundkvist et al., 2004). In *Vim Δ C2B* Mäusen, die Vimentin Aggregate im Zellkörper der Müller-Zellen aufwiesen, kam es zu einer starken Aktivierung dieser Glia, dokumentiert durch die erhöhte Expression und Relokalisation von GFAP. Diese Aktivierung war durch Expression und Relokalisation von Stat3 in den Nukleus begleitet, was das erste Beispiel für eine Änderung des Transkriptions-Profiles in einem distinkten Zelltyp durch eine Mutation in einem IF-Protein darstellt.

Es stellte sich die Frage, ob dieses Signal extrinsischer Natur ist und durch die Schädigung der Linse hervorgerufen wurde. So wurde gezeigt, dass die Schädigung der Linse die Regeneration von retinalen Ganglionzellen unter Aktivierung von Müller-Zellen *in vivo* positiv beeinflussen kann (Lorber et al., 2005; Wong et al., 2006). Welche Faktoren diesen Reiz auslösen ist allerdings noch nicht geklärt. Somit wäre die Stressantwort der Gliazellen eine indirekte Reaktion auf die Pathologie der Linse in *VimR₁₁₃C* und *Vim Δ C2B* Mäusen.

Eine Beziehung zwischen Linsenpathologie und Aktivierung von Müller-Zellen konnte aber in transgenen Mäusen nicht beobachtet werden. Vielmehr zeigte sich nur dann eine erhöhte GFAP Expression in den Gliazellen der Retinae transgener Mäuse, wenn auch Vimentin Aggregationen beobachtet werden konnten. Ebenso zeigt die im Western-Blot detektierte Überexpression von Stat3 in *VimR₁₁₃C* und *Vim Δ C2B* exprimierenden Fibroblasten, dass mutiertes Vimentin selbst durchaus die Stat3 Aktivierung und damit die GFAP Expression intrinsisch beeinflussen kann. Dies steht in Korrelation mit Ergebnissen aus *VimR₁₁₃C* exprimierenden Zellen, die nach Induktion von Stress vermehrt MAP-Kinase Aktivität zeigten (Schiecke, Diplomarbeit, 2004). Möglicherweise moduliert Vimentin die Transkription von GFAP indirekt über den MAP-Kinase Signalweg.

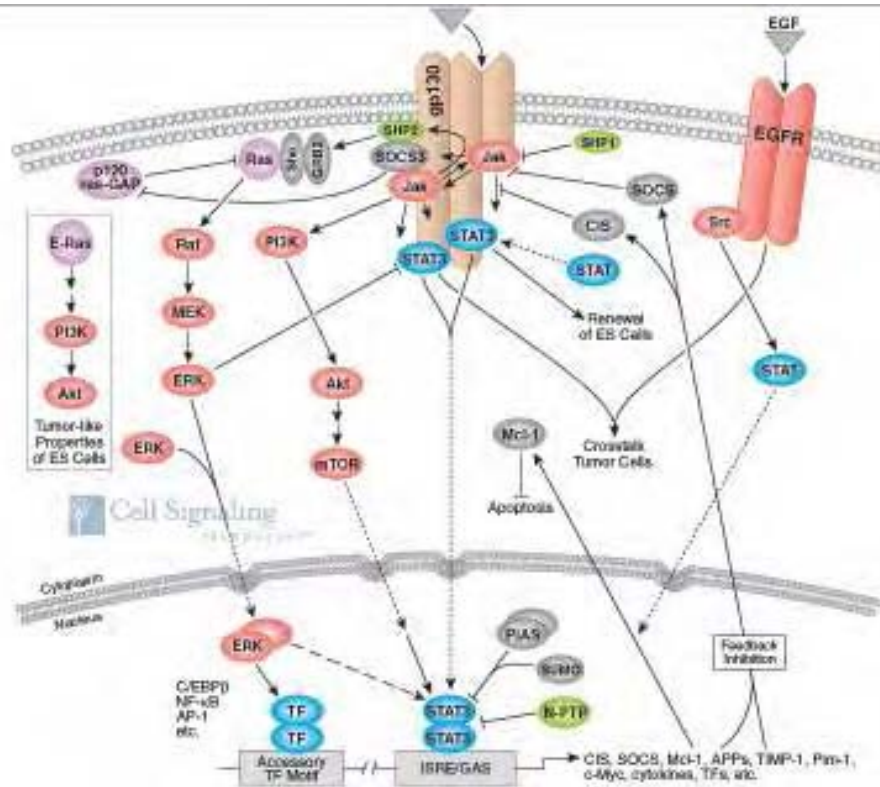


Abb. 5-1 Jak/Stat Signalweg

Stat3 ist ein Schlüsselsignalmolekül für viele Zytokine und Wachstumshormonrezeptoren. Ebenso ist Stat3 in verschiedenen humanen Tumoren konstitutiv aktiviert und besitzt onkogenetisches Potential und anti-apoptotische Aktivität. Stat3 wird über die Phosphorylierung an Tyr705 aktiviert, was zur Dimerisierung und seiner Translokation in den Nukleus führt. Dort bindet Stat3 als Dimer an spezifische DNS-Sequenzen im Promotor und aktiviert somit im Zusammenspiel mit anderen Transkriptionsfaktoren seine Zielgene, wie z.B. GFAP. Postuliert wird seine Eigenschaft zur transkriptionellen Aktivierung von Zielgenen durch Phosphorylierung an Ser727 über den MAPK- oder mTOR-Signalweg. Modifiziert nach www.cellsignal.com.

Eine weitere Interaktion von Vimentin mit diesem Signalweg wird darüber hinaus durch Raf-Kinase geknüpft, die Vimentin-Phosphorylierung durch die Aktivierung von noch nicht spezifizierten Vimentin-Kinasen steuert (Janosch et al., 2000). Vorstellbar ist eine, als Reaktion auf mutiertes Vimentin, hervorgerufene erhöhte MAP-Kinase Aktivität, die wiederum die Expression von GFAP über Erk und Stat3 aktiviert.

In den reaktiven Müller-Zellen der *Vim Δ C2B* Mäuse konnte nicht nur eine erhöhte Expression von GFAP gefunden werden, sondern auch eine Veränderung der Lokalisation von GFAP. GFAP war nicht mehr nur in den Endfüßchen lokalisiert, sondern im gesamten Zytoplasma und in Aggregaten anzutreffen. Die Lokalisation von GFAP in den Endfüßchen von unstimulierten Müller-Zellen basiert auf der Lokalisation von mRNA in dieser Zellregion und postuliert eine lokale Proteinsynthese an der Zellperipherie (Sarchy et al., 1989). Die Relokalisation von GFAP durch mutiertes *Vim Δ C2B* könnte demnach durch gestörten

Transport von mRNA in die verschiedenen Zellkompartimente hervorgerufen sein. Dies steht in Einklang mit neuen Ergebnissen zur Beteiligung von Vimentin in Transportvorgänge der Zelle, die eine aktive Beteiligung von löslichem Vimentin am Transport von MAP-Kinasen in Neuronen postulieren (Helfand et al., 2005; Perlson et al., 2005).

Die Aktivierung der Müller-Zellen durch GFAP-Überexpression, die eine spezialisierte Form von Astrozyten sind, stellt die Frage nach der grundsätzlichen Stress-Aktivierung von Vimentin exprimierender Astroglia und die Vergleichbarkeit mit der Aktivierung in der reaktiven Gliose. Für Astrozyten im optischen Nerv von VimR_{113C} und Vim Δ C2B konnte eine generelle Aktivierung gezeigt werden. Allerdings blieben die in der reaktiven Gliose, nach Schädigung des ZNS oder des optischen Nerven, bekannten morphologischen Veränderungen der Zellen aus. Die Hypertrophie der Gliazellen konnte weder für Astrozyten der Retina noch für Astrozyten des optischen Nerven gezeigt werden. In Vimentin/GFAP defizienten Mäusen ist die Narbenbildung nach Verletzung des ZNS, die eine direkte Folge der Wundheilung durch die reaktiven hypertrophen Gliazellen ist, stark vermindert (Pekny and Pekna, 2004). In Vimentin defizienten, aktivierten Astrozyten sind die GFAP Intermediärfilament nur in reduzierter Form vorhanden (Galou et al., 1996). Ebenso ist nach retroviraler Vimentin „antisense“-RNATransfektion in Astrozyten oder das Ratten-ZNS, die GFAP Hochregulierung nach Verletzung ausgeblieben und die Proliferation der Astrozyten verlangsamt (Lin and Cai, 2004).

Anscheinend bedarf es intakter Vimentin Filamente in Gliazellen um die reaktive Gliose in bekannter Form zu durchlaufen. In VimR_{113C} und Vim Δ C2B Mäusen stört vermutlich mutiertes Vimentin Protein trotz der Aktivierung von GFAP, die Funktionen der Intermediärfilamente und somit teilweise die intrazellulären Prozesse der reaktiven Gliose.

6 Ausblick

Die Vimentin transgenen Mäuse sind Ausgangspunkt zahlreicher anderer sich anschließenden Experimente, die zur Entschlüsselung der Funktion von Vimentin *in vivo* durchgeführt werden.

Zahlreiche Mutationen in Genen, die für verschiedenste Intermediärfilamentproteine codieren, führen zu humane monogenetische Erkrankungen, wie Hauterkrankungen, Desminopathien, neurodegenerativen Erkrankungen und Laminopathien (Magin et al., 2004). Erstaunlicherweise konnte bis jetzt Vimentin noch keiner humanen Erkrankung zugeordnet werden. Dies liegt möglicherweise auch an der mannigfaltigen Expression des Proteins in verschiedensten Zelltypen und damit an der Schwierigkeit einer Eingrenzung und Zuordnung in eine spezifischen Pathologie. Die in dieser Arbeit dokumentierte Pathologie in der Linse und Retina, nach Expression des mutierten Vimentin Gens, knüpft nun zum ersten mal eine mögliche Verbindung von Vimentin und genetisch bedingten Erkrankungen. Ein Mutationsscreening in Patienten mit autosomal dominanten congenitalen Katarakterkrankungen oder mit Müller-Zellen-Aktivierung assoziierten Retinopathien, könnte Aufschluss über die Beteiligung von Vimentin in diesen humanen Erkrankungen geben.

Die Expression von mutiertem Vimentin in Mäusen zeigte einen Dosiseffekt des transgenen Proteins, der vermutlich die schwere der Pathologie in der Linse und der Retina bestimmt. Ausgehend von dieser Beobachtung sollte eine genauere Analyse von VimR₁₁₃C transgenen Mäusen, die heterozygot für das Wildtyp-Allel sind, Aufschluss über die Kausalität der transgenen zu der endogenen Vimentin Proteinmenge geben. Die dafür notwendigen Mauslinien sind durch die Kreuzungen der VimR₁₁₃C Mauslinie auf den Vimentin null Hintergrund bereits vorhanden.

Die in dieser Arbeit dokumentierten Ergebnisse zur möglichen gestörten mechanischen Stabilität der Linse, aufgrund des Verlustes des Vimentin Zytoskeletts, lassen noch einige Punkte ungeklärt. Insbesondere die Proteine, die Vimentin mit Adhäsionskomplexen in der Linse verknüpfen sind noch nicht bekannt. Neuste Ergebnisse postulieren eine Verbindung von Vimentin über Synemin, Vinculin und Talin an Integrine in der Plasmamembran und gleichzeitige Quervernetzung an das Aktinfilamentsystem (Uyama et al., 2006). Zur Zeit werden diese möglichen Verbindungen in den Linsen transgener Mäuse durch Immunfluoreszenzanalysen überprüft. Die Ergebnisse werden Aufschluss darüber geben können, wie Vimentin die mechanische Integrität der Linsenfaserzellen im Organ Linse aufrechterhält.

Die Differenzierung der Linsenfaserzellen geht mit einer intensiven Degradation ihrer Organellen, Mitochondrien und Tubuli einher. Parallel degradieren die Faserzellen ebenfalls ihre Zellkerne, um die optische Funktion in der Linse zu erfüllen. Der Prozess der E nukleation ist noch nicht genau verstanden, wurde aber analog zur E nukleation bei der Differenzierung der roten Blutkörperchen mit Vimentin in Verbindung gebracht. In der Hämatopoese beginnt die Degradation der Zellkerne zeitgleich mit dem Verlust der Vimentin Expression (Dellagi et al., 1983). Zudem konnte in Mäusen, die Hühner-Vimentin in der Linse überexprimieren, eine verzögerte E nukleation gezeigt werden (Capetanaki et al., 1989). Erste Untersuchungen der Zellkerne in Linsen von VimR₁₁₃C und VimΔC2B Mäusen geben Hinweise auf eine verfrühte E nukleation. Dies lässt eine bedeutende Beteiligung von Vimentin an diesem Prozess vermuten, der möglicherweise mit der gestörten Modulation der Verankerung von Vimentin mit der Kernlamina in Zusammenhang steht, der über Nesprin3 und Plektin vermittelt wird. (Brown et al., 2001; Wilhelmsen et al., 2005). Dabei würde in VimR₁₁₃C und VimΔC2B Linsen die postulierte kontinuierliche Verbindung der extrazellulären Matrix über IF Proteine zur äußeren Kernlamina gestört sein und somit die korrekte Positionierung des Nukleus in der Zelle.

Die Aktivierung der Astrogliazellen in der Retina und des optischen Nerven scheint durch das intrinsische Signal des mutierten Vimentin verursacht zu sein. Die ultrastrukturellen Befunde zeigen jedoch keinerlei Auswirkungen auf die Anatomie oder die Morphologie der Zellen. Dennoch ist von funktionellen Effekten in der Retina und im optischen Nerv auszugehen. Eine mögliche Störung in der Stressantwort bei reaktiver Gliose ist ebenso möglich, wie durch Studien an Vimentin und GFAP defizienten Mäusen schon gezeigt wurde (Pekny et al., 1999). Wundheilungsversuche und die genaue Untersuchung der reaktiven Gliose in Vimentin transgenen Mäusen sollten deshalb weitere Aufschlüsse über die Funktion von Vimentin im Zusammenspiel mit GFAP geben können. Zudem steht ein Modellorganismus zur Untersuchung von Retinopathien, die aktivierte Müller-Zellen zeigen, zur Verfügung.

Die embryonale Letalität der VimR₁₁₃C / Vim^{-/-} Mäuse eröffnet eine völlig neue Möglichkeit zur Studie von Vimentin in der Embryonalentwicklung. Anatomische und histologische Untersuchungen von Embryonen an Tag E8, dem Beginn der ersten Vimentin Expression wird Aufschluß darüber geben, inwieweit Vimentin für Zell-Migration und proliferierende Zellen im Gewebe Funktionen übernimmt und zu welchem Zeitpunkt in der Entwicklung Vimentin funktionelle Bedeutung hat.

Ein weiterer in dieser Arbeit nicht untersuchter Aspekt ist die Rolle von Vimentin für das Immunsystem. Bisherige Studien postulieren eine Rolle für Vimentin im „Lymphozyten

homing“ und in der Immunantwort (Mor-Vaknin et al., 2003; Nieminen et al., 2006). Zudem könnte in transgenen Mäusen die Hämatopoese möglicherweise gestört sein. Die Untersuchung der transgenen Mäuse unter immunologischen Gesichtspunkten könnte eine Reihe von Funktionen für Vimentin in der Immunantwort aufdecken und weitere Ergebnisse über Vimentin-Funktion für die Adhäsion und Migration von T-Lymphozyten erzielen.

7 Zusammenfassung

Vimentin ist ein Intermediarfilament-Protein (IF) und wird in unterschiedlich differenzierten Zellen mesenchymalen Ursprungs exprimiert. Zudem ist Vimentin das Haupt-IF im Epithel und den kortikalen Faserzellen der Linse. Mit GFAP bildet Vimentin das Zytoskelett der Gliazellen der Retina und des ZNS. Neben seinem Beitrag zur mechanischen Integrität der Zelle wird für Vimentin eine Funktion im Lipidmetabolismus, in der Stressantwort, bei Apoptose und im Vesikeltransport postuliert. Überraschenderweise entwickeln Vimentin defiziente Mäuse ohne Stressinduktion, jedoch keinen offensichtlichen Phänotyp, was möglicherweise seine Ursache in kompensatorischen Effekten anderer IF-Proteine hat. Die spezielle Funktion von Vimentin in der Entwicklung und in Geweben ist dadurch *in vivo* noch weitgehend unverstanden. In dieser Arbeit konnte durch substöchiometrische, gewebe-spezifische Expression einer dominant negativen Vimentin Mutante gezeigt werden, dass Vimentin eine bedeutende Rolle für die Integrität der Linse hat und die Expression von GFAP auf transkriptioneller Ebene indirekt moduliert.

In der Linse verursachte die Aggregation des Vimentin Proteins eine Zunahme der Faserzellgröße und führte zu Einfaltungen der Plasmamembranen. Als endgültige Pathologie entwickelten die mutiertes Vimentin exprimierenden Mäuse einen posterioren Katarakt. Dies ordnet Vimentin, und nicht den lensenspezifischen IF-Proteinen CP49 und Filensin, die Hauptrolle in der Erhaltung der Linsenintegrität zu.

Im Laufe der Differenzierung der Linsenfaser werden die Vimentin Aggregate degradiert, was durch erhöhte Expression von dem Chaperonen Hsp70, Ubiquitinierung und erhöhter Proteasomenaktivität begleitet wird und den Aggregat-Abbauweg darstellt.

In den Astrogliazellen der Retina und in Linsenepithelzellen löste die Expression von mutiertem Vimentin die vermehrte Expression von GFAP auf transkriptioneller und Proteinebene aus. Die erhöhte Expression von GFAP wird durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Stat3 durch Relokalisation in den Kern der Gliazellen induziert. Dies deutet eine Aktivierung der Astroglia als Stressantwort auf mutiertes Vimentin in diesen Zellen an, die analog zu intrazellulären Prozessen in der reaktiven Gliose steht und beschreibt zum ersten Mal einen Mechanismus, in dem ein mutiertes Zytoskelettprotein zu Veränderung der Genexpression beiträgt.

Zusammengefasst postulieren die in dieser Arbeit erstellten Ergebnisse eine Beteiligung von Vimentin an genetisch bedingten humanen Katarakt- und Retinaerkrankungen.

8 Literaturverzeichnis

- Abumuhor, I.A., P.H. Spencer, and J.A. Cohlberg. 1998. The pathway of assembly of intermediate filaments from recombinant alpha-internexin. *J Struct Biol.* 123:187-98.
- Al-Chalabi, A., and C.C. Miller. 2003. Neurofilaments and neurological disease. *Bioessays.* 25:346-55.
- Alizadeh, A., J. Clark, T. Seeberger, J. Hess, T. Blankenship, and P.G. FitzGerald. 2003. Targeted deletion of the lens fiber cell-specific intermediate filament protein filensin. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44:5252-8.
- Alizadeh, A., J.I. Clark, T. Seeberger, J. Hess, T. Blankenship, A. Spicer, and P.G. FitzGerald. 2002. Targeted genomic deletion of the lens-specific intermediate filament protein CP49. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43:3722-7.
- Andersson, M., A. Honarvar, J. Sjostrand, A. Peterson, and J.O. Karlsson. 2003. Decreased caspase-3 activity in human lens epithelium from posterior subcapsular cataracts. *Exp Eye Res.* 76:175-82.
- Andersson, M., J. Sjostrand, A. Petersen, A.K. Honarvar, and J.O. Karlsson. 2000. Caspase and proteasome activity during staurosporin-induced apoptosis in lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41:2623-32.
- Bachmann, S., W. Kriz, C. Kuhn, and W.W. Franke. 1983. Differentiation of cell types in the mammalian kidney by immunofluorescence microscopy using antibodies to intermediate filament proteins and desmoplakins. *Histochemistry.* 77:365-94.
- Bar, H., N. Mucke, A. Kostareva, G. Sjoberg, U. Aebi, and H. Herrmann. 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.
- Bar, H., S.V. Strelkov, G. Sjoberg, U. Aebi, and H. Herrmann. 2004. The biology of desmin filaments: how do mutations affect their structure, assembly, and organisation? *J Struct Biol.* 148:137-52.
- Baruch, A., D. Greenbaum, E.T. Levy, P.A. Nielsen, N.B. Gilula, N.M. Kumar, and M. Bogyo. 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.
- Bassnett, S., and D.C. Beebe. 1992. Coincident loss of mitochondria and nuclei during lens fiber cell differentiation. *Dev Dyn.* 194:85-93.
- Bassnett, S., J.R. Kuszak, L. Reinisch, H.G. Brown, and D.C. Beebe. 1994. Intercellular communication between epithelial and fiber cells of the eye lens. *J Cell Sci.* 107 (Pt 4):799-811.
- Bassnett, S., H. Missey, and I. Vucemilo. 1999. Molecular architecture of the lens fiber cell basal membrane complex. *J Cell Sci.* 112 (Pt 13):2155-65.
- Bignami, A., and D. Dahl. 1979. The radial glia of Muller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic (GFA) protein. *Exp Eye Res.* 28:63-9.
- Bilak, S.R., S.W. Sernett, M.M. Bilak, R.M. Bellin, M.H. Stromer, T.W. Huiatt, and R.M. Robson. 1998. Properties of the novel intermediate filament protein synemin and its identification in mammalian muscle. *Arch Biochem Biophys.* 355:63-76.
- Blankenship, T.N., J.F. Hess, and P.G. FitzGerald. 2001. Development- and differentiation-dependent reorganization of intermediate filaments in fiber cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42:735-42.

- Bloemendal, H. 1991. Proctor lecture. Disorganization of membranes and abnormal intermediate filament assembly lead to cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 32:445-55.
- Bloemendal, H., and W.W. de Jong. 1991. Lens proteins and their genes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 41:259-81.
- Bloemendal, H., J.M. Raats, F.R. Pieper, E.L. Benedetti, and I. Dunia. 1997. Transgenic mice carrying chimeric or mutated type III intermediate filament (IF) genes. *Cell Mol Life Sci.* 53:1-12.
- Brehmer, D., S. Rudiger, C.S. Gassler, D. Klostermeier, L. Packschies, J. Reinstein, M.P. Mayer, and B. Bukau. 2001. Tuning of chaperone activity of Hsp70 proteins by modulation of nucleotide exchange. *Nat Struct Biol.* 8:427-32.
- Brenner, M. 1994. Structure and transcriptional regulation of the GFAP gene. *Brain Pathol.* 4:245-57.
- Brenner, M., A.B. Johnson, O. Boespflug-Tanguy, D. Rodriguez, J.E. Goldman, and A. Messing. 2001. Mutations in GFAP, encoding glial fibrillary acidic protein, are associated with Alexander disease. *Nat Genet.* 27:117-20.
- Brenner, M., W.C. Kisseberth, Y. Su, F. Besnard, and A. Messing. 1994. GFAP promoter directs astrocyte-specific expression in transgenic mice. *J Neurosci.* 14:1030-7.
- Brenner, M., and A. Messing. 1996. GFAP Transgenic Mice. *Methods.* 10:351-64.
- Bringmann, A., and A. Reichenbach. 2001. Role of Muller cells in retinal degenerations. *Front Biosci.* 6:E72-92.
- Brody, J.R., and S.E. Kern. 2004. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques.* 36:214-6.
- Brown, K.D., and L.I. Binder. 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., J.A. Hallam, E. Colucci-Guyon, and S. Shaw. 2001a. Rigidity of circulating lymphocytes is primarily conferred by vimentin intermediate filaments. *J Immunol.* 166:6640-6.
- Brown, M.J., J.A. Hallam, Y. Liu, K.M. Yamada, and S. Shaw. 2001b. Cutting edge: integration of human T lymphocyte cytoskeleton by the cytolinker plectin. *J Immunol.* 167:641-5.
- Byun, Y., F. Chen, R. Chang, M. Trivedi, K.J. Green, and V.L. Cryns. 2001. Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis. *Cell Death Differ.* 8:443-50.
- Calvo, J.L., A.L. Carbonell, and J. Boya. 1990. Coexpression of vimentin and glial fibrillary acidic protein in astrocytes of the adult rat optic nerve. *Brain Res.* 532:355-7.
- Calvo, J.L., A.L. Carbonell, and J. Boya. 1991. Co-expression of glial fibrillary acidic protein and vimentin in reactive astrocytes following brain injury in rats. *Brain Res.* 566:333-6.
- Candi, E., E. Tarcsa, J.J. Digiovanna, J.G. Compton, P.M. Elias, L.N. Marekov, and P.M. Steinert. 1998. A highly conserved lysine residue on the head domain of type II keratins is essential for the attachment of keratin intermediate filaments to the cornified cell envelope through isopeptide crosslinking by transglutaminases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:2067-72.
- Capetanaki, Y., S. Smith, and J.P. Heath. 1989a. Overexpression of the vimentin gene in transgenic mice inhibits normal lens cell differentiation. *J Cell Biol.* 109:1653-64.
- Capetanaki, Y., S. Starnes, and S. Smith. 1989b. Expression of the chicken vimentin gene in transgenic mice: efficient assembly of the avian protein into the cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:4882-6.
- Carter, J.M., A.M. Hutcheson, and R.A. Quinlan. 1995. In vitro studies on the assembly properties of the lens proteins CP49, CP115: coassembly with alpha-crystallin but not with vimentin. *Exp Eye Res.* 60:181-92.

- Chan, Y.M., Q.C. Yu, J. LeBlanc-Straceski, A. Christiano, L. Pulkkinen, R.S. Kucherlapati, J. Uitto, and E. Fuchs. 1994. Mutations in the non-helical linker segment L1-2 of keratin 5 in patients with Weber-Cockayne epidermolysis bullosa simplex. *J Cell Sci.* 107 (Pt 4):765-74.
- Chang, L., and R.D. Goldman. 2004. Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:601-13.
- Cho, K.S., L. Yang, B. Lu, H. Feng Ma, X. Huang, M. Pekny, and D.F. Chen. 2005. Re-establishing the regenerative potential of central nervous system axons in postnatal mice. *J Cell Sci.* 118:863-72.
- Chou, Y.H., B.T. Helfand, and R.D. Goldman. 2001. New horizons in cytoskeletal dynamics: transport of intermediate filaments along microtubule tracks. *Curr Opin Cell Biol.* 13:106-9.
- Chou, Y.H., P. Opal, R.A. Quinlan, and R.D. Goldman. 1996. The relative roles of specific N- and C-terminal phosphorylation sites in the disassembly of intermediate filament in mitotic BHK-21 cells. *J Cell Sci.* 109 (Pt 4):817-26.
- Clement, S., P.T. Velasco, S.N. Murthy, J.H. Wilson, T.J. Lukas, R.D. Goldman, and L. Lorand. 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 D. Paulin. 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., Y.R.M. Gimenez, T. Maurice, C. Babinet, and A. Privat. 1999. Cerebellar defect and impaired motor coordination in mice lacking vimentin. *Glia.* 25:33-43.
- Colucci-Guyon, E., M.M. Portier, I. Dunia, D. Paulin, S. Pournin, and C. Babinet. 1994. Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype. *Cell.* 79:679-94.
- Conley, Y.P., D. Erturk, A. Keverline, T.S. Mah, A. Keravala, L.R. Barnes, A. Bruchis, J.F. Hess, P.G. FitzGerald, D.E. Weeks, R.E. Ferrell, and M.B. Gorin. 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.
- Copp, A.J. 1995. Death before birth: clues from gene knockouts and mutations. *Trends Genet.* 11:87-93.
- Coulombe, P.A., M.E. Hutton, A. Letai, A. Hebert, A.S. Paller, and E. Fuchs. 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 M.B. Omary. 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 P. Wong. 2004. Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds. *Nat Cell Biol.* 6:699-706.
- Dahm, R. 1999. Lens fibre cell differentiation - A link with apoptosis? *Ophthalmic Res.* 31:163-83.
- De Sousa, P.A., G. Valdimarsson, B.J. Nicholson, and G.M. Kidder. 1993. Connexin trafficking and the control of gap junction assembly in mouse preimplantation embryos. *Development.* 117:1355-67.
- Delaney, C.L., M. Brenner, and A. Messing. 1996. Conditional ablation of cerebellar astrocytes in postnatal transgenic mice. *J Neurosci.* 16:6908-18.
- Dellagi, K., W. Vainchenker, G. Vinci, D. Paulin, and J.C. Brouet. 1983. Alteration of vimentin intermediate filament expression during differentiation of human hemopoietic cells. *Embo J.* 2:1509-14.
- Denk, H., C. Stumptner, and K. Zatloukal. 2000. Mallory bodies revisited. *J Hepatol.* 32:689-702.

- Ding, M., C. Eliasson, C. Betsholtz, A. Hamberger, and M. Pekny. 1998. Altered taurine release following hypotonic stress in astrocytes from mice deficient for GFAP and vimentin. *Brain Res Mol Brain Res.* 62:77-81.
- Djabali, K., B. de Nechaud, F. Landon, and M.M. Portier. 1997. AlphaB-crystallin interacts with intermediate filaments in response to stress. *J Cell Sci.* 110 (Pt 21):2759-69.
- Dong, D.L., Z.S. Xu, G.W. Hart, and D.W. Cleveland. 1996. Cytoplasmic O-GlcNAc modification of the head domain and the KSP repeat motif of the neurofilament protein neurofilament-H. *J Biol Chem.* 271:20845-52.
- Duncan, M.K., L. Xie, L.L. David, M.L. Robinson, J.R. Taube, W. Cui, and L.W. Reneker. 2004. Ectopic Pax6 expression disturbs lens fiber cell differentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45:3589-98.
- Dunia, I., F. Pieper, S. Manenti, A. van de Kemp, G. Devilliers, E.L. Benedetti, and H. Bloemendal. 1990. Plasma membrane-cytoskeleton damage in eye lenses of transgenic mice expressing desmin. *Eur J Cell Biol.* 53:59-74.
- Duprey, P., and D. Paulin. 1995. What can be learned from intermediate filament gene regulation in the mouse embryo. *Int J Dev Biol.* 39:443-57.
- Dyer, M.A., and C.L. Cepko. 2000. Control of Muller glial cell proliferation and activation following retinal injury. *Nat Neurosci.* 3:873-80.
- Dyer, M.A., and C.L. Cepko. 2001. Regulating proliferation during retinal development. *Nat Rev Neurosci.* 2:333-42.
- Eckes, B., E. Colucci-Guyon, H. Smola, S. Nodder, C. Babinet, T. Krieg, and P. Martin. 2000. Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin. *J Cell Sci.* 113 (Pt 13):2455-62.
- Eckes, B., D. Dogic, E. Colucci-Guyon, N. Wang, A. Maniotis, D. Ingber, A. Merckling, F. Langa, M. Aumailley, A. Delouvee, V. Koteliensky, C. Babinet, and T. Krieg. 1998. Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. *J Cell Sci.* 111 (Pt 13):1897-907.
- Eliasson, C., C. Sahlgren, C.H. Berthold, J. Stakeberg, J.E. Celis, C. Betsholtz, J.E. Eriksson, and M. Pekny. 1999. Intermediate filament protein partnership in astrocytes. *J Biol Chem.* 274:23996-4006.
- Eng, L.F., and R.S. Ghirnikar. 1994. GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol.* 4:229-37.
- Eng, L.F., R.S. Ghirnikar, and Y.L. Lee. 2000. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res.* 25:1439-51.
- Eng, L.F., Y.L. Lee, H. Kwan, M. Brenner, and A. Messing. 1998. Astrocytes cultured from transgenic mice carrying the added human glial fibrillary acidic protein gene contain Rosenthal fibers. *J Neurosci Res.* 53:353-60.
- Erickson, P.A., S.K. Fisher, C.J. Guerin, D.H. Anderson, and D.D. Kaska. 1987. Glial fibrillary acidic protein increases in Muller cells after retinal detachment. *Exp Eye Res.* 44:37-48.
- Eriksson, J.E., T. He, A.V. Trejo-Skalli, A.S. Harmala-Brasken, J. Hellman, Y.H. Chou, and R.D. Goldman. 2004. Specific in vivo phosphorylation sites determine the assembly dynamics of vimentin intermediate filaments. *J Cell Sci.* 117:919-32.
- Eshagian, J., N.S. Rafferty, and W. Goossens. 1981. Human cataracta complicata. Clinicopathologic correlation. *Ophthalmology.* 88:155-63.
- Fan, G., K. Martinowich, M.H. Chin, F. He, S.D. Fouse, L. Hutnick, D. Hattori, W. Ge, Y. Shen, H. Wu, J. ten Hoeve, K. Shuai, and Y.E. Sun. 2005. DNA methylation controls the timing of astrogliogenesis through regulation of JAK-STAT signaling. *Development.* 132:3345-56.

- Fawcett, J.W., and R.A. Asher. 1999. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull.* 49:377-91.
- Foisner, R. 1997. Dynamic organisation of intermediate filaments and associated proteins during the cell cycle. *Bioessays.* 19:297-305.
- Foisner, R., W. Bohn, K. Mannweiler, and G. Wiche. 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.
- Foley, J.D., H. Rosenbaum, and A.E. Griep. 2004. Temporal regulation of VEID-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin cleavage activity and caspase-6 correlates with organelle loss during lens development. *J Biol Chem.* 279:32142-50.
- Franke, W.W., C. Grund, C. Kuhn, B.W. Jackson, and K. Illmensee. 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., M. Hergt, and C. Grund. 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., E. Schmid, M. Osborn, and K. Weber. 1978. Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75:5034-8.
- Friedlander, G., I. Runembert, F. Vrtovnik, and F. Terzi. 1999. Renal tubular cells cultured from genetically modified animals. *Exp Nephrol.* 7:407-12.
- Fuchs, E., and D.W. Cleveland. 1998. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science.* 279:514-9.
- Fuchs, E., and I. Karakesisoglou. 2001. Bridging cytoskeletal intersections. *Genes Dev.* 15:1-14.
- Fuchs, E., and K. Weber. 1994. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem.* 63:345-82.
- Furst, D.O., M. Osborn, and K. Weber. 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.
- Galbreath, E., S.J. Kim, K. Park, M. Brenner, and A. Messing. 1995. Overexpression of TGF-beta 1 in the central nervous system of transgenic mice results in hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol.* 54:339-49.
- Galou, M., E. Colucci-Guyon, D. Ensergueix, J.L. Ridet, M. Gimenez y Ribotta, A. Privat, C. Babinet, and P. Dupouey. 1996. Disrupted glial fibrillary acidic protein network in astrocytes from vimentin knockout mice. *J Cell Biol.* 133:853-63.
- Galou, M., J. Gao, J. Humbert, M. Mericskay, Z. Li, D. Paulin, and P. Vicart. 1997. The importance of intermediate filaments in the adaptation of tissues to mechanical stress: evidence from gene knockout studies. *Biol Cell.* 89:85-97.
- Garzon, R.J., and Z.E. Zehner. 1994. Multiple silencer elements are involved in regulating the chicken vimentin gene. *Mol Cell Biol.* 14:934-43.
- Geisler, N., and K. Weber. 1981. Isolation of polymerization-competent vimentin from porcine eye lens tissue. *FEBS Lett.* 125:253-6.
- Georgatos, S.D., F. Gounari, G. Goulielmos, and U. Aebi. 1997. To bead or not to bead? Lens-specific intermediate filaments revisited. *J Cell Sci.* 110 (Pt 21):2629-34.

- Getsios, S., E.V. Amargo, R.L. Dusek, K. Ishii, L. Sheu, L.M. Godsel, and K.J. Green. 2004. Coordinated expression of desmoglein 1 and desmocollin 1 regulates intercellular adhesion. *Differentiation*. 72:419-33.
- Ghosh, F., and J. Wasselius. 2002. Muller cells in allogeneic adult rabbit retinal transplants. *Glia*. 40:78-84.
- Gillard, B.K., R.G. Harrell, and D.M. Marcus. 1996. Pathways of glycosphingolipid biosynthesis in SW13 cells in the presence and absence of vimentin intermediate filaments. *Glycobiology*. 6:33-42.
- Girao, H., P. Pereira, J. Ramalho, R. Quinlan, and A. Prescott. 2003. Cholesterol oxides mediated changes in cytoskeletal organisation involves Rho GTPases small star, filled. *Exp Cell Res*. 291:502-13.
- Gomi, H., T. Yokoyama, K. Fujimoto, T. Ikeda, A. Katoh, T. Itoh, and S. Itoharu. 1995. Mice devoid of the glial fibrillary acidic protein develop normally and are susceptible to scrapie prions. *Neuron*. 14:29-41.
- Gorospe, J.R., S. Naidu, A.B. Johnson, V. Puri, G.V. Raymond, S.D. Jenkins, R.C. Pedersen, D. Lewis, P. Knowles, R. Fernandez, D. De Vivo, M.S. van der Knaap, A. Messing, M. Brenner, and E.P. Hoffman. 2002. Molecular findings in symptomatic and pre-symptomatic Alexander disease patients. *Neurology*. 58:1494-500.
- Gotz, W., F. Theuring, J. Favor, and R. Herken. 1991. Eye pathology in transgenic mice carrying a MSV-SV 40 large T-construct. *Exp Eye Res*. 52:41-9.
- Goulielmos, G., F. Gounari, S. Remington, S. Muller, M. Haner, U. Aebi, and S.D. Georgatos. 1996. Filensin and phakinin form a novel type of beaded intermediate filaments and coassemble de novo in cultured cells. *J Cell Biol*. 132:643-55.
- Granger, B.L., and E. Lazarides. 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. 2004. Congenital hereditary cataracts. *Int J Dev Biol*. 48:1031-44.
- Green, K.J., M. Bohringer, T. Gocken, and J.C. Jones. 2005. Intermediate filament associated proteins. *Adv Protein Chem*. 70:143-202.
- Hatfield, J.S., R.P. Skoff, H. Maisel, and L. Eng. 1984. Glial fibrillary acidic protein is localized in the lens epithelium. *J Cell Biol*. 98:1895-8.
- He, W., and S. Li. 2000. Congenital cataracts: gene mapping. *Hum Genet*. 106:1-13.
- Helfand, B.T., L. Chang, and R.D. Goldman. 2003. The dynamic and motile properties of intermediate filaments. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 19:445-67.
- Helfand, B.T., L. Chang, and R.D. Goldman. 2004. Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture. *J Cell Sci*. 117:133-41.
- Helfand, B.T., Y.H. Chou, D.K. Shumaker, and R.D. Goldman. 2005. Intermediate filament proteins participate in signal transduction. *Trends Cell Biol*. 15:568-70.
- Henrion, D., F. Terzi, K. Matrougui, M. Duriez, C.M. Boulanger, E. Colucci-Guyon, C. Babinet, P. Briand, G. Friedlander, P. Poitevin, and B.I. Levy. 1997. Impaired flow-induced dilation in mesenteric resistance arteries from mice lacking vimentin. *J Clin Invest*. 100:2909-14.
- Herrmann, H., and U. Aebi. 1998a. Intermediate filament assembly: fibrillogenesis is driven by decisive dimer-dimer interactions. *Curr Opin Struct Biol*. 8:177-85.
- Herrmann, H., and U. Aebi. 1998b. Structure, assembly, and dynamics of intermediate filaments. *Subcell Biochem*. 31:319-62.

- Herrmann, H., and U. Aebi. 1999. Intermediate filament assembly: temperature sensitivity and polymorphism. *Cell Mol Life Sci.* 55:1416-31.
- Herrmann, H., and U. Aebi. 2000. Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr Opin Cell Biol.* 12:79-90.
- Herrmann, H., and U. Aebi. 2004. Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. *Annu Rev Biochem.* 73:749-89.
- Herrmann, H., M. Haner, M. Brettel, N.O. Ku, and U. Aebi. 1999. Characterization of distinct early assembly units of different intermediate filament proteins. *J Mol Biol.* 286:1403-20.
- Herrmann, H., M. Haner, M. Brettel, S.A. Muller, K.N. Goldie, B. Fedtke, A. Lustig, W.W. Franke, and U. Aebi. 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., M. Hesse, M. Reichenzeller, U. Aebi, and T.M. Magin. 2003. Functional complexity of intermediate filament cytoskeletons: from structure to assembly to gene ablation. *Int Rev Cytol.* 223:83-175.
- Herrmann, H., L. Kreplak, and U. Aebi. 2004. Isolation, characterization, and in vitro assembly of intermediate filaments. *Methods Cell Biol.* 78:3-24.
- Herrmann, H., S.V. Strelkov, B. Feja, K.R. Rogers, M. Brettel, A. Lustig, M. Haner, D.A. Parry, P.M. Steinert, P. Burkhard, and U. Aebi. 2000. The intermediate filament protein consensus motif of helix 2B: its atomic structure and contribution to assembly. *J Mol Biol.* 298:817-32.
- Herrmann, H., T. Wedig, R.M. Porter, E.B. Lane, and U. Aebi. 2002. Characterization of early assembly intermediates of recombinant human keratins. *J Struct Biol.* 137:82-96.
- Herskowitz, I. 1987. Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature.* 329:219-22.
- Hesse, M., T. Berg, B. Wiedenmann, U. Spengler, R.P. Woitas, and T.M. Magin. 2004a. A frequent keratin 8 p.L227L polymorphism, but no point mutations in keratin 8 and 18 genes, in patients with various liver disorders. *J Med Genet.* 41:e42.
- Hesse, M., T. Franz, Y. Tamai, M.M. Taketo, and T.M. Magin. 2000. Targeted deletion of keratins 18 and 19 leads to trophoblast fragility and early embryonic lethality. *Embo J.* 19:5060-70.
- Hesse, M., T.M. Magin, and K. Weber. 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.
- Hesse, M., E.D. Watson, T. Schwaluk, and T.M. Magin. 2005. Rescue of keratin 18/19 doubly deficient mice using aggregation with tetraploid embryos. *Eur J Cell Biol.* 84:355-61.
- Hesse, M., A. Zimek, K. Weber, and T.M. Magin. 2004b. Comprehensive analysis of keratin gene clusters in humans and rodents. *Eur J Cell Biol.* 83:19-26.
- Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., and Lacy, E. 1994. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Hovnanian, A., E. Pollack, L. Hilal, A. Rochat, C. Prost, Y. Barrandon, and M. Goossens. 1993. A missense mutation in the rod domain of keratin 14 associated with recessive epidermolysis bullosa simplex. *Nat Genet.* 3:327-32.
- Hsiao, V.C., R. Tian, H. Long, M. Der Perng, M. Brenner, R.A. Quinlan, and J.E. Goldman. 2005. Alexander-disease mutation of GFAP causes filament disorganization and decreased solubility of GFAP. *J Cell Sci.* 118:2057-65.

- Hutchins, J.B., and V.A. Casagrande. 1989. Vimentin: changes in distribution during brain development. *Glia*. 2:55-66.
- Inada, H., I. Izawa, M. Nishizawa, E. Fujita, T. Kiyono, T. Takahashi, T. Momoi, and M. Inagaki. 2001. Keratin attenuates tumor necrosis factor-induced cytotoxicity through association with TRADD. *J Cell Biol.* 155:415-26.
- Inagaki, M., N. Inagaki, T. Takahashi, and Y. Takai. 1997. Phosphorylation-dependent control of structures of intermediate filaments: a novel approach using site- and phosphorylation state-specific antibodies. *J Biochem (Tokyo)*. 121:407-14.
- Ireland, M.E., P. Wallace, A. Sandilands, M. Poosch, M. Kasper, J. Graw, A. Liu, H. Maisel, A.R. Prescott, A.M. Hutcheson, D. Goebel, and R.A. Quinlan. 2000. Up-regulation of novel intermediate filament proteins in primary fiber cells: an indicator of all vertebrate lens fiber differentiation? *Anat Rec.* 258:25-33.
- Irvine, A.D., and W.H. McLean. 1999. Human keratin diseases: the increasing spectrum of disease and subtlety of the phenotype-genotype correlation. *Br J Dermatol.* 140:815-28.
- Iwaki, T., A. Kume-Iwaki, R.K. Liem, and J.E. Goldman. 1989. Alpha B-crystallin is expressed in non-lenticular tissues and accumulates in Alexander's disease brain. *Cell.* 57:71-8.
- Izmailova, E.S., E. Wieczorek, E.B. Perkins, and Z.E. Zehner. 1999. A GC-box is required for expression of the human vimentin gene. *Gene.* 235:69-75.
- Izmailova, E.S., and Z.E. Zehner. 1999. An antisilencer element is involved in the transcriptional regulation of the human vimentin gene. *Gene.* 230:111-20.
- Jackson, I.J., and C.M. Abbott. 2000. Mouse genetics and transgenics: a practical approach. Oxford University Press. 328 pp.
- Jakobs, P.M., J.F. Hess, P.G. FitzGerald, P. Kramer, R.G. Weleber, and M. Litt. 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.
- Jamora, C., and E. Fuchs. 2002. Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nat Cell Biol.* 4:E101-8.
- Janosch, P., A. Kieser, M. Eulitz, J. Lovric, G. Sauer, M. Reichert, F. Gounari, D. Buscher, M. Baccarini, H. Mischak, and W. Kolch. 2000. The Raf-1 kinase associates with vimentin kinases and regulates the structure of vimentin filaments. *Faseb J.* 14:2008-21.
- Johnson, A.B., and M. Brenner. 2003. Alexander's disease: clinical, pathologic, and genetic features. *J Child Neurol.* 18:625-32.
- Kim, S., E.A. Nollen, K. Kitagawa, V.P. Bindokas, and R.I. Morimoto. 2002. Polyglutamine protein aggregates are dynamic. *Nat Cell Biol.* 4:826-31.
- Kim, Y.J., C. Sauer, K. Testa, J.K. Wahl, R.A. Svoboda, K.R. Johnson, M.J. Wheelock, and K.A. Knudsen. 2005. Modulating the strength of cadherin adhesion: evidence for a novel adhesion complex. *J Cell Sci.* 118:3883-94.
- Kolb, H., R. Nelson, P. Ahnelt, and N. Cuenca. 2001. Cellular organization of the vertebrate retina. *Prog Brain Res.* 131:3-26.
- Kowalczyk, A.P., E.A. Bornslaeger, S.M. Norvell, H.L. Palka, and K.J. Green. 1999. Desmosomes: intercellular adhesive junctions specialized for attachment of intermediate filaments. *Int Rev Cytol.* 185:237-302.
- Kowalczyk, A.P., P. Navarro, E. Dejana, E.A. Bornslaeger, K.J. Green, D.S. Kopp, and J.E. Borgwardt. 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.

- Kramer, P., J. Yount, T. Mitchell, D. LaMorticella, R. Carrero-Valenzuela, E. Lovrien, I. Maumenee, and M. Litt. 1996. A second gene for cerulean cataracts maps to the beta crystallin region on chromosome 22. *Genomics*. 35:539-42.
- Kreplak, L., U. Aebi, and H. Herrmann. 2004. Molecular mechanisms underlying the assembly of intermediate filaments. *Exp Cell Res*. 301:77-83.
- Kreplak, L., H. Bar, J.F. Leterrier, H. Herrmann, and U. Aebi. 2005. Exploring the mechanical behavior of single intermediate filaments. *J Mol Biol*. 354:569-77.
- Krutovskikh, V., and H. Yamasaki. 2000. Connexin gene mutations in human genetic diseases. *Mutat Res*. 462:197-207.
- Ku, N.O., X. Zhou, D.M. Toivola, and M.B. Omary. 1999. The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease. *Am J Physiol*. 277:G1108-37.
- Kuszak, J.R., R.K. Zoltoski, and C. Sivertson. 2004. Fibre cell organization in crystalline lenses. *Exp Eye Res*. 78:673-87.
- Lampugnani, M.G., and E. Dejana. 1997. Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles. *Curr Opin Cell Biol*. 9:674-82.
- Lane, E.B., B.L. Hogan, M. Kurkinen, and J.I. Garrels. 1983. Co-expression of vimentin and cytokeratins in parietal endoderm cells of early mouse embryo. *Nature*. 303:701-4.
- Langbein, L., M.A. Rogers, H. Winter, S. Praetzel, U. Beckhaus, H.R. Rackwitz, and J. Schweizer. 1999. The catalog of human hair keratins. I. Expression of the nine type I members in the hair follicle. *J Biol Chem*. 274:19874-84.
- Langbein, L., M.A. Rogers, H. Winter, S. Praetzel, and J. Schweizer. 2001. The catalog of human hair keratins. II. Expression of the six type II members in the hair follicle and the combined catalog of human type I and II keratins. *J Biol Chem*. 276:35123-32.
- Lariviere, R.C., and J.P. Julien. 2004. Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. *J Neurobiol*. 58:131-48.
- Larsson, A., U. Wilhelmsson, M. Pekna, and M. Pekny. 2004. Increased cell proliferation and neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of old GFAP(-/-)Vim(-/-) mice. *Neurochem Res*. 29:2069-73.
- Lee, A., J.S. Morrow, and V.M. Fowler. 2001. Caspase remodeling of the spectrin membrane skeleton during lens development and aging. *J Biol Chem*. 276:20735-42.
- Lee, Y.C., and Y.K. Lai. 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.
- Li, R., A.B. Johnson, G. Salomons, J.E. Goldman, S. Naidu, R. Quinlan, B. Cree, S.Z. Ruyle, B. Banwell, M. D'Hooghe, J.R. Siebert, C.M. Rolf, H. Cox, A. Reddy, L.G. Gutierrez-Solana, A. Collins, R.O. Weller, A. Messing, M.S. van der Knaap, and M. Brenner. 2005. Glial fibrillary acidic protein mutations in infantile, juvenile, and adult forms of Alexander disease. *Ann Neurol*. 57:310-26.
- Li, R., A. Messing, J.E. Goldman, and M. Brenner. 2002. GFAP mutations in Alexander disease. *Int J Dev Neurosci*. 20:259-68.
- Li, Z., E. Colucci-Guyon, M. Pincon-Raymond, M. Mericskay, S. Pournin, D. Paulin, and C. Babinet. 1996. Cardiovascular lesions and skeletal myopathy in mice lacking desmin. *Dev Biol*. 175:362-6.
- Lieber, J.G., and R.M. Evans. 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.

- Liedtke, W., W. Edelmann, P.L. Bieri, F.C. Chiu, N.J. Cowan, R. Kucherlapati, and C.S. Raine. 1996. GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron*. 17:607-15.
- Lin, J., and W. Cai. 2004. Effect of vimentin on reactive gliosis: in vitro and in vivo analysis. *J Neurotrauma*. 21:1671-82.
- Litt, M., P. Kramer, D.M. LaMorticella, W. Murphey, E.W. Lovrien, and R.G. Weleber. 1998. Autosomal dominant congenital cataract associated with a missense mutation in the human alpha crystallin gene CRYAA. *Hum Mol Genet*. 7:471-4.
- Lorber, B., M. Berry, and A. Logan. 2005. Lens injury stimulates adult mouse retinal ganglion cell axon regeneration via both macrophage- and lens-derived factors. *Eur J Neurosci*. 21:2029-34.
- Lu, H., M. Hesse, B. Peters, and T.M. Magin. 2005. Type II keratins precede type I keratins during early embryonic development. *Eur J Cell Biol*. 84:709-18.
- Lu, X., R.A. Quinlan, J.B. Steel, and E.B. Lane. 1993. Network incorporation of intermediate filament molecules differs between preexisting and newly assembling filaments. *Exp Cell Res*. 208:218-25.
- Lundkvist, A., A. Reichenbach, C. Betsholtz, P. Carmeliet, H. Wolburg, and M. Pekny. 2004. Under stress, the absence of intermediate filaments from Muller cells in the retina has structural and functional consequences. *J Cell Sci*. 117:3481-8.
- Magin, T.M. 1998. Lessons from keratin transgenic and knockout mice. *Subcell Biochem*. 31:141-72.
- Magin, T.M., M. Hesse, R. Meier-Bornheim, and J. Reichelt. 2004a. Developing mouse models to study intermediate filament function. *Methods Cell Biol*. 78:65-94.
- Magin, T.M., J. Reichelt, and M. Hatzfeld. 2004b. Emerging functions: diseases and animal models reshape our view of the cytoskeleton. *Exp Cell Res*. 301:91-102.
- Martin, P. 1997. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 276:75-81.
- Masaki, S., and R.A. Quinlan. 1997. Gene structure and sequence comparisons of the eye lens specific protein, filensin, from rat and mouse: implications for protein classification and assembly. *Gene*. 201:11-20.
- Masood, K., F. Besnard, Y. Su, and M. Brenner. 1993. Analysis of a segment of the human glial fibrillary acidic protein gene that directs astrocyte-specific transcription. *J Neurochem*. 61:160-6.
- McCall, M.A., R.G. Gregg, R.R. Behringer, M. Brenner, C.L. Delaney, E.J. Galbreath, C.L. Zhang, R.A. Pearce, S.Y. Chiu, and A. Messing. 1996. Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (Gfap) alters neuronal physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:6361-6.
- Menet, V., M. Prieto, A. Privat, and M. Gimenez y Ribotta. 2003. Axonal plasticity and functional recovery after spinal cord injury in mice deficient in both glial fibrillary acidic protein and vimentin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:8999-9004.
- Messing, A., and M. Brenner. 2003a. Alexander disease: GFAP mutations unify young and old. *Lancet Neurol*. 2:75.
- Messing, A., and M. Brenner. 2003b. GFAP: functional implications gleaned from studies of genetically engineered mice. *Glia*. 43:87-90.
- Messing, A., M. Brenner, A.B. Johnson, and J.E. Goldman. 2001a. Update on white matter genetic disorders. *Pediatr Neurol*. 25:347-8; author reply 348.
- Messing, A., J.E. Goldman, A.B. Johnson, and M. Brenner. 2001b. Alexander disease: new insights from genetics. *J Neuropathol Exp Neurol*. 60:563-73.

- Messing, A., M.W. Head, K. Galles, E.J. Galbreath, J.E. Goldman, and M. Brenner. 1998. Fatal encephalopathy with astrocyte inclusions in GFAP transgenic mice. *Am J Pathol.* 152:391-8.
- Milner, D.J., G. Weitzer, D. Tran, A. Bradley, and Y. Capetanaki. 1996. Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin. *J Cell Biol.* 134:1255-70.
- Mor-Vaknin, N., A. Punturieri, K. Sitwala, and D.M. Markovitz. 2003. Vimentin is secreted by activated macrophages. *Nat Cell Biol.* 5:59-63.
- Mucke, N., L. Kreplak, R. Kirmse, T. Wedig, H. Herrmann, U. Aebi, and J. Langowski. 2004a. Assessing the flexibility of intermediate filaments by atomic force microscopy. *J Mol Biol.* 335:1241-50.
- Mucke, N., T. Wedig, A. Burer, L.N. Marekov, P.M. Steinert, J. Langowski, U. Aebi, and H. Herrmann. 2004b. Molecular and biophysical characterization of assembly-starter units of human vimentin. *J Mol Biol.* 340:97-114.
- Nagata, K., I. Izawa, and M. Inagaki. 2001. A decade of site- and phosphorylation state-specific antibodies: recent advances in studies of spatiotemporal protein phosphorylation. *Genes Cells.* 6:653-64.
- Nagy, A. 2000. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis.* 26:99-109.
- Nawashiro, H., A. Messing, N. Azzam, and M. Brenner. 1998. Mice lacking GFAP are hypersensitive to traumatic cerebrospinal injury. *Neuroreport.* 9:1691-6.
- Newey, S.E., E.V. Howman, C.P. Ponting, M.A. Benson, R. Nawrotzki, N.Y. Loh, K.E. Davies, and D.J. Blake. 2001. Syncoilin, a novel member of the intermediate filament superfamily that interacts with alpha-dystrobrevin in skeletal muscle. *J Biol Chem.* 276:6645-55.
- Nicholl, I.D., and R.A. Quinlan. 1994. Chaperone activity of alpha-crystallins modulates intermediate filament assembly. *Embo J.* 13:945-53.
- Nieminen, M., T. Henttinen, M. Merinen, F. Marttila-Ichihara, J.E. Eriksson, and S. Jalkanen. 2006. Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration. *Nat Cell Biol.* 8:156-62.
- Norenberg, M.D. 1994. Astrocyte responses to CNS injury. *J Neuropathol Exp Neurol.* 53:213-20.
- Norton, W.T., D.A. Aquino, I. Hozumi, F.C. Chiu, and C.F. Brosnan. 1992. Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. *Neurochem Res.* 17:877-85.
- Okada, M., M. Matsumura, N. Ogino, and Y. Honda. 1990. Muller cells in detached human retina express glial fibrillary acidic protein and vimentin. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 228:467-74.
- Omary, M.B., P.A. Coulombe, and W.H. McLean. 2004. Intermediate filament proteins and their associated diseases. *N Engl J Med.* 351:2087-100.
- Osborne, N.N., F. Block, and K.H. Sontag. 1991. Reduction of ocular blood flow results in glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression in rat retinal Muller cells. *Vis Neurosci.* 7:637-9.
- Oshima, R.G. 2002. Apoptosis and keratin intermediate filaments. *Cell Death Differ.* 9:486-92.
- Papayioannou, V.E., and R.R. Behringer. 2004. Mouse Phenotypes. CSHL Press. 235 pp.
- Paramio, J.M., and J.L. Jorcano. 2002. Beyond structure: do intermediate filaments modulate cell signalling? *Bioessays.* 24:836-44.
- Parry, D.A., and P.M. Steinert. 1999. Intermediate filaments: molecular architecture, assembly, dynamics and polymorphism. *Q Rev Biophys.* 32:99-187.
- Paulin, D., A. Lilienbaum, P. Duprey, Z. Li, and P. Vicart. 1990. Regulatory elements of the human vimentin gene: activation during proliferation. *Reprod Nutr Dev.* 30:423-9.

- Pekny, M. 2001. Astrocytic intermediate filaments: lessons from GFAP and vimentin knock-out mice. *Prog Brain Res.* 132:23-30.
- Pekny, M., C. Eliasson, C.L. Chien, L.G. Kindblom, R. Liem, A. Hamberger, and C. Betsholtz. 1998. GFAP-deficient astrocytes are capable of stellation in vitro when cocultured with neurons and exhibit a reduced amount of intermediate filaments and an increased cell saturation density. *Exp Cell Res.* 239:332-43.
- Pekny, M., C. Eliasson, R. Siushansian, M. Ding, S.J. Dixon, M. Pekna, J.X. Wilson, and A. Hamberger. 1999a. The impact of genetic removal of GFAP and/or vimentin on glutamine levels and transport of glucose and ascorbate in astrocytes. *Neurochem Res.* 24:1357-62.
- Pekny, M., C.B. Johansson, C. Eliasson, J. Stakeberg, A. Wallen, T. Perlmann, U. Lendahl, C. Betsholtz, C.H. Berthold, and J. Frisen. 1999b. Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin. *J Cell Biol.* 145:503-14.
- Pekny, M., P. Leveen, M. Pekna, C. Eliasson, C.H. Berthold, B. Westermarck, and C. Betsholtz. 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 M. Pekna. 2004. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J Pathol.* 204:428-37.
- Perlson, E., S. Hanz, K. Ben-Yaakov, Y. Segal-Ruder, R. Seger, and M. Fainzilber. 2005. Vimentin-dependent spatial translocation of an activated MAP kinase in injured nerve. *Neuron.* 45:715-26.
- Perng, M.D., L. Cairns, I.P. van den, A. Prescott, A.M. Hutcheson, and R.A. Quinlan. 1999. Intermediate filament interactions can be altered by HSP27 and alphaB-crystallin. *J Cell Sci.* 112 (Pt 13):2099-112.
- Perng, M.D., and R.A. Quinlan. 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., A. Sandilands, J. Kuszak, R. Dahm, A. Wegener, A.R. Prescott, and R.A. Quinlan. 2004a. The intermediate filament systems in the eye lens. *Methods Cell Biol.* 78:597-624.
- Perng, M.D., S.F. Wen, I.P. van den, A.R. Prescott, and R.A. Quinlan. 2004b. Desmin aggregate formation by R120G alphaB-crystallin is caused by altered filament interactions and is dependent upon network status in cells. *Mol Biol Cell.* 15:2335-46.
- Petersen, A., M. Zetterberg, J. Sjostrand, and J.O. Karlsson. 2004. A new model for assessing proteolysis in the intact mouse lens in organ culture. *Ophthalmic Res.* 36:25-30.
- Prescott, A.R., A. Sandilands, A.M. Hutcheson, J.M. Carter, and R.A. Quinlan. 1996. The intermediate filament cytoskeleton of the lens: an ever changing network through development and differentiation. A minireview. *Ophthalmic Res.* 28 Suppl 1:58-61.
- Quinlan, M.P., and J.L. Douglas. 1992. Immortalization of primary epithelial cells requires first- and second-exon functions of adenovirus type 5 12S. *J Virol.* 66:2020-30.
- Quinlan, R.A., J.A. Cohlberg, D.L. Schiller, M. Hatzfeld, and W.W. Franke. 1984. Heterotypic tetramer (A2D2) complexes of non-epidermal keratins isolated from cytoskeletons of rat hepatocytes and hepatoma cells. *J Mol Biol.* 178:365-88.
- Quinlan, R.A., and W.W. Franke. 1982. Heteropolymer filaments of vimentin and desmin in vascular smooth muscle tissue and cultured baby hamster kidney cells demonstrated by chemical crosslinking. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79:3452-6.
- Quinlan, R.A., and W.W. Franke. 1983. Molecular interactions in intermediate-sized filaments revealed by chemical cross-linking. Heteropolymers of vimentin and glial filament protein in cultured human glioma cells. *Eur J Biochem.* 132:477-84.

- Quinlan, R.A., M. Hatzfeld, W.W. Franke, A. Lustig, T. Schulthess, and J. Engel. 1986. Characterization of dimer subunits of intermediate filament proteins. *J Mol Biol.* 192:337-49.
- Ralton, J.E., X. Lu, A.M. Hutcheson, and R.A. Quinlan. 1994. Identification of two N-terminal non-alpha-helical domain motifs important in the assembly of glial fibrillary acidic protein. *J Cell Sci.* 107 (Pt 7):1935-48.
- Ramaekers, F.C., M. Osborn, E. Schmid, K. Weber, H. Bloemendal, and W.W. Franke. 1980. Identification of the cytoskeletal proteins in lens-forming cells, a special epitheloid cell type. *Exp Cell Res.* 127:309-27.
- Rao, M.V., M.K. Houseweart, T.L. Williamson, T.O. Crawford, J. Folmer, and D.W. Cleveland. 1998. Neurofilament-dependent radial growth of motor axons and axonal organization of neurofilaments does not require the neurofilament heavy subunit (NF-H) or its phosphorylation. *J Cell Biol.* 143:171-81.
- Reichelt, J., C. Bauer, R. Porter, E. Lane, and V. Magin. 1997. Out of balance: consequences of a partial keratin 10 knockout. *J Cell Sci.* 110 (Pt 18):2175-86.
- Reichelt, J., H. Bussow, C. Grund, and T.M. Magin. 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.
- Reichelt, J., T. Doering, E. Schnetz, M. Fartasch, K. Sandhoff, and A.M. Magin. 1999. Normal ultrastructure, but altered stratum corneum lipid and protein composition in a mouse model for epidermolytic hyperkeratosis. *J Invest Dermatol.* 113:329-34.
- Reichenbach, A., F. Faude, V. Enzmann, A. Bringmann, T. Pannicke, M. Francke, B. Biedermann, H. Kuhrt, J.U. Stolzenburg, S.N. Skatchkov, U. Heinemann, P. Wiedemann, and W. Reichelt. 1997. The Muller (glial) cell in normal and diseased retina: a case for single-cell electrophysiology. *Ophthalmic Res.* 29:326-40.
- Rittling, S.R., and R. Baserga. 1987. Functional analysis and growth factor regulation of the human vimentin promoter. *Mol Cell Biol.* 7:3908-15.
- Rittling, S.R., L. Coutinho, T. Amram, and M. Kolbe. 1989. AP-1/jun binding sites mediate serum inducibility of the human vimentin promoter. *Nucleic Acids Res.* 17:1619-33.
- Rodriguez, D., F. Gauthier, E. Bertini, M. Bugiani, M. Brenner, S. N'Guyen, C. Goizet, A. Gelot, R. Surtees, J.M. Pedespan, X. Hernandez, M. Troncoso, G. Uziel, A. Messing, G. Ponsot, D. Pham-Dinh, A. Dautigny, and O. Boespflug-Tanguy. 2001. Infantile Alexander disease: spectrum of GFAP mutations and genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet.* 69:1134-40.
- Rugg, E.L., W.H. McLean, E.B. Lane, R. Pitera, J.R. McMillan, P.J. Dopping-Hepenstal, H.A. Navsaria, I.M. Leigh, and R.A. Eady. 1994. A functional "knockout" of human keratin 14. *Genes Dev.* 8:2563-73.
- Runembert, I., S. Couette, P. Federici, E. Colucci-Guyon, C. Babinet, P. Briand, G. Friedlander, and F. Terzi. 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., G. Queffeuilou, P. Federici, F. Vrtovnik, E. Colucci-Guyon, C. Babinet, P. Briand, G. Trugnan, G. Friedlander, and F. Terzi. 2002. Vimentin affects localization and activity of sodium-glucose cotransporter SGLT1 in membrane rafts. *J Cell Sci.* 115:713-24.
- Sadowski, P.D. 1995. The Flp recombinase of the 2-microns plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 51:53-91.
- Sahel, J.A., D.M. Albert, and S. Lessell. 1990. [Proliferation of retinal glia and excitatory amino acids]. *Ophthalmologie.* 4:13-6.
- Sanderson, J., J.M. Marcantonio, and G. Duncan. 2000. A human lens model of cortical cataract: Ca²⁺-induced protein loss, vimentin cleavage and opacification. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41:2255-61.

- Sandilands, A., A.M. Hutcheson, H.A. Long, A.R. Prescott, G. Vrensen, J. Loster, N. Klopp, R.B. Lutz, J. Graw, S. Masaki, C.M. Dobson, C.E. MacPhee, and R.A. Quinlan. 2002. Altered aggregation properties of mutant gamma-crystallins cause inherited cataract. *Embo J.* 21:6005-14.
- Sandilands, A., S. Masaki, and R.A. Quinlan. 1998. Lens intermediate filament proteins. *Subcell Biochem.* 31:291-318.
- Sandilands, A., A.R. Prescott, J.M. Carter, A.M. Hutcheson, R.A. Quinlan, J. Richards, and P.G. FitzGerald. 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., A.R. Prescott, A.M. Hutcheson, R.A. Quinlan, J.T. Casselman, and P.G. FitzGerald. 1995b. Filensin is proteolytically processed during lens fiber cell differentiation by multiple independent pathways. *Eur J Cell Biol.* 67:238-53.
- Sandilands, A., X. Wang, A.M. Hutcheson, J. James, A.R. Prescott, A. Wegener, M. Pekny, X. Gong, and R.A. Quinlan. 2004. Bfsp2 mutation found in mouse 129 strains causes the loss of CP49 and induces vimentin-dependent changes in the lens fibre cell cytoskeleton. *Exp Eye Res.* 78:109-23.
- Sarthy, P.V., M. Fu, and J. Huang. 1989. Subcellular localization of an intermediate filament protein and its mRNA in glial cells. *Mol Cell Biol.* 9:4556-9.
- Sax, C.M., F.X. Farrell, J.A. Tobian, and Z.E. Zehner. 1988. Multiple elements are required for expression of an intermediate filament gene. *Nucleic Acids Res.* 16:8057-76.
- Schietke, R., D. Brohl, T. Wedig, N. Mucke, H. Herrmann, and T.M. Magin. 2006. Mutations in vimentin disrupt the cytoskeleton in fibroblasts and delay execution of apoptosis. *Eur J Cell Biol.* 85:1-10.
- Schweitzer, S.C., and R.M. Evans. 1998. Vimentin and lipid metabolism. *Subcell Biochem.* 31:437-62.
- Seiler, M., and J.E. Turner. 1988. The activities of host and graft glial cells following retinal transplantation into the lesioned adult rat eye: developmental expression of glial markers. *Brain Res.* 471:111-22.
- Silver, L. 1995. Mouse Genetics. Concepts and Applications. Oxford University Press.
- Soellner, P., R.A. Quinlan, and W.W. Franke. 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.
- Sriram, K., S.A. Benkovic, M.A. Hebert, D.B. Miller, and J.P. O'Callaghan. 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.
- Straub, B.K., J. Boda, C. Kuhn, M. Schnoelzer, U. Korf, T. Kempf, H. Spring, M. Hatzfeld, and W.W. Franke. 2003. A novel cell-cell junction system: the cortex adhaerens mosaic of lens fiber cells. *J Cell Sci.* 116:4985-95.
- Strelkov, S.V., H. Herrmann, and U. Aebi. 2003. Molecular architecture of intermediate filaments. *Bioessays.* 25:243-51.
- Strelkov, S.V., H. Herrmann, N. Geisler, A. Lustig, S. Ivaninskii, R. Zimbelmann, P. Burkhard, and U. Aebi. 2001. Divide-and-conquer crystallographic approach towards an atomic structure of intermediate filaments. *J Mol Biol.* 306:773-81.
- Strelkov, S.V., H. Herrmann, N. Geisler, T. Wedig, R. Zimbelmann, U. Aebi, and P. Burkhard. 2002. Conserved segments 1A and 2B of the intermediate filament dimer: their atomic structures and role in filament assembly. *Embo J.* 21:1255-66.
- Strelkov, S.V., L. Kreplak, H. Herrmann, and U. Aebi. 2004a. Intermediate filament protein structure determination. *Methods Cell Biol.* 78:25-43.

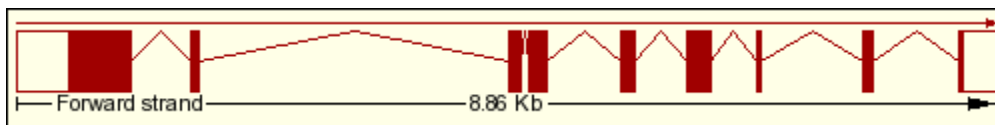
- Strelkov, S.V., J. Schumacher, P. Burkhard, U. Aebi, and H. Herrmann. 2004b. Crystal structure of the human lamin A coil 2B dimer: implications for the head-to-tail association of nuclear lamins. *J Mol Biol.* 343:1067-80.
- Styers, M.L., G. Salazar, R. Love, A.A. Peden, A.P. Kowalczyk, and V. Faundez. 2004. The endo-lysosomal sorting machinery interacts with the intermediate filament cytoskeleton. *Mol Biol Cell.* 15:5369-82.
- Su, M., H. Hu, Y. Lee, A. d'Azzo, A. Messing, and M. Brenner. 2004. Expression specificity of GFAP transgenes. *Neurochem Res.* 29:2075-93.
- Sueishi, K., Y. Hata, T. Murata, K. Nakagawa, T. Ishibashi, and H. Inomata. 1996. Endothelial and glial cell interaction in diabetic retinopathy via the function of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Pol J Pharmacol.* 48:307-16.
- Sullivan, T., D. Escalante-Alcalde, H. Bhatt, M. Anver, N. Bhat, K. Nagashima, C.L. Stewart, and B. Burke. 1999. Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J Cell Biol.* 147:913-20.
- Sun, Y., and T.H. MacRae. 2005. The small heat shock proteins and their role in human disease. *Febs J.* 272:2613-27.
- Svitkina, T.M., A.B. Verkhovsky, and G.G. Borisy. 1996. Plectin sidearms mediate interaction of intermediate filaments with microtubules and other components of the cytoskeleton. *J Cell Biol.* 135:991-1007.
- Takamiya, Y., S. Kohsaka, S. Toya, M. Otani, and Y. Tsukada. 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.
- Takeuchi, K., K. Sakurada, H. Endou, M. Obinata, and M.P. Quinlan. 2002. Differential effects of DNA tumor virus genes on the expression profiles, differentiation, and morphogenetic reprogramming potential of epithelial cells. *Virology.* 300:8-19.
- Tatzelt, J., N. Maeda, M. Pekny, S.L. Yang, C. Betsholtz, C. Eliasson, J. Cayetano, A.P. Camerino, S.J. DeArmond, and S.B. Prusiner. 1996. Scrapie in mice deficient in apolipoprotein E or glial fibrillary acidic protein. *Neurology.* 47:449-53.
- Tawk, M., M. Titeux, C. Fallet, Z. Li, C. Daumas-Duport, L.A. Cavalcante, D. Paulin, and V. Moura-Neto. 2003. Synemin expression in developing normal and pathological human retina and lens. *Exp Neurol.* 183:499-507.
- Terzi, F., M. Burtin, and G. Friedlander. 2000. Using transgenic mice to analyze the mechanisms of progression of chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 11 Suppl 16:S144-8.
- Terzi, F., D. Henrion, E. Colucci-Guyon, P. Federici, C. Babinet, B.I. Levy, P. Briand, and G. Friedlander. 1997a. Reduction of renal mass is lethal in mice lacking vimentin. Role of endothelin-nitric oxide imbalance. *J Clin Invest.* 100:1520-8.
- Terzi, F., R. Maunoury, E. Colucci-Guyon, C. Babinet, P. Federici, P. Briand, and G. Friedlander. 1997b. Normal tubular regeneration and differentiation of the post-ischemic kidney in mice lacking vimentin. *Am J Pathol.* 150:1361-71.
- Toivola, D.M., M.I. Nieminen, M. Hesse, T. He, H. Baribault, T.M. Magin, M.B. Omary, and J.E. Eriksson. 2001. Disturbances in hepatic cell-cycle regulation in mice with assembly-deficient keratins 8/18. *Hepatology.* 34:1174-83.
- Toivola, D.M., G.Z. Tao, A. Habtezion, J. Liao, and M.B. Omary. 2005. Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends Cell Biol.* 15:608-17.
- Toivola, D.M., Q. Zhou, L.S. English, and M.B. Omary. 2002. Type II keratins are phosphorylated on a unique motif during stress and mitosis in tissues and cultured cells. *Mol Biol Cell.* 13:1857-70.

- Tzivion, G., Z.J. Luo, and J. Avruch. 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.
- Uyama, N., L. Zhao, E. Van Rossen, Y. Hirako, H. Reynaert, D.H. Adams, Z. Xue, Z. Li, R. Robson, M. Pekny, and A. Geerts. 2006. Hepatic stellate cells express synemin, a protein bridging intermediate filaments to focal adhesions. *Gut.*
- van der Knaap, M.S., G.S. Salomons, R. Li, E. Franzoni, L.G. Gutierrez-Solana, L.M. Smit, R. Robinson, C.D. Ferrie, B. Cree, A. Reddy, N. Thomas, B. Banwell, F. Barkhof, C. Jakobs, A. Johnson, A. Messing, and M. Brenner. 2005. Unusual variants of Alexander's disease. *Ann Neurol.* 57:327-38.
- van Hemert, M.J., H.Y. Steensma, and G.P. van Heusden. 2001. 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *Bioessays.* 23:936-46.
- Vassar, R., P.A. Coulombe, L. Degenstein, K. Albers, and E. Fuchs. 1991. Mutant keratin expression in transgenic mice causes marked abnormalities resembling a human genetic skin disease. *Cell.* 64:365-80.
- Vicart, P., A. Caron, P. Guicheney, Z. Li, M.C. Prevost, A. Faure, D. Chateau, F. Chapon, F. Tome, J.M. Dupret, D. Paulin, and M. Fardeau. 1998. A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat Genet.* 20:92-5.
- Wakabayashi, T., A. Messing, and M. Brenner. 1999. Nonlethal detection of transgene expression in the CNS of founder mice. *Biotechniques.* 26:302-4, 306-7.
- Wei, C.J., X. Xu, and C.W. Lo. 2004. Connexins and cell signaling in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20:811-38.
- Werner, N.S., R. Windoffer, P. Strnad, C. Grund, R.E. Leube, and T.M. Magin. 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.
- Wickert, U., N. Mucke, T. Wedig, S.A. Muller, U. Aebi, and H. Herrmann. 2005. Characterization of the in vitro co-assembly process of the intermediate filament proteins vimentin and desmin: mixed polymers at all stages of assembly. *Eur J Cell Biol.* 84:379-91.
- Wilhelmsen, K., S.H. Litjens, I. Kuikman, N. Tshimbalanga, H. Janssen, I. van den Bout, K. Raymond, and A. Sonnenberg. 2005. Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin. *J Cell Biol.* 171:799-810.
- Wilhelmsson, U., C. Eliasson, R. Bjerkvig, and M. Pekny. 2003. Loss of GFAP expression in high-grade astrocytomas does not contribute to tumor development or progression. *Oncogene.* 22:3407-11.
- Wilhelmsson, U., L. Li, M. Pekna, C.H. Berthold, S. Blom, C. Eliasson, O. Renner, E. Bushong, M. Ellisman, T.E. Morgan, and M. Pekny. 2004. Absence of glial fibrillary acidic protein and vimentin prevents hypertrophy of astrocytic processes and improves post-traumatic regeneration. *J Neurosci.* 24:5016-21.
- Wojcik, S.M., D.S. Bundman, and D.R. Roop. 2000. Delayed wound healing in keratin 6a knockout mice. *Mol Cell Biol.* 20:5248-55.
- Wojcik, S.M., S. Imakado, T. Seki, M.A. Longley, L. Petherbridge, D.S. Bundman, J.R. Bickenbach, J.A. Rothnagel, and D.R. Roop. 1999. Expression of MK6a dominant-negative and C-terminal mutant transgenes in mice has distinct phenotypic consequences in the epidermis and hair follicle. *Differentiation.* 65:97-112.
- Wong, P., E. Colucci-Guyon, K. Takahashi, C. Gu, C. Babinet, and P.A. Coulombe. 2000. Introducing a null mutation in the mouse K6alpha and K6beta genes reveals their essential structural role in the oral mucosa. *J Cell Biol.* 150:921-8.

- Wong, W.K., A.W. Cheung, and E.Y. Cho. 2006. Lens epithelial cells promote regrowth of retinal ganglion cells in culture and in vivo. *Neuroreport*. 17:699-704.
- Wride, M.A., J. Geatrell, and J.A. Guggenheim. 2006. Proteases in eye development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 78:90-105.
- Yin, X., S. Gu, and J.X. Jiang. 2001a. The development-associated cleavage of lens connexin 45.6 by caspase-3-like protease is regulated by casein kinase II-mediated phosphorylation. *J Biol Chem*. 276:34567-72.
- Yin, X., S. Gu, and J.X. Jiang. 2001b. Regulation of lens connexin 45.6 by apoptotic protease, caspase-3. *Cell Commun Adhes*. 8:373-6.
- Yoneda, K., T. Furukawa, Y.J. Zheng, T. Momoi, I. Izawa, M. Inagaki, M. Manabe, and N. Inagaki. 2004. An autocrine/paracrine loop linking keratin 14 aggregates to tumor necrosis factor alpha-mediated cytotoxicity in a keratinocyte model of epidermolysis bullosa simplex. *J Biol Chem*. 279:7296-303.
- Zandy, A.J., S. Lakhani, T. Zheng, R.A. Flavell, and S. Bassnett. 2005. Role of the executioner caspases during lens development. *J Biol Chem*. 280:30263-72.
- Zastrow, M.S., S. Vlcek, and K.L. Wilson. 2004. Proteins that bind A-type lamins: integrating isolated clues. *J Cell Sci*. 117:979-87.
- Zetterberg, M., A. Petersen, J. Sjostrand, and J. Karlsson. 2003. Proteasome activity in human lens nuclei and correlation with age, gender and severity of cataract. *Curr Eye Res*. 27:45-53.
- Zhu, Q., M. Lindenbaum, F. Levavasseur, H. Jacomy, and J.P. Julien. 1998. Disruption of the NF-H gene increases axonal microtubule content and velocity of neurofilament transport: relief of axonopathy resulting from the toxin beta,beta'-iminodipropionitrile. *J Cell Biol*. 143:183-93.
- Zhuo, L., M. Theis, I. Alvarez-Maya, M. Brenner, K. Willecke, and A. Messing. 2001. hGFAP-cre transgenic mice for manipulation of glial and neuronal function in vivo. *Genesis*. 31:85-94.

Transkriptionsstruktur des Vimentin-Gens (*mus musculus*), Transkriptionssequenz und Lage der Mutation VimR₁₁₃C und der Deletion VimΔC2B

Maus Vimentin Gen Transkriptionsstruktur:



Maus Vimentin Gen Transkript:

```

1  CCACGCCCTTTGGCCCAGTGCCAGGGATCGCTTTACTCAACTTTCCAGAGCCCCCTTC
   .....
61  CTTCCCCCATGAATCCTTCCC CGGATCCCTTCTTTCTCAGCACCCAAGGGTGAGTAGAGA
   .....
121 GTTCGGGTGATCACCAGGAAAGCCCCTGAAAGGCCTAGCACTTCCAATTAGTAACAGGAC
   .....
181 TGTGCTTGATACCCTACAGCCCTGGAGGAAGGCTCGAGGGGAGCTCCCTCCCCACCCCC
   .....
241 CTTCTCACTTCTTTCCGGGTCCCCATTGGCTGGCTCGCTCGGCGGCTAGGATGGCAGTG
   .....
301 GGAGGGGACCCTCTTTCCTAACAGTGTTATAAAAGCAGCGCCCTTGGCGTTGTCCAGTCC
   .....
361 TCTGCCACTCTTGCTCCGGGACCCCAGAGACCCAGCGCTCCTACGATTCACAGCCACCG
   .....
421 CGCCCTCATTCCCTTGTTGCAGTTTTTCCAGCCGCAGCAAGCCAGCCCACCTTCGAAGCC
   .....
   ↳ Kopfdomäne
481 ATGTCTACCAGGTCTGTGTCCCTCGTCCCTCCTACCGCAGGATGTTTCGGTGGCTCCGGCACA
   1  -M--S--T--R--S--V--S--S--S--S--Y--R--R--M--F--G--G--S--G--T--

541 TCGAGCCGGGCCAGCTCCAACCGGAGCTATGTGACCACGTCCACACGCACCTACAGTCTG
   21  -S--S--R--P--S--S--N--R--S--Y--V--T--T--S--T--R--T--Y--S--L--

601 GGCAGCGCACTGCGCCCCAGCACTAGCCGCAGCCTCTATTCTCATCCCCGGTGGCGCC
   41  -G--S--A--L--R--P--S--T--S--R--S--L--Y--S--S--S--P--G--G--A--

```


661 TATGTGACCCGGTCTCTCGGCAGTGCGCCTGCGGAGCAGCGTGCCGGGGCTGCGGCTGCTT
 61 -Y--V--T--R--S--S--A--V--R--L--R--S--S--V--P--G--V--R--L--L-

721 CAAGACTCGGTGGACTTCTCGCTGGCCGACGCCATCAACACTGAGTTCAAGAACACCCGC
 81 -Q--D--S--V--D--F--S--L--A--D--A--I--N--T--E--F--K--N--T--R-



"coil 1A"

R₁₁₃C



781 ACCAACGAGAAGGTAGAAGTGCAGGAGCTGAATGACCGCTTTTGCCAACTACATCGACAAG
 101 -T--N--E--K--V--E--L--Q--E--L--N--D--R--F--A--N--Y--I--D--K-

841 GTGCGCTTCCTCGAGCAGCAGAACAATACTGCTGGCTGAGCTCGAGCAGCTCAAGGGC
 121 -V--R--F--L--E--Q--Q--N--K--I--L--L--A--E--L--E--Q--L--K--G-

L1

901 CAGGGCAAGTCGCGCCTGGGGCAGCTGTACGAGGAGGAGATGCGGGAGCTGCGCCGGCAG
 141 -Q--G--K--S--R--L--G--D--L--Y--E--E--E--M--R--E--L--R--R--Q-

961 GTGGATCAGCTCACCAACGACAAGGCCCGTGTGCGAGGTGGAGCGGGACAACCTGGCCGAG
 161 -V--D--Q--L--T--N--D--K--A--R--V--E--V--E--R--D--N--L--A--E-

"coil 1B"

1021 GACATCATGCGGCTGCGAGAGAAATTGCAGGAGGAGATGCTCCAGAGAGAGGAAGCCGAA
 181 -D--I--M--R--L--R--E--K--L--Q--E--E--M--L--Q--R--E--E--A--E-

1081 AGCACCTGCAGTCATTTCAGACAGGATGTTGACAATGCTTCTCTGGCACGTCTTGACCTT
 201 -S--T--L--Q--S--F--R--Q--D--V--D--N--A--S--L--A--R--L--D--L-

1141 GAACGGAAAGTGAATCCTTTCAGGAAGAAATTGCCTTTTTTGAAGAACTGCACGATGAA
 221 -E--R--K--V--E--S--L--Q--E--E--I--A--F--L--K--K--L--H--D--E-

L12

1201 GAGATCCAGGAGCTGCGAGGCCAGATTTCAGGAACAGCATGTCAGATCGATGTGGACGTT
 241 -E--I--Q--E--L--Q--A--Q--I--Q--E--Q--H--V--Q--I--D--V--D--V-

"coil 2A"

1261 TCCAAGCCTGACCTCACTGCTGCCCTGCGTGATGTGCGCCAGCAGTATGAAAGCGTGGCT
 261 -S--K--P--D--L--T--A--A--L--R--D--V--R--Q--Q--Y--E--S--V--A-

L2



1321 GCCAAGAACCTCCAGGAGGCCGAGGAATGGTACAAGTCCAAGTTTGCTGACCTCTCTGAG
 281 -A--K--N--L--Q--E--A--E--E--W--Y--K--S--K--F--A--D--L--S--E-

1381 GCTGCCAACCAGGAACAACGATGCCCTGCGCCAGGCCAAGCAGGAGTCAAACGAGTACCGG
 301 -A--A--N--R--N--N--D--A--L--R--Q--A--K--Q--E--S--N--E--Y--R-

"coil 2B"

1441 AGACAGGTGCAGTCACTCACCTGTGAAGTGGATGCCCTTAAAGGCACTAACGAGTCCCTG
 321 -R--Q--V--Q--S--L--T--C--E--V--D--A--L--K--G--T--N--E--S--L-

1501 GAGCGCCAGATGCGTGAGATGGAAGAGAATTTTTGCCCTTGAAGCTGCTAACTACCAGGAC
 341 -E--R--Q--M--R--E--M--E--E--N--F--A--L--E--A--A--N--Y--Q--D-

1561 ACTATTGGCCGCCTGCAGGATGAGATCCAAAACATGAAGGAAGAGATGGCTCGTCACCTT
 361 -T--I--G--R--L--Q--D--E--I--Q--N--M--K--E--E--M--A--R--H--L-

1621 CGTGAATACCAAGATCTGCTCAATGTTAAGATGGCCCTGGACATTGAGATCGCCACCTAC
 381 -R--E--Y--Q--D--L--L--N--V--K--M--A--L--D--I--E--I--A--T--Y-



Schwanzdomäne

1681 AGGAAGCTGCTGGAAGGCGAGGAGAGCAGGATTTCTCTGCCTCTGCCAACCTTTTCTTCC
 401 -R--K--L--L--E--G--E--E--S--R--I--S--L--P--L--P--T--F--S--S-

1741 CTGAACCTGAGAGAAACTAACCTGGAGTCACTTCTCTGGTTGACACCCACTCAAAAAGA
 421 -L--N--L--R--E--T--N--L--E--S--L--P--L--V--D--T--H--S--K--R-



1801 ACACTCCTGATTAAGACGGTTGAGACCAGAGATGGACAGGTGATCAATGAGACTTCTCAG
 441 -T--L--L--I--K--T--V--E--T--R--D--G--Q--V--I--N--E--T--S--Q-

1861 CATCACGATGACCTTGAATAAAAATTGCACACACTTGGTGCAACAGTGCAGTACCAGCAA
 461 -H--H--D--D--L--E--*--.....

1921 GAAGGAAAAAAAAAATCGTATCTTAGGAAAACAGCTTTCAAGTGCTTTACTGCAGTTTTT

1981 CAGGAGCGCAAGATAGATTTGGAATAGAAAAGAAGCTCAGCACTTAACAACCTGACACCCCA

2041 AAAGACGTAGAAAAGGTTTACAAAATAATCTAGTTTACGAAGAAATCTTGTGCTAGAATA

2101 CTTTTTAAAGTATTTTTGAATACCATTAAAACCTGCTTTTTTCCAGTAAATATCTGACCAA

2161 CTTGTTACTGCTTC

L1, L12 und L2 = Linker

modifiziert nach Ensembl Transcript ID: ENSMUST00000028062

Alternierende schwarze und blaue Schrift der Basenpaarsequenz markieren die 9 Exons des Vimentin Gens.

Transkript Information:

Exons: 9

Transkript Länge: 2,174 Bp

Translations Länge: 466 Aminosäuren

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Thomas M. Magin, Institut für Physiologische Chemie der Universität Bonn, danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas dieser Arbeit, die Möglichkeit zur Durchführung des experimentellen Teils in seinen Laboratorien und seine stetige Unterstützung.

Prof. Dr. Michael Hoch, Institut für Molekulare Physiologie und Entwicklungsbiologie der Universität Bonn, danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Bei Prof. Dr. Heinrich Büssow, Institut für Anatomie der Universität Bonn, bedanke ich mich für die fachlichen Diskussionen und die technische Unterstützung.

Bei PD Dr. A. Wegener, Institut für Experimentelle Ophthalmologie, Zentrum für Augenheilkunde am Universitätsklinikum Bonn, danke ich für die Unterstützung bei der Augenuntersuchung der transgenen Mäuse.

Frau Silke Loch und Frau Uschi Reuter danke ich für die ausgezeichnete technische Unterstützung und die sehr gute Zusammenarbeit.

Bei allen jetzigen und ehemaligen Kollegen der Arbeitsgruppe Magin und allen Mitarbeitern des Maushaus-Teams, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich für die freundschaftliche Atmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau Claudia für ihr Verständnis, ihre stetige Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass diese Dissertation von mir selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt. Ferner erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht wurde.

Bonn, Juli 2006

Roland Meier-Bornheim