

Aus dem Leibniz-Institut für Arterioskleroseforschung an der  
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster  
Department für Zellbiologie und Ultrastrukturforschung  
Institutsleiter: Univ.-Prof. Dr. H. Robenek

**LOKALISATION VON PROTEINEN IN KERNMEMBRANEN MIT DER SDS-  
GEFRIERBRUCH-IMMUNZYTOCHEMIE**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur  
Erlangung des doctor medicinae dentium  
der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von  
Becker, Claudia  
aus Berlin

2008

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan:

Univ.-Prof. Dr. V. Arolt

Erster Berichterstatter:

Univ.-Prof. Dr. H. Robenek

Zweiter Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. A. Büchter

Tag der mündlichen Prüfung:

18.02.2008

Aus dem Leibniz-Institut für Arterioskleroseforschung an der  
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster  
Department für Zellbiologie und Ultrastrukturforschung  
Referent: Univ.-Prof. Dr. H. Robenek  
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. A. Büchter

## ZUSAMMENFASSUNG

### LOKALISATION VON PROTEINEN IN KERNMEMBRANEN MIT DER SDS- GEFRIERBRUCH-IMMUNZYTOCHEMIE

Claudia Becker

Diese Arbeit verfolgte das Ziel, mit Hilfe der Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)-Gefrierbruch-Immunzytochemie neue Erkenntnisse über die Expression und Lokalisation von Proteinen in Kernmembranen zu gewinnen. Die Untersuchungen konzentrierten sich auf die Proteine LAP2 $\beta$ , Emerin, Caveolin-1 und Adipophilin in humanen arteriellen glatten Muskelzellen, Endothelzellen, Makrophagen und Fibroblasten. Grundlage der SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie bildet die elektronenmikroskopische Darstellung der Proteine in Platin/Kohle Replikas von Bruchflächen der Kernmembranen mittels primärer und goldmarkierter sekundärer Antikörper.

Insgesamt lassen sich vier Membranbruchflächen der Kernhülle unterscheiden: die dem Zytoplasma zugewandte Bruchfläche (PF) der äußeren Kernmembran ist durch ihre konkave Form zu identifizieren, während die der perinukleären Zisterne zugewandte Bruchfläche (EF) konvex geformt ist. Die dem Karyoplasma zugewandte Bruchfläche (PF) der inneren Kernmembran ist durch eine konvexe Form gekennzeichnet, während die der perinukleären Zisterne zugewandte Bruchfläche (EF) konkav geformt ist.

LAP2 $\beta$  und Emerin sind ausschließlich auf den P-Hälften der inneren Kernmembranen lokalisiert. Caveolin-1 ist ausschließlich auf den E-Hälften sowohl der inneren als auch der äußeren Kernmembranen lokalisiert. Endogenes natives Adipophilin ist in THP1 Makrophagen ausschließlich auf den P-Hälften der äußeren Kernmembranen vorhanden. Im Gegensatz dazu fand sich in NPC Fibroblasten und THP1 Makrophagen, die mit Adipophilin-GFP bzw einem Adipophilin-Deletionskonstrukt-GFP transient transfiziert wurden, die Immungoldmarkierung auf allen vier möglichen Bruchflächen der Kernmembranen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass mit der SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie Unterschiede in der Verteilung von Proteinen in den Kernmembranen präzise lokalisiert werden können. Ferner kann die spezifische Membranhälfte eindeutig identifiziert werden, in der ein Protein integriert ist. Am Beispiel von Adipophilin konnte gezeigt werden, dass seine Kopplung an GFP zu einer Umverteilung und einer Umorientierung in den Kernmembranen von transfizierten Zellen führen kann.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass die SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie bei der Darstellung von Membranen allen bisherigen Methoden überlegen ist und zur Zeit die Methode der Wahl bei der Lokalisation von Membran-Proteinen in situ darstellt.

Tag der mündlichen Prüfung: 18.02.2008

meinem Vater gewidmet

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 STRUKTUR UND FUNKTION VON ZELLEN	1
1.1.1 Der prokaryotische und eukaryotische Zelltyp	1
1.1.2 Methoden zur Analyse der Zellstruktur	1
1.1.3 Zellorganellen und Membranen	2
1.1.4 Struktur und Funktion von Membranen	3
1.1.5 Der Zellkern und seine Membranen	6
1.2 METHODEN ZUR ANALYSE VON KERNMEMBRANEN	12
1.2.1 Konventionelle Gefrierbruchmethode und Nomenklatur	12
1.2.2 Natrium Dodecyl Sulfat-Gefrierbruch-Immunzytochemie	15
1.3 ZIELE DER ARBEIT	16
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>17</b>
2.1 ZELLKULTUR	17
2.1.1 Isolierung und Kultur von Zellen	17
2.1.1.1 Glatte Muskelzellen	17
2.1.1.2 Endothelzellen	18
2.1.1.3 Makrophagen	19
2.1.1.4 Fibroblasten	19
2.1.2 Transfektion	20
2.1.3 Zellzählung	21

2.2 ELEKTRONENMIKROSKOPIE	21
2.2.1 Aufarbeitung für Ultradünnschnitte	21
2.2.2 Kryoultramikrotomie	22
2.2.3 Gefrierbruch und Gefrierbruch-Immunzytochemie	23
2.2.3.1 Konventionelle Gefrierbruchmethode	23
2.2.3.2 Natrium Dodecyl Sulfat-Gefrierbruch- Immunzytochemie	23
2.2.4 Antikörper und Immungold	26
2.2.5 Bilddokumentation	26
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>28</b>
3.1 BRUCHFLÄCHEN DER KERNMEMBRANEN	28
3.2 LOKALISATION DER KERNMEMBRAN-PROTEINE	31
3.2.1 LAP2 $\beta$	31
3.2.2 Emerin	33
3.2.3 Caveolin-1	33
3.2.4 Endogenes Adipophilin in Makrophagen	38
3.2.5 Adipophilin-GFP nach Transfektion	40
3.2.5.1 Niemann-Pick Typ C Fibroblasten	40
3.2.5.2 Makrophagen	42
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>48</b>
4.1 METHODISCHE ASPEKTE	48
4.1.1 Konventionelle Transmissionselektronenmikroskopie	48
4.1.2 Kryoultramikrotomie	49

4.1.3 Gefrierbruchmethode	49
4.1.4 Gefrierbruch-Immunzytochemie	50
4.2 LOKALISATION DER KERNMEMBRAN-PROTEINE: EIN VERGLEICH	52
4.2.1 LAP2 $\beta$ und Emerin	52
4.2.2 Caveolin-1	53
4.2.3 Adipophilin und Adipophilin-GFP	54
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE</b>	<b>57</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>59</b>
<b>7. DANKSAGUNG</b>	<b>67</b>
<b>8. LEBENSLAUF</b>	<b>68</b>
<b>9. ERKLÄRUNG</b>	<b>69</b>



## 1. EINLEITUNG

### 1.1 STRUKTUR UND FUNKTION VON ZELLEN

#### 1.1.1 Der prokaryotische und eukaryotische Zelltyp

Zellen sind kleine, membranbegrenzte Kompartimente, die entweder als Einzeller oder im Verband eines multizellulären Organismus lebensfähig sind. Entsprechend ihrer Struktur kann man prokaryotische und eukaryotische Zellen unterscheiden. Prokaryonten (Bakterien und enge Verwandte) sind die einfachsten einzelligen Lebewesen, die aus einem strukturlosen zytoplasmatischen Kompartiment bestehen, welches von einer Plasmamembran eingeschlossen ist. Im Zytoplasma befinden sich DNA, RNA, Proteine und kleine Moleküle. Trotz ihrer relativ simplen Struktur können verschiedene Bakterienarten vielfältige Funktionen, wie zum Beispiel alle drei Hauptformen der Energiegewinnung (Glykolyse, Atmung und Photosynthese) ausführen.

Alle höher entwickelten Lebewesen bestehen aus eukaryotischen Zellen, welche auch den Untersuchungsgegenstand der hier vorliegenden Arbeit darstellen. Die weiteren Ausführungen beschränken sich deshalb auf diesen Zelltyp. Eukaryotische Zellen haben per definitionem und im Gegensatz zu prokaryotischen Zellen einen Zellkern.

#### 1.1.2 Methoden zur Analyse der Zellstruktur

Die Zelle ist die kleinste lebensfähige Einheit eines Organismus. Ihre strukturelle und funktionelle Integrität ist die Voraussetzung für gesundes Leben. Eine gestörte Zellfunktion führt zu einem pathologischen Zustand, zu einer Krankheit. Die Erforschung der Struktur und Funktion von Zellen und Geweben ist eine ständige Herausforderung in der Zellbiologie. Für einen auf diesem Gebiet tätigen Mediziner besteht dabei das Interesse insbesondere in der Aufklärung normaler und pathologischer Zusammenhänge in humanen Systemen. Die hier gewonnenen Erkenntnisse können wertvolle Beiträge für Prävention, Diagnose und Therapie von Erkrankungen leisten.

Eine lebende Zelle kann durch eine Vielzahl von Funktionen charakterisiert werden, die an definierten Zellstrukturen bzw. in Zellkompartimenten ablaufen. Zellstruktur und –funktion bilden eine dialektische Einheit. So können zum Beispiel strukturelle Veränderungen Ausdruck einer zuvor abgelaufenen biochemischen Reaktion sein, oder eine Strukturmodifizierung kann eine veränderte Funktion zur Folge haben. Zur Analyse dieser beiden Aspekte stehen verschiedene Methoden zur Verfügung.

Die klassischen Methoden der morphologischen Charakterisierung von Zellen ist die konventionelle Lichtmikroskopie. Diese Technik ist jedoch auf eine zweidimensionale Analyse begrenzt und lässt kaum Aussagen funktioneller Natur zu. Diese werden heutzutage hauptsächlich mit biochemischen oder molekularbiologischen Methoden erbracht. Solche Analysen erfordern meist eine vollständige Homogenisierung des Materials, wobei die Verbindung von Funktion und Struktur weitgehend verloren geht und Aussagen zur Funktion innerhalb zellulärer Kompartimente oder an bestimmten Strukturen nur sehr eingeschränkt möglich sind.

In den letzten Jahren findet daher eine neue elektronenmikroskopische Technik verstärkte Verbreitung in der Zellbiologie. Es handelt sich um das Verfahren der Natrium Dodecyl Sulfat(SDS)-Gefrierbruch-Immunzytochemie, welches neben einer verbesserten räumlichen Darstellung der Struktur von Zellen auch eine Analyse der Lokalisation von Proteinen in subzellulären Kompartimenten der Zellen gestattet. Diese Methode ermöglicht die Bearbeitung von zellbiologischen Fragestellungen, die mit den bisherigen Methoden nicht oder nur unbefriedigend gelöst werden konnten. Zum Beispiel kann mittels spezifischer Antikörper die dreidimensionale zelluläre Verteilung eines Proteins als solches oder in seiner Beziehung zu anderen Proteinen (Kokalisation) hochauflösend dargestellt werden.

### 1.1.3 Zellorganellen und Membranen

Prominente Strukturen einer Zelle sind die Organellen, das Zytosol und die Zellmembranen. Als Protoplasma bezeichnet man die gesamte strukturierte Substanz einer Zelle, die von der Plasmamembran umgeben wird. Bei eukaryotischen Zellen wird das Protoplasma unterteilt in Zytoplasma und

Karyoplasma. Das im Lichtmikroskop homogen erscheinende Grundplasma wird als Zytosol bezeichnet. Im Zytosol eingebettet finden sich die Organellen (zum Beispiel Zellkern, Mitochondrien, Golgi-Apparat, Zentriolen, Endoplasmatisches Retikulum etc.), von denen der Zellkern am auffälligsten ist. Besonders grosse und hochaktive Zellen können zwei oder mehrere Kerne besitzen. Die übrigen Zellorganellen sind, je nach Art und Zellfunktion, in wechselnder Menge ausgebildet. Da der Zellkern und insbesondere seine Membranen im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen, sollen sie detailliert beschrieben werden.

#### 1.1.4 Struktur und Funktion von Membranen

Lebende Organismen sind geordnete Systeme. Die Struktur oder Ordnung beginnt auf der Ebene der Atome und Moleküle, setzt sich auf der Ebene der Zellorganellen und Zellen fort und ist am komplexesten im Zusammenspiel der Organe in einem Organismus. In der Struktur zeigt sich immer auch die Information für die Funktion. Bindungen und Kräfte zwischen einzelnen Teilchen bestimmen die räumliche Anordnung von Molekülen und sind dadurch die Grundlage für die mikroskopische und die makroskopische Struktur. So führt die relativ schwache hydrophobe Wechselwirkung nach Lösung von amphiphilen Lipiden (zum Beispiel Phospholipiden) in wässriger Umgebung zur spontanen Ausbildung von Lipid-Bilayerstrukturen. Dieser hydrophobe Effekt (Tanford, 1978) ist die einzige organisierende Kraft, die zur spontanen Abgrenzung der hydrophoben Molekülteile der Membranlipide vom Wasser führt. Der Effekt ist die Grundlage für Bildung und Zusammenhalt der Biomembranen in Zellen und Zellorganellen. Da hierbei keine starken anziehenden Kräfte wirken, bleiben Biomembranen flüssig und deformierbar.

Biologische Membranen oder Biomembranen sind die jede Zelle umhüllende Plasmamembran und das zellkompartimentierende Membransystem der Zellorganellen. Alle Biomembranen bestehen aus einer nur ca. 5-6 nm dicken Lipid-Doppelschicht sowie ein- und angelagerten Membranproteinen (Abb. 1). Die Biomembran stellt eine mehr oder weniger undurchlässige Barriere für die meisten wasserlöslichen Moleküle dar. Seit den Versuchen von Gorter und Grendel (1925) mit isolierten Erythrozytenlipiden ist bekannt, dass Zellmembranen aus Lipid-Doppelschichten bestehen. Danielli und Davson

(1935) entwickelten ein Membranmodell, wonach auf beiden Seiten einer Lipid-Doppelschicht globuläre Proteine angeordnet sind. Sie erweiterten später das Modell um „entfaltete Proteine“, die den Kontakt zu den Lipiden herstellen sollten.

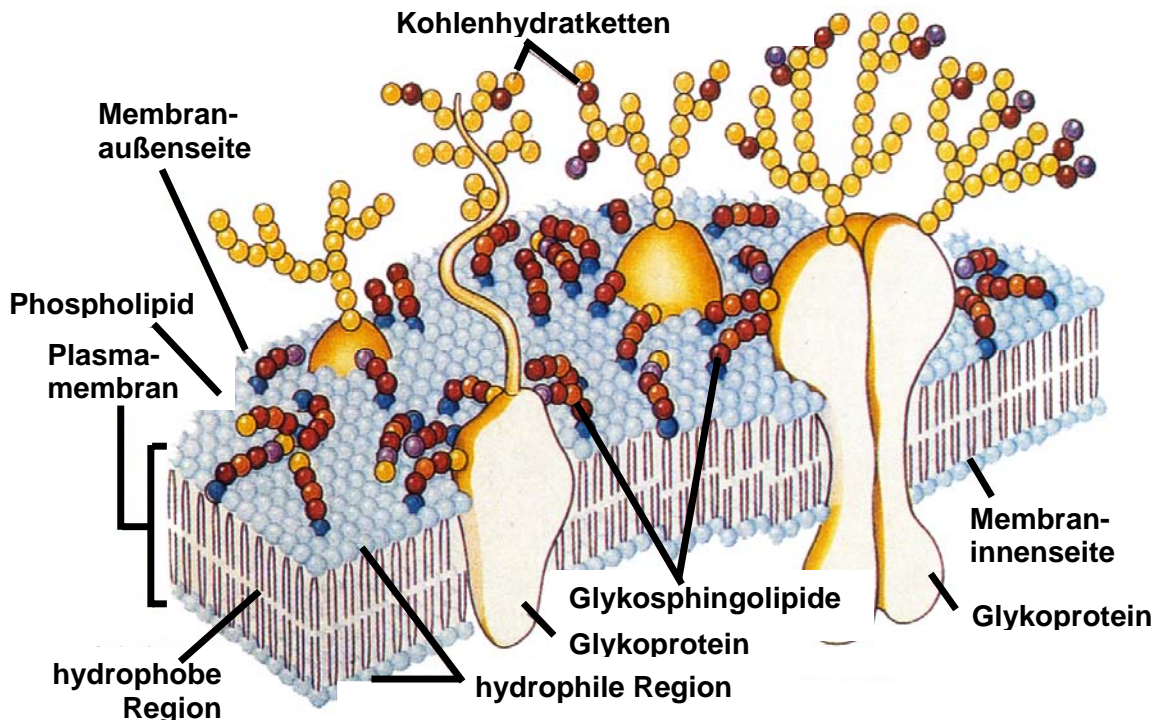


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer biologischen Membran. Die Grundstruktur aller Zellmembranen besteht aus zwei Schichten von Phospholipid-Molekülen. Die Kohlenwasserstoffketten der darin gebundenen Fettsäuren befinden sich im hydrophoben Innenbereich der Doppelschicht, während die hydrophilen Köpfe der Phospholipide beide Oberflächen säumen. Integrale Proteine sind mit einer Domäne oder über mehrere Abschnitte in die Lipiddoppelschicht eingebettet. Periphere Proteine werden über spezifische Wechselwirkungen an Membranproteine gebunden. Oligosaccharide sind als Bestandteile von Glykoproteinen anzutreffen oder bilden Glykolipide (Hakomori, 1986).

Nachdem man mittels Ultradünnschnitt-Elektronenmikroskopie nach Kaliumpermanganat- oder Osmiumtetroxid-Fixierung in Querschnitten die Zellmembran als Doppellinie auflösen konnte, wurde klar, dass alle Biomembranen die gleiche Grundstruktur aufweisen. Zwei 2 nm dicke elektronendichte Linien flankieren eine Linie von 3 nm Dicke. Diese einheitliche Struktur wurde als „unit membrane“ bezeichnet (Robertson, 1967). Heutige Modelle der Biomembran basieren auf dem Fluid-Mosaik-Modell von Singer und

Nicholson (1972). Es erklärt die Biomembran als Matrix aus einer Lipid-Doppelschicht im flüssig-kristallinen, fluiden Phasenzustand, in die lateral frei bewegliche Membranproteinkomplexe ein- oder angelagert sind.

Zu Anfang der 1970er Jahre konnte gezeigt werden, dass die beiden Membranhälften asymmetrisch zusammengesetzt sind (Bretscher, 1973). Während Cholesterol frei zwischen den beiden Hälften einer Lipid-Doppelschicht wechseln kann und daher in beiden Seiten zu finden ist (Bretscher und Munro, 1993), sind die Lipide Phosphatidylcholin und Sphingomyelin hauptsächlich in der extrazellulären Hälfte der Membranen lokalisiert. Hingegen sind Lipide wie Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin vorwiegend auf der zytosolischen Seite orientiert. Die asymmetrische Verteilung der Phospholipide wird bereits an ihrem Syntheseort, dem Endoplasmatischen Retikulum, erzeugt. Hier werden, durch das Protein Aminophospholipid-Translokase, ATP-abhängig spezifisch Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin auf die zytosolische Membranseite transportiert (Devaux und Zachowski, 1994).

Der Phasenzustand der Lipide in Biomembranen ist im Wesentlichen fluid („liquid-disordered“), das heißt, die Lipidmoleküle haben ungeordnete Acylketten und sind sehr mobil (Singer und Nicholson, 1972). Ipsen et al. (1987) führten die Nomenklatur „solid/liquid“ für die zweidimensionale Ordnung der Gesamtmoleküle und „ordered/disordered“ für die Konformationsordnung der Acylketten ein. Erste Evidenzen für die Existenz eines „liquid-ordered“ Gel-Phasenzustands mit eingeschränkter Beweglichkeit der Acylketten, jedoch mit hoher lateraler Mobilität der Lipidmoleküle, fanden Needham et al. (1988).

Seit einiger Zeit wird angenommen, dass in lebenden Zellen neben den dominierenden fluiden Membranbereichen („liquid-disordered“) auch Membrandomänen im „liquid-ordered“ Gel-Phasenzustand existieren. Diese Membran-Mikrodomänen enthalten, zusätzlich zu den Phospholipiden, Cholesterol und Glykosphingolipide. Sie werden als Lipid-Rafts bezeichnet (Simons und Ikonen, 1997; Brown und London, 1997; 1998; Simons und Toomre, 2000).

### 1.1.5 Der Zellkern und seine Membranen

Der Zellkern birgt nahezu die gesamte genetische Information der Zelle und wird zur Steuerzentrale der zytoplasmatischen Vorgänge und Zellfunktionen (Akhtar und Gasser, 2007). Die Gestalt des Zellkerns liegt nicht eindeutig fest; sie ändert sich, wenn die Zelle von der Interphase in die Teilungsphase (Mitose) übergeht. Nur die zwischen zwei Teilungsphasen befindliche Zelle, die hoch-aktive Interphase-Zelle, hat den membranumfassten Zellkern. Die in dieser Arbeit dargestellten Versuchsergebnisse zur Lokalisation der Proteine in den Kernmembranen beziehen sich ausschließlich auf Interphasekerne.

Die Zellkerne sind in Größe und Form variabel. Langgestreckte Zellen wie die in dieser Arbeit verwendeten arteriellen glatten Muskelzellen haben einen in Längsrichtung der Zelle orientierten ovalen Kern, während die Makrophagen einen mehr oder weniger runden, zentral gelegenen Kern besitzen (Abb. 2). Die Kerne der Fibroblasten (Abb. 3) und Endothelzellen haben eine langgestreckte bis elliptische Gestalt. In allen hier untersuchten Zelltypen sind die Kerne mehr oder weniger gelappt oder eingebuchtet.

Bei lichtmikroskopischer und elektronenmikroskopischer Untersuchung ist der Zellkern durch eine Kernmembran deutlich gegenüber dem Zytoplasma abgegrenzt (Abb. 2, 3). Im Inneren des Kerns liegt das Karyoplasma, das das Heterochromatin, Euchromatin und einen oder mehrere Nucleoli enthält. Das Heterochromatin besteht aus Chromosomen, die während des Fixierens miteinander verklumpt sind. Euchromatin sind optisch nicht in Erscheinung tretende Chromosomenanteile. Hetero- und Euchromatin ergeben zusammen das Chromatingerüst des Zellkerns. Als weitere Struktur enthält das Karyoplasma den oder die Nucleoli (Abb. 2). Nucleoli werden von bestimmten Chromosomen gebildet und dienen der Speicherung von RNA.

Der Kern ist von einer Kernhülle, die aus einer doppelten Membran besteht, umhüllt (Abb. 2). Hierbei umgibt die Innenmembran als typische Einheitsmembran den Kerninhalt. Die Außenmembran, ebenfalls eine Einheitsmembran, grenzt den Kern gegenüber dem Zytoplasma ab.

Zwischen den beiden Membranen ist der perinukleäre Spalt oder die perinukleäre Zisterne gelegen. Die äußere Kernmembran geht direkt in das raue

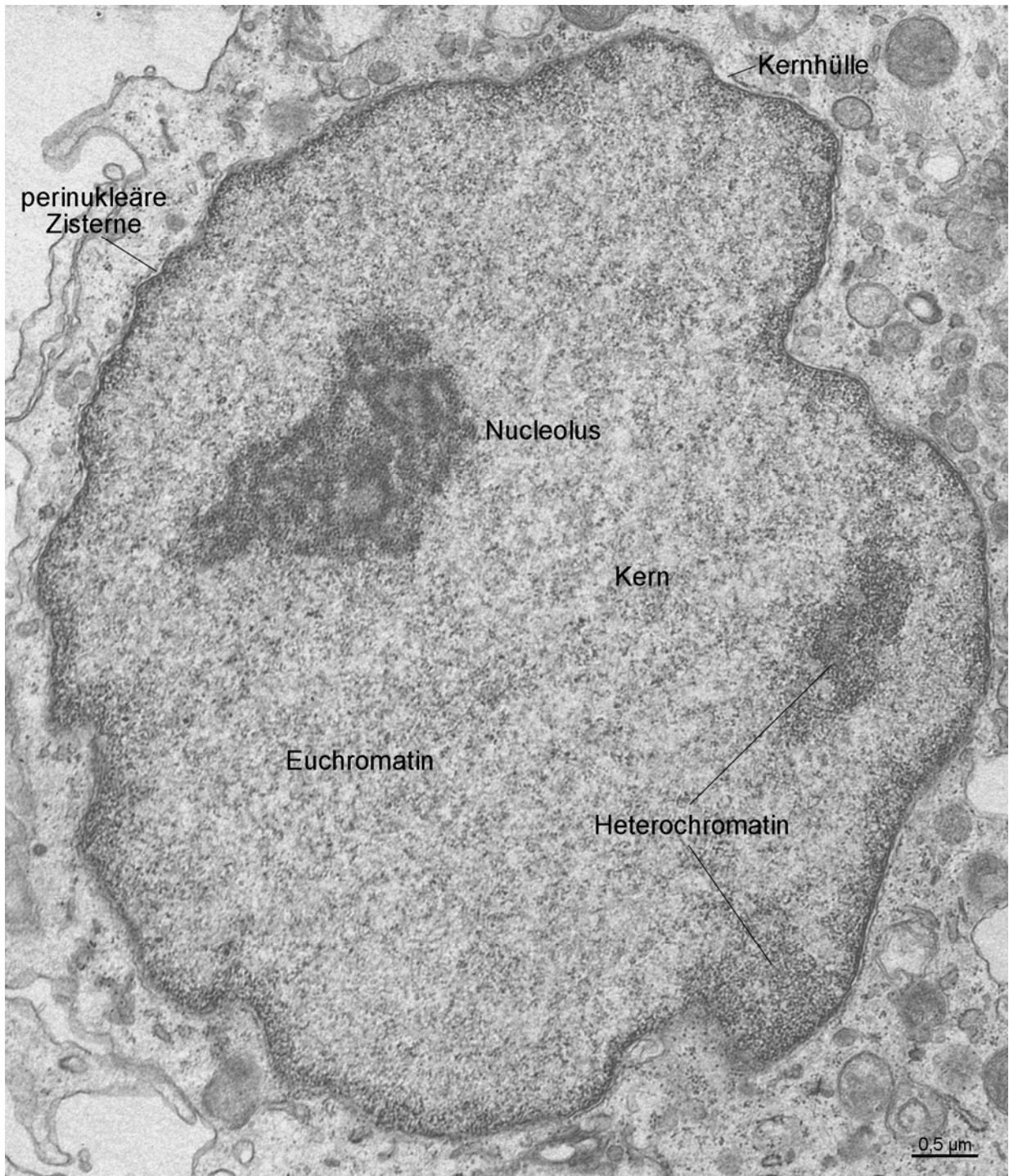


Abbildung 2: Grundaufbau eines Interphasekerns am Beispiel eines kultivierten humanen Makrophagen. Die Kernhülle zeigt einen Aufbau aus zwei fast parallel verlaufenden Membranen, die die perinukleäre Zisterne einschließen. Der vom Karyoplasma ausgefüllte Kerninnenraum enthält das Chromatin. Man kann zwei verschiedene Formen des Chromatins unterscheiden: das Heterochromatin repräsentiert stark verdichtete Chromosomenabschnitte, während das Euchromatin die am stärksten entspiralisierten Abschnitte der Chromosomen darstellen. Im Karyoplasma befindet sich ein Nucleolus.

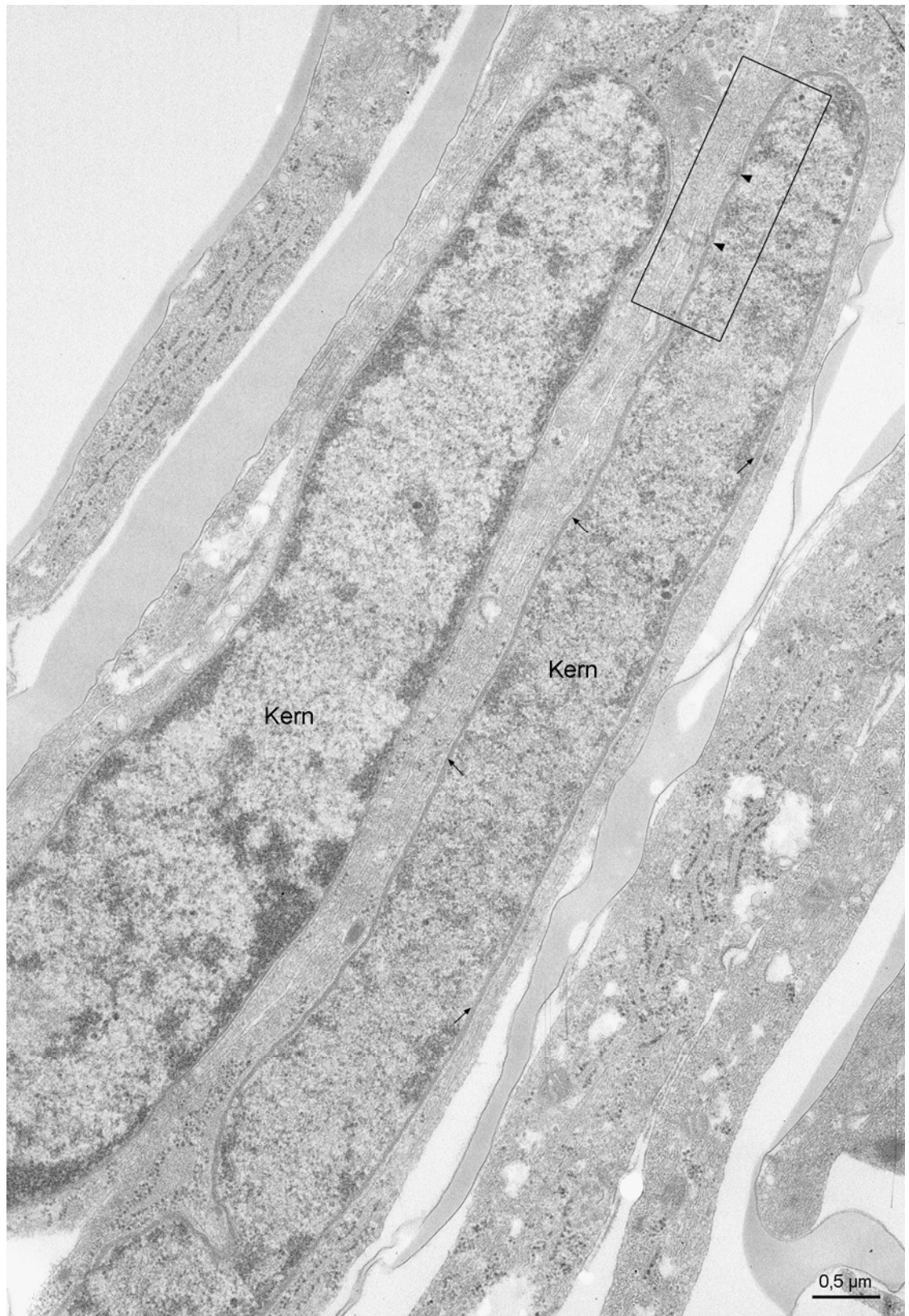


Abbildung 3: Interphasekerne von kultivierten humanen Hautfibroblasten. Entlang der Kernhülle tritt die Lamina fibrosa deutlich hervor (Pfeile). Sie liegt zwischen der inneren Kernmembran und dem Chromatin. An den Kernporen ist sie unterbrochen (Pfeilspitzen im markierten Ausschnitt).



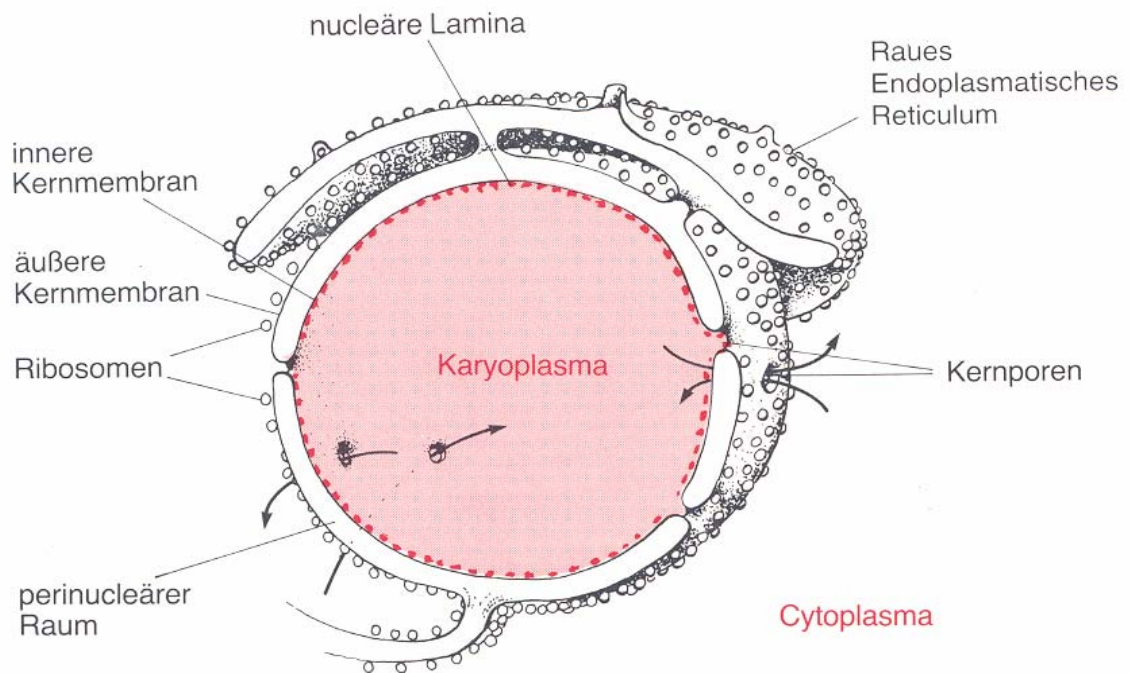


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Zellkerns und seiner Membranen (Hirsch-Kauffmann und Schweiger, 2000).

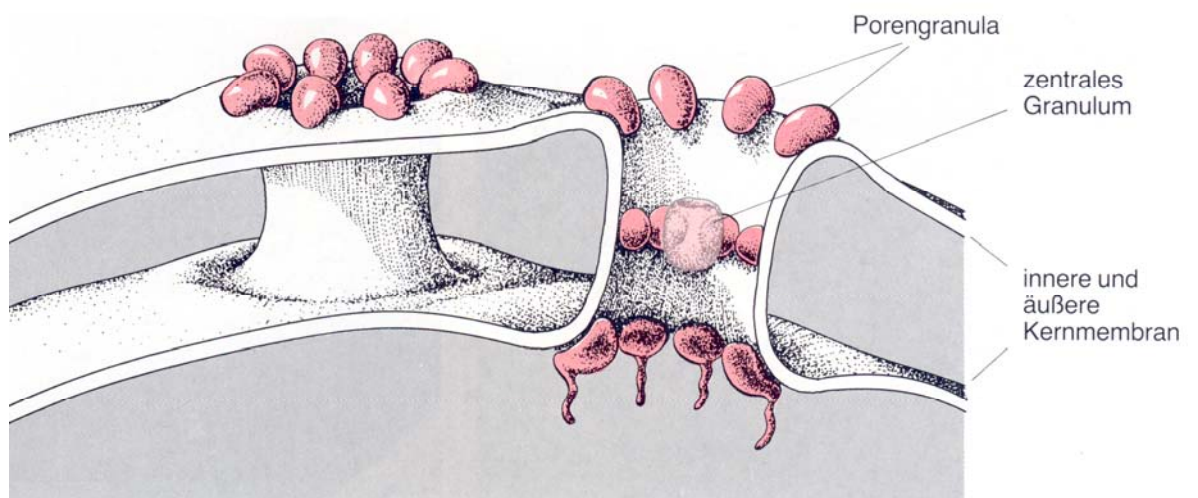


Abbildung 5: Kernmembran mit Pore. Die Kernporen sind in die Kernmembranen eingelassen. An deren Rändern verschmelzen äußere und innere Kernmembran. Die Poren werden umgrenzt von 8 Proteingranula, die einen Kanal von ca. 40 nm Größe freilassen (Hirsch-Kauffmann und Schweiger, 2000).

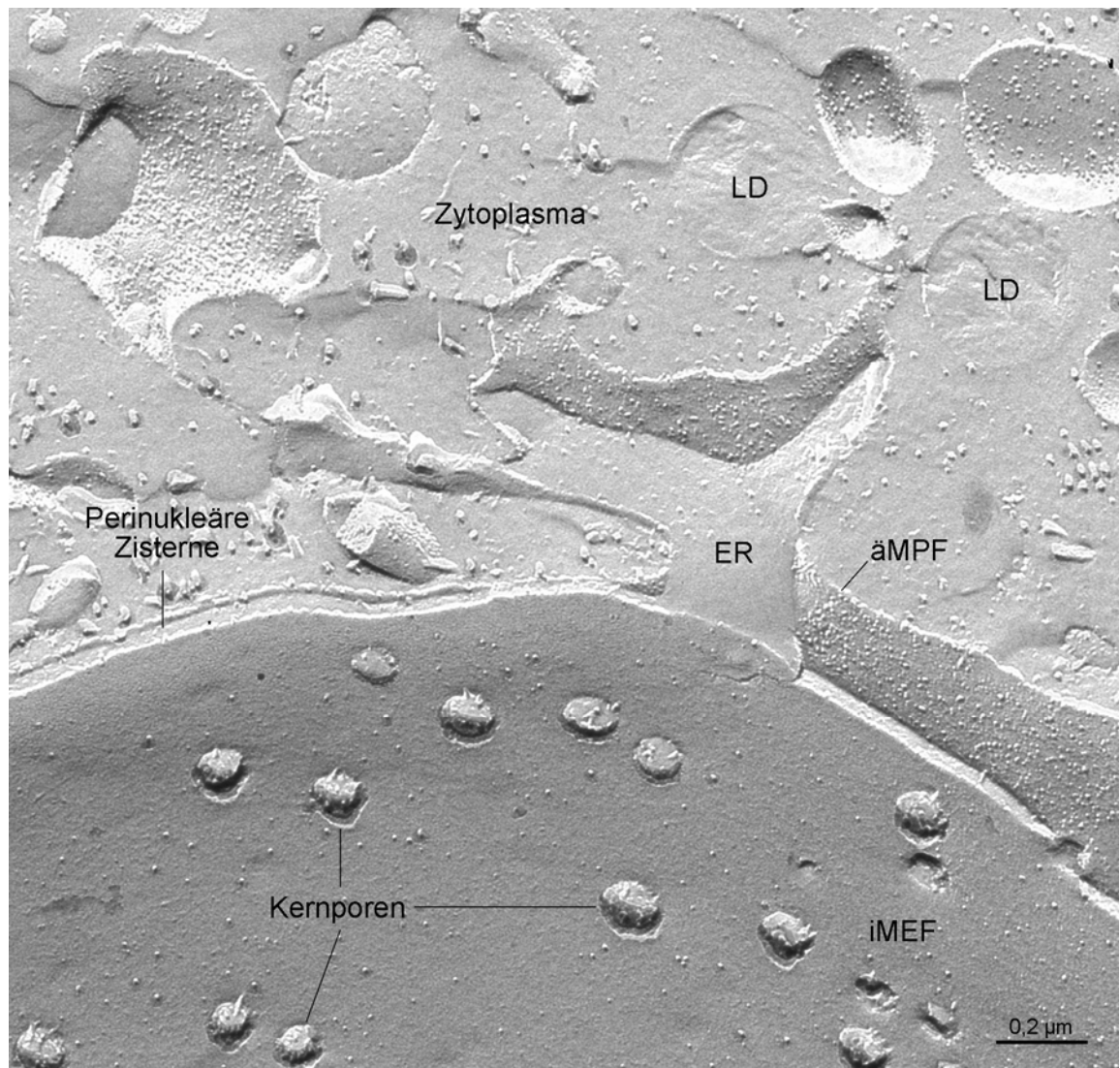


Abbildung 6: Darstellung eines Zellkerns eines kultivierten humanen THP1 Makrophagen nach Gefrierbruch. Die perinukleäre Zisterne der Kernhülle steht in direkter Verbindung mit dem Zisternensystem des rauhen Endoplasmatischen Retikulums. Ein relativ großer Teil der Kernoberfläche wird von Kernporen eingenommen. ER: Endoplasmatisches Retikulum; LD: Lipidtropfen.

Endoplasmatische Retikulum über und trägt auf der Zytoplasmaseite Ribosomen.

Das Lumen der Kernmembran kann also in direkter Verbindung mit den Zisternen des Endoplasmatischen Retikulums stehen. Die Außenmembran des Kerns ist ebenso wie das Endoplasmatische Retikulum von Ribosomen besetzt, so dass die Kernhülle einerseits als Teil des Endoplasmatischen Retikulums oder andererseits das Endoplasmatische Retikulum als Fortsetzung der Kernhülle gesehen werden kann (Abb. 4, 6).

Eine Doppelmembran bietet besondere Transportprobleme. Um dennoch einen Austausch zwischen Kern und Zytoplasma zu ermöglichen, wobei Proteine importiert, RNA-Moleküle exportiert werden müssen, sind in den Kernmembranen Poren eingelassen, die beide Membranen durchsetzen. Diese Porenkomplexe werden durch acht große, auf innerer und äußerer Kernmembran oktaederartig angeordnete Proteinkomplexe gebildet. Diese Proteine liegen einander gegenüber und verschweißen die Doppelmembran am Rande des Porenlumens (Abb. 5). 3000-4000 Poren pro Kern nehmen in mehr oder weniger regelmäßiger Anordnung ca. ein Fünftel der Kernoberfläche ein (Hinshaw et al., 1992; Stoffler et al., 1999).

Der inneren Kernmembran lagert sich karyoplasmawärts eine fibröse nukleäre Lamina (Lamina fibrosa) auf (Abb. 3, 4), die in allen eukaryotischen Zellen zu finden ist (Broers et al., 1997; 1999; Stuurman et al., 1998). Bei der Organisation des Chromatins und beim Auf- und Abbau der Kernmembran während der Zellteilung kommt ihr eine wesentliche Funktion zu (Broers et al., 1999; Foisner und Gerace, 1993; Goldberg et al., 1999; Gotzman und Foisner, 1999; Hozak et al., 1995; McKeon, 1991; Moir et al., 1994; 1995). Diese Lamina besteht aus einem Gitterwerk von fibrillären Proteinen (Laminen), welche zum Typ der Intermediärfilamente gehören. An der Kernlamina sind die Chromosomen angeheftet. An den Kernporen ist diese Lamina stets unterbrochen (Gant und Wilson, 1997; Holmer und Worman, 2001; Bridger et al., 1993).

## 1.2 METHODEN ZUR ANALYSE VON KERNMEMBRANEN

### 1.2.1 Konventionelle Gefrierbruchmethode und Nomenklatur

Die Ergebnisse der Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie trugen wesentlich zur Etablierung des Fluid-Mosaik-Modells bei. Nachdem Moor et al. (1961) die erste Gefrierbruchapparatur entwickelten, konnten Moor und Mühlethaler (1963) erste Aufsehen erregende dreidimensionale Bilder gefriergebrochener Hefezellen zeigen.

Im ersten Schritt zur Gefrierbruchpräparation werden Zellen sehr schnell eingefroren und so lebensnah fixiert. Die Kryofixierung ist bislang die zuverlässigste Methode, um die zelluläre Ultrastruktur ohne Aggregations- und Schrumpfungartefakte zur elektronenmikroskopischen Analyse zu konservieren. Die Kryofixierung ist schnell – die Probe ist in einigen Millisekunden auf  $-100^{\circ}\text{C}$  abgekühlt – und vermeidet den Einfluss schädlicher Chemikalien auf lebende Zellen (Dubochet und Sartori Blanc, 2001; Murk et al., 2003).

Bei der Gefrierbruch-Präparation verläuft der Bruch in biologischem Material bevorzugt in der hydrophoben inneren Region der Lipid-Doppelschicht. Dadurch wird die Lipid-Doppelschicht in zwei Hälften gespalten. Der Verlauf des Gefrierbruchs entlang der hydrophoben Zone der Lipid-Doppelschicht der Membran und die daraus resultierende Flächendarstellung von Membraninnenansichten ist eine der wesentlichsten Vorteile dieser Methode. Während die konventionelle Dünnschnittechnik nur Schnittbilder liefert und in den Dünnschnitten vorwiegend ein laminarer Schichtenaufbau der Membran sichtbar wird, lässt sich in Gefrierbruch-Replikas bei ähnlichem Auflösungsvermögen ein wesentlich differenzierteres Membranbild beobachten. Die beiden durch den Gefrierbruch freigelegten Membraninnenansichten tragen die Bezeichnung PF (protoplasmic face) für die ursprünglich zytoplasmatische Lipidschicht der Membran und EF (exoplasmic face) für die exoplasmatische Lipidschicht der Membran. Die Oberflächen der Plasmamembran bezeichnet man als ES (external surface) und PS (protoplasmic surface) (Abb. 7).

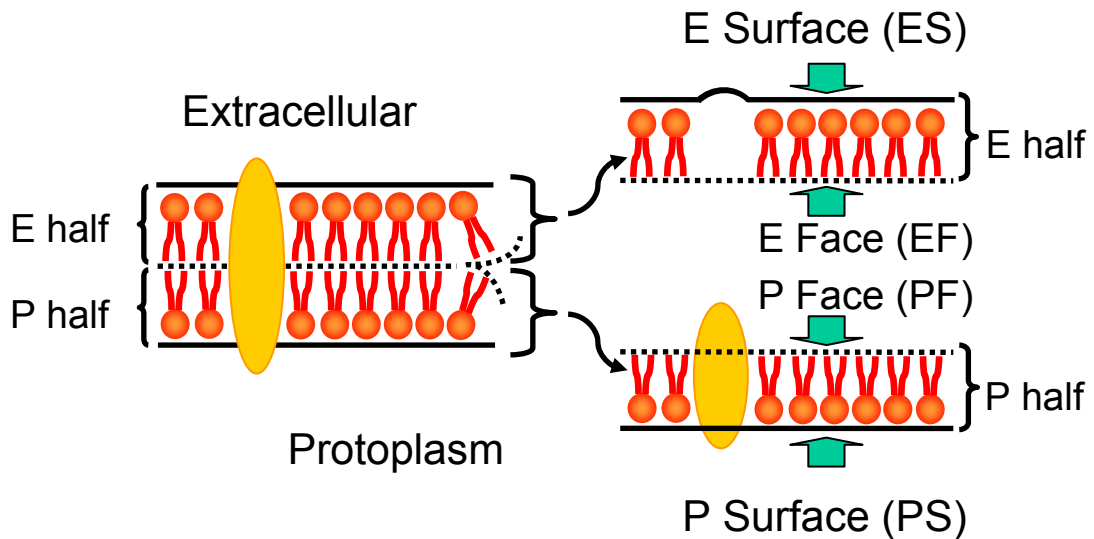


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Verlaufs eines Gefrierbruchs und Nomenklatur der Membranbruchflächen. Der Gefrierbruch spaltet die Phospholipiddoppelschicht in zwei Membraninnenansichten, die die Bezeichnung PF (protoplasmic face) und EF (exoplasmic face) tragen. Die Membranoberflächen werden als ES (external surface) und PS (protoplasmic surface) bezeichnet. (Verändert nach Severs und Shotton, 1995).

In den Gefrierbruch-Replikas der Membranen tritt vor allem eine granuläre Substruktur hervor. Hierbei handelt es sich um sogenannte intramembranöse Partikel (IMP). Es ist heute allgemein anerkannt, dass sie die in die Lipid-Doppelschicht der Membran inkorporierten Glykoprotein- bzw. Lipoproteinmoleküle repräsentieren. Die Phospholipide stellen sich als glatte, partikelfreie Areale dar. Die meisten oder alle IMP befinden sich auf einer der beiden Bruchflächen, während auf der anderen Bruchfläche in spiegelbildlicher Form Vertiefungen oder Löcher sichtbar werden. Dies hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass die IMP an den Lipiden der einen Schicht fester gebunden sind als an denen der anderen Seite. In der Regel befinden sich auf der PF der Membran mehr IMP als auf der EF.

Wie bereits beschrieben, wird die Plasmamembran durch den Verlauf des Gefrierbruchs in zwei Hälften gespalten, die nach der Nomenklatur von Branton et al. (1975) mit EF für die dem extrazellulären Raum anliegende Membranbruchfläche und mit PF für die dem Zytoplasma anliegende Membranbruchfläche bezeichnet werden. Wenn man diese Nomenklatur auf die

intrazellulären Membranen anwendet, werden die Membranbruchflächen, die dem Zytoplasma, dem Kernplasma oder der Mitochondrienmatrix anliegen, mit PF bezeichnet. Die Membranbruchflächen, die dem Raum zwischen innerer und äußerer Kern- und Mitochondrienmembran sowie dem Lumen der Organellen anliegen, die mit einer Einheitsmembran ausgestattet sind, wie zum Beispiel Endoplasmatisches Retikulum und Zisternen des Golgi-Apparates, werden mit EF bezeichnet (Abb. 8).

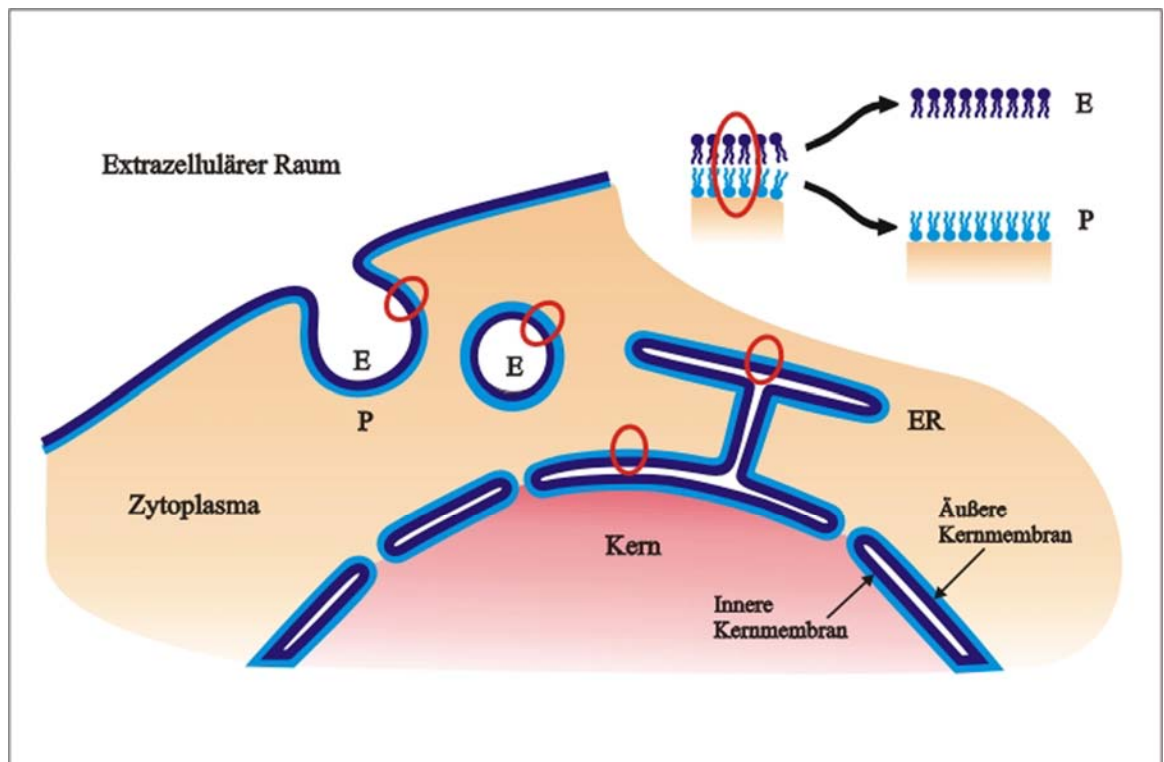


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Membranhälften der Plasmamembran und Membranen der Organellen. E: E-face; P: P-face; ER: Endoplasmatisches Retikulum.

### 1.2.2 Natrium Dodecyl Sulfat-Gefrierbruch-Immunzytochemie

Ein Hauptziel war es, durch Anwendung verschiedener Methoden die Bedeutung und Funktion der auf den Membranbruchflächen sichtbaren IMP und anderen strukturellen Spezialisierungen biochemisch zu identifizieren. Technische Verbesserungen und Innovationen haben bei gleichzeitiger Entwicklung anderer biophysikalischer, biochemischer und biologischer Methoden den Rahmen der ursprünglichen Technik wesentlich erweitert (Severs und Robenek, 1983; Severs, 1989; Severs und Shotton, 1995; Robenek et al., 2003).

Die Voraussetzung zum Verständnis der Beziehungen zwischen Membranstruktur und ihrer Funktion ist jedoch die direkte chemische Identifizierung der in gefriergebrochenen Membranen sichtbaren Komponenten. Die Applikation von Ferritin-konjugierten Antikörpern, Membranrekonstitutionsmethoden und Gefrierätzautoradiographie repräsentierten bereits erste Schritte, um dieses Ziel zu erreichen. Weitere Fortschritte sind durch die Einführung zytochemischer Methoden erzielt worden. Aufgrund Ihrer Limitationen und methodischen Probleme haben diese Verfahren allerdings keine große Verbreitung gefunden (siehe Severs und Robenek, 2007; Robenek und Severs, 2007).

Erst die von Fujimoto (1995) entwickelte sogenannte Natrium Dodecyl Sulfat (SDS)-Gefrierbruch- Immunzytochemie ist allen bisherigen Verfahren überlegen. Die in diesem Verfahren benutzte Kombination von Gefrierbruchverfahren mit immunzytochemischer Markierung von individuellen Membranmolekülen erlaubt den direkten Nachweis der chemischen Zusammensetzung und Topologie sowie Dynamik von Zellmembrankomponenten in situ.

Mit dieser Methode waren Fujimoto und andere Autoren in der Lage, Membranproteine selektiv mit spezifischen Antikörpern zu markieren (Fujimoto, 1995; 1997; Hülser et al., 1997; Fujimoto et al., 1997a,b; 1998; 2000; 2001; Furuse et al., 1998; Nomura und Fujimoto, 1999, Takizawa et al., 1998; 1999; Takizawa und Robinson, 2000; Takayama et al., 1999; Morita et al., 1999; Peterson et al., 2000; Robenek et al., 2005a-c; 2006a,b). Ferner konnten sie mit Hilfe dieser Methode und spezifischen Antikörpern die Verteilung von Phospholipiden in verschiedenen Zellen und intrazellulären Membranen sowie die exakte Topologie integraler Membranproteine darstellen (Fujimoto et al., 1997a,b).

### 1.3 ZIELE DER ARBEIT

Der Zellkern ist von einer Hülle, die aus der inneren und der äußeren Kernmembran besteht, umgeben. Über das Vorkommen und die Verteilung von Proteinen in den Kernmembranen ist bisher nur sehr wenig bekannt.

Die Projekte dieser Arbeit wurden mit dem Ziel durchgeführt, neue vertiefte Erkenntnisse über das Vorkommen und die Verteilung von Proteinen in den Kernmembranen zu gewinnen. Die Untersuchungen konzentrierten sich auf die Proteine LAP2 $\beta$ , Emerin, Caveolin-1 und das endogen vorkommende Protein Adipophilin und ein Adipophilin-Deletionskonstrukt, bei dem am C-Terminus des Proteins die Aminosäuren 1-181 fehlten. Als Versuchsobjekte dienten kultivierte humane arterielle glatte Muskelzellen, Endothelzellen, Makrophagen und Fibroblasten. Die Untersuchungen wurden mit Hilfe der Sodium Dodecyl Sulfat-Gefrierbruch-Immunzytochemie durchgeführt. Grundlage dieses Verfahrens bildet die elektronenmikroskopische Darstellung dieser Proteine in Platin/Kohle Replikas von Bruchflächen der Kernmembranen mittels primärer und goldmarkierter sekundärer Antikörper.

Mit dieser Methode ließe sich eine charakteristische Lokalisation und ein spezifisches Verteilungsmuster der Proteine in den Kernmembranen ermitteln.



## 2. MATERIAL UND METHODEN

Es wurden ausschließlich Chemikalien mit höchstem Reinheitsgrad verwendet. Nicht aufgeführte Chemikalien und Materialien wurden im Wesentlichen von folgenden Firmen bezogen: BioWhittaker, Inc., Boehringer GmbH, Carl Roth GmbH, Fleischhacker AG, Eppendorf AG, Merck KGaA, Plano W. Plannet GmbH, Qiagen GmbH, Serva Feinbiochemica GmbH & Co.KG und Sigma-Aldrich Chemie GmbH.

### 2.1 ZELLKULTUR

#### 2.1.1 Isolierung und Kultur von Zellen

##### 2.1.1.1 Glatte Muskelzellen

Für die Experimente wurden humane arterielle glatte Muskelzellen oder Muskelzelllinien (CC-2571) von der Firma Bio Whittaker (Walkersville, MD, USA) eingesetzt. Die Gewinnung von SMC-Primärkulturen erfolgte aus Aortenexplantaten und wurde nach einer von Ross (1971) entwickelten Methode durchgeführt. Dazu wurde unter sterilen Bedingungen an einem Aortenstück (humane Aortenstücke unterschiedlicher Größe aus der Klinik und Poliklinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum Münster) die Adventitia sorgfältig abpräpariert. Durch mechanisches Abkratzen wurde die Intima entfernt. In die verbleibende Media wurde ein Rechteck geritzt und daraus einzelne Stücke der Media abgezogen. Während dieser Zeit wurde die Aorta mehrmals mit dem Zellkulturmedium (Dulbecco's modified Eagle minimum essential medium, DMEM) benetzt, um ein Austrocknen zu verhindern. Die Mediastücke wurden in einer Kulturschale mit foetalem Kälberserum auf eine Größe von ca. 1 mm<sup>2</sup> geschnitten und mit einer Pasteurpipette gleichmäßig auf dem Boden von 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen (Becton Dickinson, Heidelberg) verteilt. Nach vorsichtiger Zugabe von Zellkulturmedium wurden die Kulturflaschen aufrecht in einen Begasungsbrutschrank (Binder, Tuttlingen) bei 37°C in wasserdampfgesättigter Luft mit 5% CO<sub>2</sub> gestellt. Nach 4 h wurden die

Flaschen waagrecht gelegt, so dass das Zellkulturmedium die Explantatstücke bedeckte.

Nach 3 bis 7 Tagen migrierten die ersten Zellen aus den Explantatstücken und begannen sich zu teilen. Ab dem 5. Kulturtag wurde das Kulturmedium alle 2 Tage gewechselt. Die Explantate wurden nach ca. 10 Tagen abgesaugt. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen durch Behandlung mit 0,005% Trypsin/0,02% EDTA in Phosphatpuffer (PBS) vom Flaschenboden abgelöst. Anschließend wurden die trypsinisierten Zellen in einem Plastikreagenzgefäß (50 ml) bei 400 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert und in 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen ausgesät. Für die Versuche wurden Zellen der 3. bis 6. Passage verwendet.

Die morphologische Identifizierung der Muskelzellen erfolgte lichtmikroskopisch aufgrund des zelltypspezifischen Erscheinungsbildes. Sie ist notwendig, um Verunreinigungen der Zellkultur mit anderen Zellen auszuschließen.

Die typische morphologische Gestalt der Primärkultur und junger Muskelzellen in subkonfluenten Kulturen ist spindelförmig. In konfluentem Zustand zeigen die Zellen im Monolayer das typische „Hill und Valley“-Wachstumsmuster (Chamley-Campbell et al., 1979). Glatte Muskelzellen enthalten eine spezifische Isoform des Aktins,  $\alpha$ -Aktin, das durch spezifische Antikörper sichtbar gemacht werden kann. Dieses ist eine Methode zur sicheren Identifizierung von glatten Muskelzellen. Zur Darstellung des  $\alpha$ -Aktins wurde ein Peroxidase-Substrat-KIT-AEC verwendet. Die darin enthaltenen Antikörper reagieren nicht mit dem Aktin anderer Zellen. Die SMC wurden auf Deckgläschen ausgesät und bei Erreichen der Subkonfluenz dreimal mit PBS gewaschen, für 30 sec mit Aceton fixiert und erneut mit PBS gewaschen. Die Anwendung des Kits erfolgte laut Herstellerangaben. Ausgewertet wurde mit einem Zeiss Axiovert 100.

#### 2.1.1.2 Endothelzellen

Für die Experimente wurden kultivierte Endothelzellen aus humaner Nabelschnur (HUVEC) oder Endothelzellen (HBME), die uns von Dr. Kwang Sik Kim (Childrens Hospital Los Angeles, CA, USA) zur Verfügung gestellt wurden, verwendet. Menschliche Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) wurden mir freundlicherweise von Herrn Dr. P. Vischer (Leibniz-Institut für

Arterioskleroseforschung, Universität Münster) zur Verfügung gestellt. Die weitere Kultivierung erfolgte wie unter 2.1.1.1 beschrieben. Für die Zellkulturexperimente wurden die Zellen innerhalb der ersten 3 Passagen verwendet.

#### 2.1.1.3 Makrophagen

In den Versuchen wurden Makrophagen aus humanem Blut oder THP-1-Zelllinien verwendet. Die humanen Makrophagen wurden mir freundlicherweise von Herrn Dr. S. Lorkowski (Leibniz-Institut für Arterioskleroseforschung) zur Verfügung gestellt. THP1 Zellen wurden von der Firma ATCC (Rockville, FL, USA) bezogen. Nach dem Auftauen erfolgte eine Vermehrung der Zellen in Suspensionskultur mit RPMI 1640 (Invitrogen Inc.) als Kulturmedium. Das RPMI 1640-Kulturmedium wurde zuvor mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum, 1 mM Natriumpyrovat, 20 mM L-Glutamin und 1% (v/v) nicht-essentiellen Aminosäuren versetzt. Die Ausdifferenzierung der Monozyten erfolgte durch dreitägige Inkubation der Zellen mit 50 ng/ml PMA in Kulturmedium. Nach der Ausdifferenzierung und der damit einhergehenden Adhäsion der Zellen an den Kulturflaschenboden wurde das PMA-haltige Kulturmedium entfernt.

Um Lipidtropfen in den Makrophagen zu induzieren, wurde acetyliertes Low Density Lipoprotein in einer Konzentration von 50 µg/ml dem Kulturmedium hinzugefügt und über 24 h inkubiert. Anschließend wurde das Kulturmedium abgewaschen und die Zellen der weiteren Verwendung zugeführt.

Die Überprüfung des morphologischen Erscheinungsbildes der Makrophagen erfolgte lichtmikroskopisch.

#### 2.1.1.4 Fibroblasten

Humane Fibroblasten aus Niemann-Pick Typ C (NPC) Patienten wurden mir von Herrn Prof. Dr. G. Schmitz (Institut für Klinische Chemie, Universität Regensburg) zur Verfügung gestellt. Die Kultur der Zellen erfolgte wie im folgenden für Hautfibroblasten beschrieben.

Normale humane Fibroblasten wurden aus einer Hautbiopsie eines 30jährigen Mannes isoliert (Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie, Universitätsklinikum Münster). Die Präparation und anschließende Isolierung erfolgte unter sterilen Bedingungen. Zuerst wurde die Haut mit einem Skalpell weitgehend von anhaftenden Fettzellen und Blutgefäßen befreit und dann mit der Subcutis nach oben in eine große Petrischale mit Kulturmedium überführt. Es wurden dann kleine Quadrate in die Subcutis geritzt, welche anschließend mit einer Schere herausgeschnitten wurden, ohne das etwas von der verhornten Oberhaut mitgerissen wurde. Die Unterhautstückchen wurden wiederum in eine Petrischale mit Kulturmedium gelegt und mit einem Skalpell weiter kleingeschnitten. Die kleinen Gewebestücke wurden dann mit einer Pinzette auf den Boden einer 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche gesetzt, wobei darauf geachtet werden mußte, dass nach unten hin etwa 1 cm frei blieb, so dass das Gewebe später nicht mit dem Kulturmedium in Berührung kommen konnte. Die Flaschen wurden, nachdem sie mit etwa 15 - 20 Gewebestückchen bestückt worden waren, hochkant gestellt und mit jeweils 5 ml Kulturmedium gefüllt. Es wurde überprüft, ob auch kein Unterhautstück mit dem Medium in Berührung kam und dann im Begasungsbrutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) für 5 h inkubiert. Danach wurden die Flaschen hingelegt. Nach etwa 2 bis 3 Tagen wuchsen Fibroblasten aus den Hautstücken heraus. Nach 5 Tagen wurden die Gewebestückchen mittels Pinzette entfernt und verworfen. Die bis dahin am Flaschenboden angewachsenen Fibroblasten wurden mit frischem Kulturmedium versorgt und nach weiteren 2 Tagen trypsiniert und subkultiviert. Die Überprüfung der Fibroblastenkultur erfolgte lichtmikroskopisch.

#### 2.1.1.5 Transfektion

Kultivierte NPC Fibroblasten und THP1 Makrophagen wurden mit Adipophilin-GFP (Green Fluorescent Protein)- bzw. Adipophilin-Deletionskonstrukt-GFP-Vektoren mit Hilfe der Nucleovector-Elektroporationsmethode transient transfiziert. Der spezifische Adipophilin-Vektor wurde uns von Herrn Dr. H. Heid (DKFZ Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Das Deletionskonstrukt wurde von Frau Dipl.-Biol. I. Buers hergestellt und auch die Transfektionen durchgeführt.

Die transfizierten Zellen wurden der weiteren Bearbeitung zugeführt. Die Überprüfung der Zellkultur und der Transfektionsrate erfolgte lichtmikroskopisch.

### 2.1.2 Zellzählung

Mittels eines elektronischen Zählgerätes (Casy 1, Schärfe System, Reutlingen) wurden die Zellkonzentrationen bestimmt. Durch Messung des elektrischen Widerstandes in einer Meßkapillare berechnet das Gerät neben der Anzahl auch das Volumen und den Durchmesser der Zellen.

Die Zellzahl einer Zellsuspension wurde jeweils bei einem Durchmesser von 6-30 µm ausgewertet. Für die Makrophagensuspension wurde ein Bereich von 8,5–30 µm gewählt.

Die Zellzahl wurde je dreimal bestimmt, nachdem die Zellsuspension mit einer 0,5 M NaCl-Lösung auf den Messbereich verdünnt worden war.

## 2.2 ELEKTRONENMIKROSKOPIE

### 2.2.1 Aufarbeitung für Ultradünnschnitte

Die Zellen wurden in der Kulturschale mit Karnovsky's Reagenz 2 h bei Raumtemperatur fixiert. Das Reagenz setzte sich zusammen aus 40 g Paraformaldehyd, 200 ml 25% Glutaraldehyd, 400 ml 0,2 M Natrium-Cacodylat, 0,5 g Kalziumchlorid auf 1 l Aqua dest. (pH 7,3). Anschließend wurden die Zellen 30 min mit PBS gewaschen, 60 min mit 1,3% Osmium-Collidin-Tetroxid in 0,1 M Collidinpuffer (pH 7,3) nachfixiert und wiederum mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. 30%, 50%, 70%, 90% und 96%iger Alkohol wurden jeweils 15 min, 100%iger Alkohol 2 x 20 min auf den Zellen belassen. Die entwässerten Zellen wurden anschließend mit Propylenoxid vom Schalenboden abgelöst und in Zentrifugenröhrchen überführt. Sie wurden 15 min in Propylenoxid stehengelassen und dann 10 min bei 1500 x g zentrifugiert. Der Überstand, also das Propylenoxid, wurde abgesaugt, und auf die pelletierten Zellen wurde ein 1:1 Propylenoxid-Epon-Gemisch gegeben. Darin blieben die Zellen 4 h bei Raumtemperatur stehen und wurden dann nach erneuter Zentrifugation (10 min bei 1500 x g) und Absaugen des Überstandes in

BEEM-Kapseln, worin sich bereits ein Tropfen Epon 812 befand, überführt. Um später für das Schneidegerät gut zugänglich zu sein, mußten die Zellen möglichst als kompaktes Pellet in der Spitze der BEEM-Kapsel liegen. Deshalb wurde in einer Heraeus-Christ-Tischzentrifuge 5-10 min bei voller Leistung (10.000 x g) zentrifugiert. Anschließend wurden die Kapseln randhoch mit Epon 812 aufgefüllt und 48 h bei 56°C polymerisiert.

Ultradünnschnitte mit einer Schnittdicke von 60 - 90 nm wurden mit einem Diamantmesser (Diatome, Biel, Schweiz) an einem Reichert OmU2-Ultramikrotom (Cambridge Instruments, Nussloch) hergestellt. Die Schnitte wurden auf Kupfernetzen (150 Maschen, 3,05 mm, Plano, Marburg) aufgenommen, die mit 0,3% Formvar in Chloroform befilmt waren. Die Schnitte wurden zum Teil mit 4% Uranylacetat-Dihydrat 20 min und 2,6% Bleizitrat 2 min kontrastiert.

### 2.2.2 Kryoultramikrotomie

Die Kryoultramikrotomie erfolgte nach der Methode von Tokuyasu (1980). Die kultivierten Zellen wurden entweder vor oder nach dem Abschaben vom Schalenboden mit 5% Formaldehyd in 0,2 M PIPES-Puffer (pH 7,0) für 2 h bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden die Zellen in PIPES-Puffer gewaschen (dreimal 10 min) und mit einer Lösung bestehend aus 1,6 M Saccharose und 25% Polyvinylpyrrolidon ( $M_r = 10.000$ ) für 20 min inkubiert. Die Zellen wurden eingefroren und bis zur Verwendung aufbewahrt.

Ultradünnschnitte wurden bei -100°C (Kryokammer) und -90°C (Messer) mit einem Ultramikrotom FC4E der Firma Reichert-Jung angefertigt. Die Schnitte wurden auf Kupfernetzen, die mit Formvar befilmt waren, aufgenommen. Die immunzytochemische Markierung wurde durch Übertragen der Kupfernetze auf 20 µl Tropfen in folgender Weise durchgeführt:

- Spülen mit PBS (dreimal 10 min)
- Inkubation mit den primären Antikörpern (verdünnt in PBS/1% BSA) für 1 h in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur
- Spülen mit PBS (dreimal 10 min)

- Inkubation mit goldmarkierten sekundären Antikörpern (verdünnt in PBS/1% BSA, die jeweilige Verdünnung erfolgte nach den Angaben des Herstellers oder wurde in Vorversuchen ermittelt) für 1 h bei Raumtemperatur
- Spülen mit Aqua dest. (fünfmal 10 min)
- Kontrastierung mit Uranylazetat-Dihydrat (pH 7,4) für 10 min
- Spülen mit Aqua dest. (dreimal 10 min)
- Stabilisierung der Schnitte mit 1% Methylzellulose in 0,5% Uranylazetat-Dihydrat (dreimal 1 min) bei 0°C.

### 2.2.3 Gefrierbruch und Gefrierbruch-Immunzytochemie

#### 2.2.3.1 Konventionelle Gefrierbruchmethode

Als Vorbereitung für den Gefrierbruch wurden die Zellen nach dem Abschaben vom Schalenboden mit Karnovsky's Reagenz bei Raumtemperatur fixiert und nach dem Auswaschen des Fixans für 2 h mit 30%igem Glycerin behandelt. Die Zellen wurden auf Gold-Objektträgern montiert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und in der Gefrierätzanlage BA 300 (Balzers AG, Liechtenstein) gefriergebrochen. Die freigelegten Membranoberflächen wurden mit Platin in einem Winkel von 38° und mit Kohlenstoff in einem Winkel von 45° bedampft. Die Schichtdicken wurden mit einem Schwingquarz gemessen. Sie betragen für Platin 2 nm und für Kohle 20 nm. Nach dem Auftauen der Zellen wurde das Replika mit Hilfe von Chlorbleiche von den Zellresten befreit, gereinigt und auf unbefilmten Kupfernetzen aufgenommen. Die einzelnen Schritte der Gefrierbruchtechnik sind kurz zusammengefaßt folgende: Fixierung ⇒ Gefrierschutz ⇒ Gefrierbruch ⇒ Platin/Kohle-Bedampfung ⇒ Reinigung des Replikas mit Chlorbleiche ⇒ Elektronenmikroskopie.

#### 2.2.3.2 Natrium Dodecyl Sulfat-Gefrierbruch-Immunzytochemie

Die Natrium Dodecyl Sulfat (SDS)-Gefrierbruch-Immunzytochemie wurde nach der von Fujimoto (1995) entwickelten Methode durchgeführt. Im Gegensatz zur herkömmlichen Gefrierbruchtechnik werden die Zellen bei der SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie nicht fixiert. Abweichend von der

Originalmethode haben wir die Zellen, bevor sie auf den Gold-Objektträgern montiert wurden, für 2-3 min in 30%igem Glycerin zentrifugiert. Der Gefrierbruch und die Bedampfung mit Platin/Kohle erfolgte wie bei der herkömmlichen Gefrierbruchtechnik. Für die Reinigung des Replikas wurde anstelle von Chlorbleiche jedoch SDS benutzt. Dafür wurden in der Regel mindestens 24 - 48 h benötigt (Abb. 9).

Die Immunzytochemie an den mit SDS gereinigten Replikas erfolgte in folgenden Schritten:

- Spülen in Aqua dest. (dreimal 10 min) Inkubation mit primären Antikörpern (verdünnt in PBS/1% BSA) für 1 h in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur
- Spülen mit Aqua dest. (dreimal 10 min)
- Inkubation mit goldmarkierten sekundären Antikörpern (verdünnt in PBS/1% BSA, die jeweilige Verdünnung wurde in Vorversuchen ermittelt) für 1 h bei Raumtemperatur
- Spülen mit Aqua dest. (dreimal 10 min)
- Aufnahme der markierten Replikas auf unbefilmte Kupfernetze
- Elektronenmikroskopie.

Die einzelnen Schritte der SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie sind kurz zusammengefaßt folgende: keine Fixierung ⇒ kurzer Gefrierschutz (max. 3 min) ⇒ Gefrierbruch ⇒ Platin/Kohle-Bedampfung ⇒ Reinigung des Replikas mit SDS ⇒ Immunzytochemie ⇒ Elektronenmikroskopie (Abb. 10)



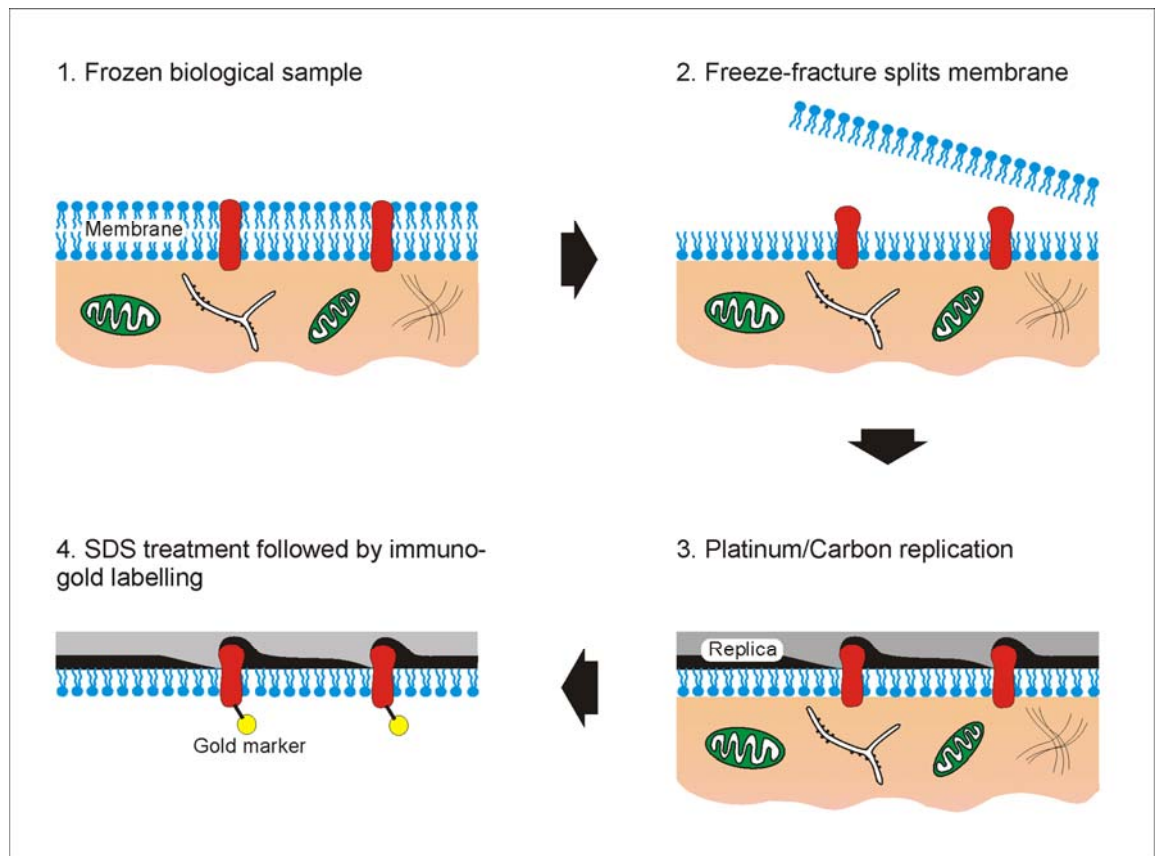


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Verlaufs des Gefrierbruchs und Immungoldmarkierung nach SDS-Reinigung des Replikas (aus: Robenek und Severs, 2007). 1. Die Zelle ist gefroren. 2. Der Gefrierbruch spaltet die E- und P-Hälfte der Membranen. 3. Die Platin/Kohle-Bedampfung erzeugt ein Replika der Membranbruchflächen und macht die E- oder P-Hälfte der Membranen sichtbar. 4. Mit SDS werden die nicht bedampften Zellen und Zellkomponenten aufgelöst, aber nicht die bedampften Membranbruchflächen mit den darin enthaltenen Lipidmolekülen und den Proteinen. Das Replika wird dann mit primären und goldmarkierten sekundären Antikörpern inkubiert und markiert.

#### 2.2.4 Antikörper und Immungold

Für die immunzytochemischen Markierungen der Proteine an den Gefrierbrüchen und Kryoschnitten wurden die folgenden primären Antikörper eingesetzt:

- Adipophilin: Monoklonaler Maus anti-Adipophilin-Antikörper, der gegen die Aminosäuresequenz 5-27 des humanen Adipophilins gerichtet ist (AP 125; Progen Biotechnik, Heidelberg)
- Caveolin-1: Monoklonaler Maus anti-Caveolin-1-Antikörper (CC 37120; Clone 2297, Transduction Lab., Lexington, KY, USA)
- Emerin: Polyklonaler Kaninchen anti-Emerin-Antikörper (FL 254; sc-15378), der gegen ein rekombinantes Protein, das der Aminosäuresequenz 3-254 des humanen Emerins entspricht, gerichtet ist (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA)
- GFP: Polyklonaler Kaninchen anti-GFP-Antikörper, der gegen die gesamte Sequenz des Moleküls gerichtet ist (ab290, abcam, Cambridge, UK)
- LAP2 $\beta$ : Monoklonaler Maus anti-LAP2 $\beta$ -Antikörper (L 611000; Clone 27, Transduction Lab., Lexington, KY, USA).

Die Antikörper wurden jeweils in einer Konzentration von 5  $\mu$ g/ml eingesetzt.

Als sekundäre Antikörper wurden die an 12 nm oder 18 nm kolloidales Gold gekoppelten Ziege anti-Maus-IgG (48057; Dianova, Hamburg) bzw. Ziege anti-Kaninchen-IgG (47984; Dianova, Hamburg) oder der Firma Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA) eingesetzt.

#### 2.2.5 Bilddokumentation

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden an einem Philips EM 410 hergestellt und am Computer für die Endversion bearbeitet.

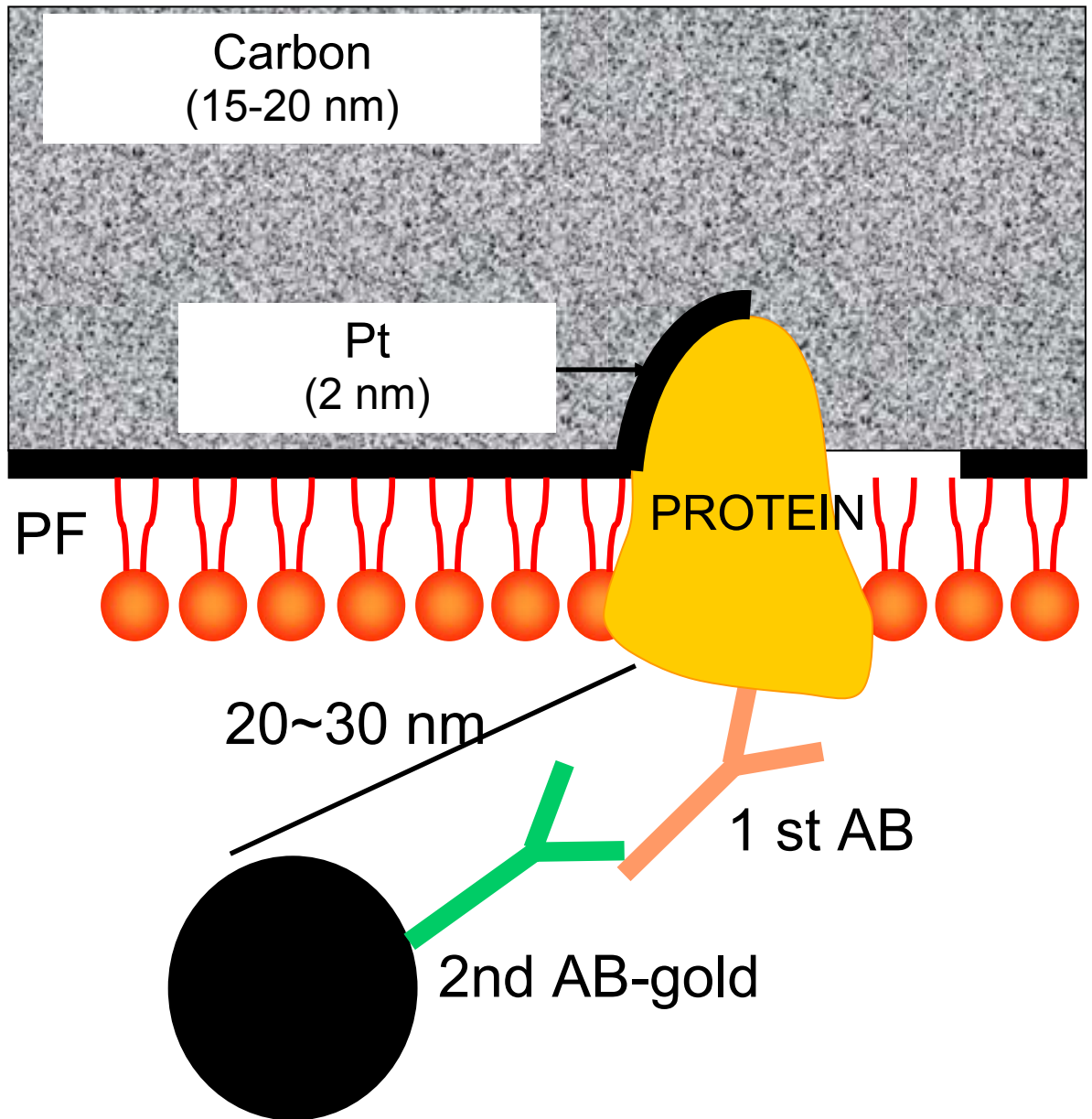


Abbildung 10: Schematische Darstellung eines immungoldmarkierten Replikas. Das Protein ist in der P-Seite (PF) der Membran lokalisiert. Die P-Hälfte der Membran ist an das Platin/Kohle Replika gebunden. Durch die indirekte Immungoldmarkierung liegen die Goldpartikel ca. 20-30 nm von den Membranproteinen entfernt. (Verändert nach Fujimoto, 1997).

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 BRUCHFLÄCHEN DER KERNMEMBRANEN

Das größte und prominenteste Organell der Zelle ist der Zellkern. Der Zellkern ist von einer Hülle, die aus einer doppelten Membran - der äußeren und der inneren Kernmembran – besteht. Die Innenmembran umhüllt als typische Einheitsmembran das Karyoplasma. Die Außenmembran, ebenfalls eine Einheitsmembran, grenzt den Kern gegenüber dem Zytoplasma ab. Für die Identifizierung der in den Membranen integrierten Proteine ist zunächst die Darstellung und Kenntnis der durch den Gefrierbruch hervorgerufenen möglichen Membranbruchflächen eines Kerns Voraussetzung.

Da der Zellkern eine Doppelmembran besitzt, kann der Gefrierbruch entweder einer Membran folgen oder von einer zur anderen springen. Nach dem Gefrierbruch ergibt sich eine der drei folgenden Ansichten des Kerns:

1. Verläuft der Bruch quer durch den Kern, ist das Ergebnis ein Querbruch, der einem Ultradünnschnitt weitgehend ähnelt. Im Gegensatz zu diesem ist der Nukleolus nicht sichtbar, und das Karyoplasma erscheint im Gefrierbruch homogen.
2. Wird der Kern herausgebrochen und bleiben nur die Membranen stehen, ergibt sich eine konkave Ansicht. Es wird die E-Hälfte der inneren (iMEF) und die P-Hälfte der äußeren (äMPF) Kernmembran sichtbar (Abb. 11).
3. Verläuft der Bruch oberhalb des Kerns, führt er zu einer konvexen Ansicht. Es wird die E-Hälfte der äußeren (äMEF) und die P-Hälfte der inneren (iMPF) Kernmembran sichtbar (Abb. 12).

Insgesamt lassen sich also vier Membranansichten der Kernhülle darstellen. Sie werden in den Abbildungen 11 und 12 am Beispiel zweier Kerne aus humanen Makrophagen demonstriert.

Auf den Membranbruchflächen der Kernmembranen lassen sich IMP erkennen. Die glatten Areale entsprechen einer Phospholipidschicht, während die IMP die in die Lipidschicht inkorporierten Proteine darstellen. Auf den P-Hälften sowohl der inneren als auch der äußeren Kernmembran sind durchweg mehr IMP vorhanden als auf den E-Hälften der Membranen.

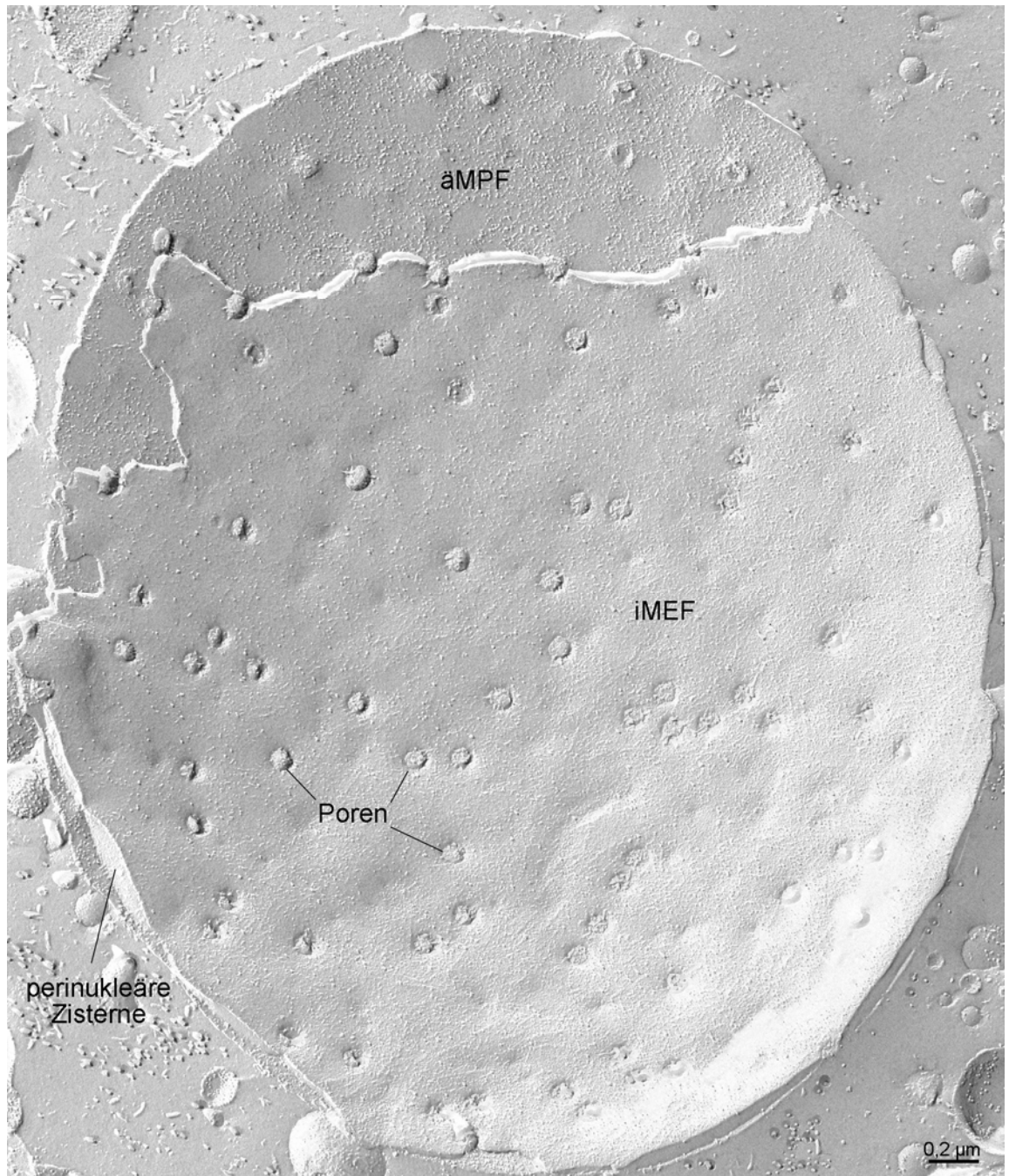


Abbildung 11: Gefrierbruch-Replika eines Zellkerns aus einem kultivierten humanen Makrophagen. Das Bild zeigt eine konkave Ansicht des Zellkerns. Die E-Hälfte der inneren und die P-Hälfte der äußeren Kernmembran sind sichtbar. Die zahlreichen runden Gebilde repräsentieren die Kernporen.



Abbildung 12: Gefrierbruch eines Zellkerns aus einem kultivierten humanen Makrophagen. Verläuft der Gefrierbruch oberhalb des Kerns (konvexe Ansicht), so sind die E-Hälfte der äußeren und die P-Hälfte der inneren Kernmembran sichtbar.

Die Freilegung großer Kernmembraninnenansichten durch den Gefrierbruch, die Herstellung eines Platin/Kohle-Replikas und die daran sich anschließende SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie erlaubt die Untersuchung der Verteilung der Proteine in den Kernmembranen.

### 3.2 LOKALISATION DER KERNMEMBRAN-PROTEINE

#### 3.2.1 LAP2 $\beta$

Die innere Kernmembran enthält Proteine, über die die Lamine und das Chromatin mit der Kernmembran verankert sind. In Säugerzellen konnten bisher sechs Proteine identifiziert und charakterisiert werden. Zu ihnen gehören verschiedene Spleißvarianten der Lamina-assoziierten Polypeptide 1 und 2 (LAP1 und LAP2) und Emerin.

Das Gen LAP2 produziert eine Reihe von Polypeptiden mit unterschiedlichen strukturellen und funktionellen Eigenschaften aufgrund extensiven Spleißens des primären Transskripts. Das humane Gen für LAP2 ist auf dem Chromosom 12q22 lokalisiert. Drei LAP2 Isoformen,  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ , sind charakterisiert worden (Harris et al., 1995; Dechat et al., 2000; Furukawa et al., 1995). LAP2 $\beta$  und LAP2 $\gamma$  sind integrale Proteine der inneren Kernmembran, während LAP2 $\alpha$  keine Transmembrandomäne besitzt und im peripheren Karyoplasma lokalisiert ist (Harris et al., 1995; Vlcek et al., 1999). Die am besten bisher untersuchte und auch in dieser Arbeit analysierte LAP2 Isoform, LAP2 $\beta$ , ist ein 53 kDa Protein mit einer hydrophilen N-terminalen Domäne von 409 Aminosäureresten und einem einzigen Transmembransegment (Harris et al., 1995; Furukawa et al., 1995).

Nach Immungoldmarkierung gefriergebrochener Endothelzellen mit Antikörpern gegen LAP2 $\beta$  befindet sich die Markierung ausschließlich auf den P-Hälften der inneren Kernmembran (Abb. 13). Die E-Hälften der inneren und die E- und P-Hälften der äußeren Kernmembranen sind vollkommen frei von Goldpartikeln. Auch auf den Membranbruchflächen der anderen Organellen wurde keine Markierung beobachtet. Das Verteilungsmuster dieser Proteine ist relativ homogen und variiert nur wenig zwischen den einzelnen Kernen der Endothelzellen.

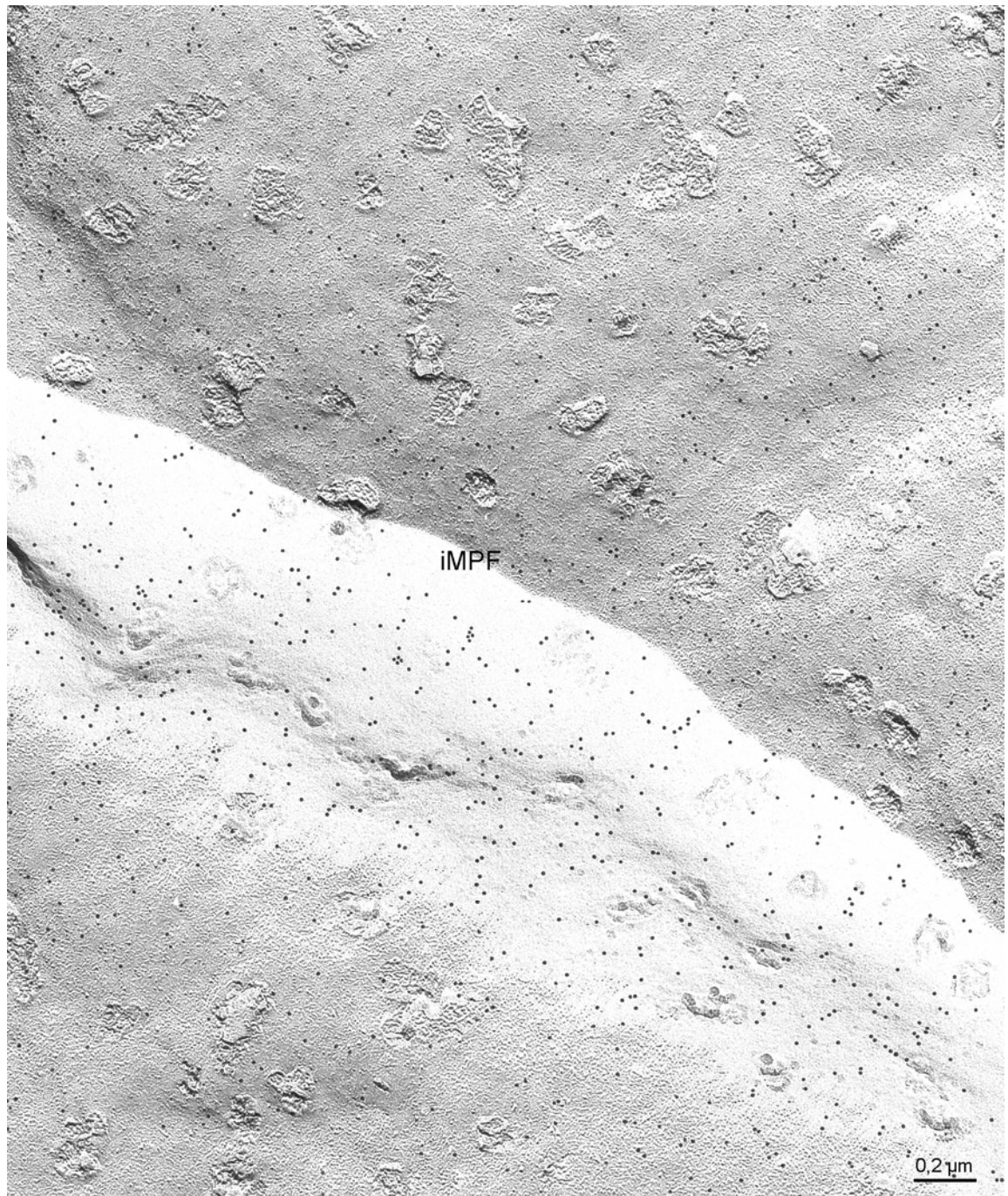


Abbildung 13: Gefrierbruchreplika der P-Hälfte der inneren Kernmembran einer Endothelzelle nach Immungoldmarkierung von LAP2 $\beta$ . Die Goldpartikel sind gleichmäßig zwischen den Kernporen auf der Bruchfläche verteilt.



### 3.2.2 Emerin

Emerin ist das zweite in dieser Arbeit untersuchte Protein der inneren Kernmembran. Es wurde 1994 von Bione et al. entdeckt. Das Gen für Emerin ist auf dem Chromosom Xq28 lokalisiert und Mutationen dieses Gens sind verantwortlich für die X-gebundene Emery-Dreifuss Muskeldystrophie. Emerin enthält eine Domäne von ca. 40 Aminosäureresten am N-Terminus, welche homolog ist mit einer Domäne in der Nähe des N-Terminus von LAP2 $\beta$  (Bione et al., 1994; Nagano et al., 1996; Manilal et al., 1996; 1998). Es gibt eine Reihe von Hinweisen darauf, dass Emerin mit Laminen interagiert (Fairley et al., 1999).

Die Emery-Dreifuss Muskeldystrophie ist charakterisiert durch frühe Kontraktionen der Sehnen des Ellenbogens und der Achillessehne und einer Kardiomyopathie mit einem atrioventrikulären Leistungsblock, der lebensbedrohlich ist (Emery, 2000). Zwei Vererbungsmöglichkeiten sind beschrieben worden: X-chromosomal gebunden und autosomal dominant. Mutationen, die die Emery-Dreifuss Muskeldystrophie verursachen, sind auf dem Emery-Gen verteilt und führen zu verkürzten Proteinen, die nicht in Muskelzellen exprimiert werden (Manilal et al., 1996; 1998; Yates und Wehnert, 1999). Bonne et al. (1999; 2000) haben gezeigt, dass Mutationen im Laminin A und C die autosomal dominante Form der Emery-Dreifuss Muskeldystrophie verursachen. Die Immungoldmarkierung für Emerin befindet sich auch wie bei LAP2 $\beta$  ausschließlich auf den P-Hälften der inneren Kernmembran (Abb. 14).

### 3.2.3 Caveolin-1

Die Caveolin-Proteinfamilie besteht aus drei Mitgliedern, Caveolin-1-3. Caveolin-1 ist ein 21-23 kDa schweres integrales Membranprotein (Kurzchalia et al., 1992), das über Cysteinreste palmitoyliert sein kann (Dietzen et al., 1995). Caveolin-1 ist das Markerprotein der sogenannten Caveolae. Caveolae sind kleine, im elektronenmikroskopischen Bild als glatt erscheinende kolbenförmige Invaginationen auf der Plasmamembran (Robenek et al., 2003). Sie haben eine Schlüsselrolle bei der zellulären Signaltransduktion inne.

Caveolin-2 ist mit Caveolin-1 kolokalisiert (Scherer et al., 1996), während Caveolin-3 als drittes Mitglied der Caveolin-Proteinfamilie bevorzugt in

Muskelzellen vorkommt (Tang et al., 1996). Caveolin bildet vermutlich eine haarnadelförmige Struktur in der Membran, wobei der C- und N-Terminus

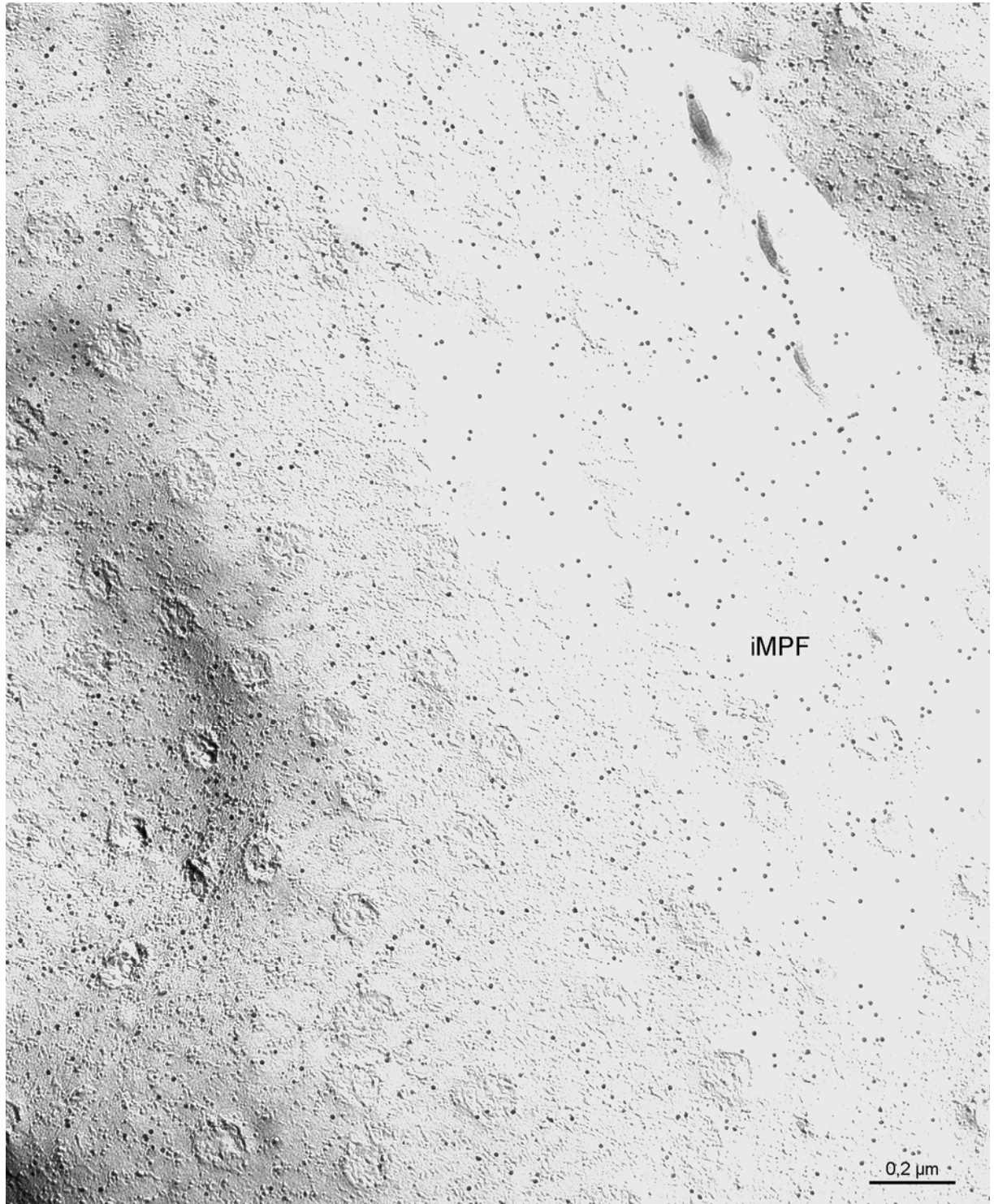


Abbildung 14: Gefrierbruchreplika der P-Hälfte der inneren Kernmembran einer Endothelzelle nach Immunmarkierung von Emerin. Die Goldpartikel sind gleichmäßig zwischen den Kernporen auf der Bruchfläche verteilt.

plasmatisch lokalisiert sind und der mittlere Teil in einer Schleife hydrophob in die Membran hineinragt, sie aber nicht vollständig durchspannt (Sargiacomo et al., 1995; Parton, 1996). Caveolin wird am Endoplasmatischen Retikulum gebildet und inseriert kotranslational in die Membran (Monier et al., 1995). Wie der intrazelluläre Weg verläuft, ist allerdings nicht ganz geklärt.

Nach Immungoldmarkierung befindet sich die Markierung wie zu erwarten über den zahlreichen in der Plasmamembran vorkommenden Caveolae von glatten Muskelzellen. Die Goldpartikel sind ausschließlich auf der P-Hälfte der Plasmamembran vorhanden, die E-Hälfte ist vollkommen frei von Goldpartikeln. Neben dem Vorkommen in der Plasmamembran von glatten Muskelzellen kann Caveolin-1 darüber hinaus in den Membranen verschiedener Zellorganellen, wie zum Beispiel dem Zellkern, Endoplasmatischen Retikulum, Golgi-Apparat, Vesikeln des Trans-Golgi-Netzwerkes und Lipidtropfen nachgewiesen werden (Robenek et al., 2003; 2004). Die Immunmarkierung des Caveolin-1 hat ergeben, dass im Gegensatz zur Plasmamembran nur die E-Hälfte der Membranen der intrazellulären Organellen markiert sind. Im Zellkern lässt sich die Goldmarkierung auf den E-Hälften sowohl der inneren als auch der äußeren Membran darstellen (Abb. 15, 16). Die P-Hälften beider Kernmembranen sind frei von Goldpartikeln.

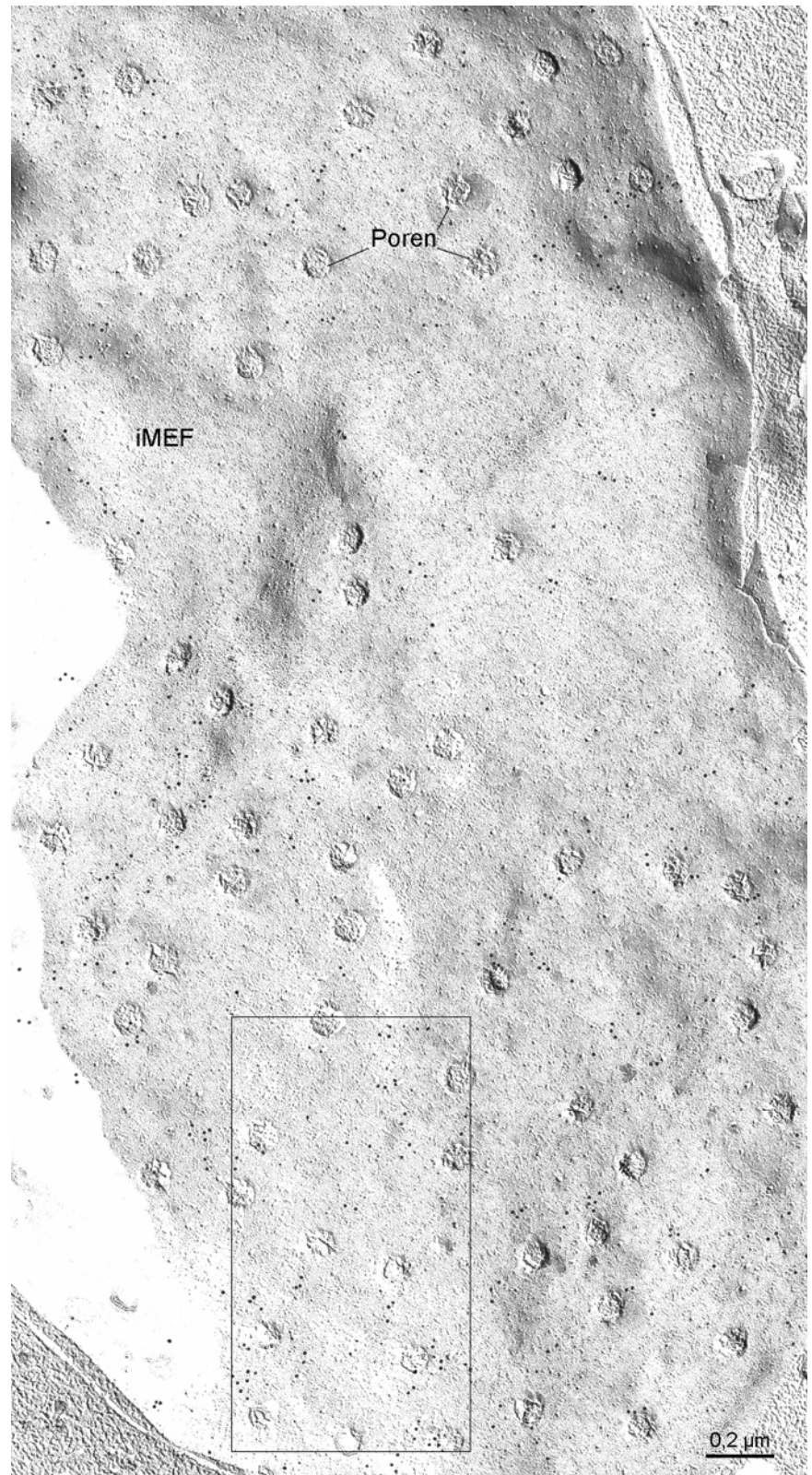


Abbildung 15: Gefrierbruchreplika der Kernmembranen einer kultivierten humanen glatten Muskelzelle nach Immunmarkierung von Caveolin-1. Die Goldpartikel befinden sich ausschließlich auf der E-Hälfte der inneren Kernmembran.

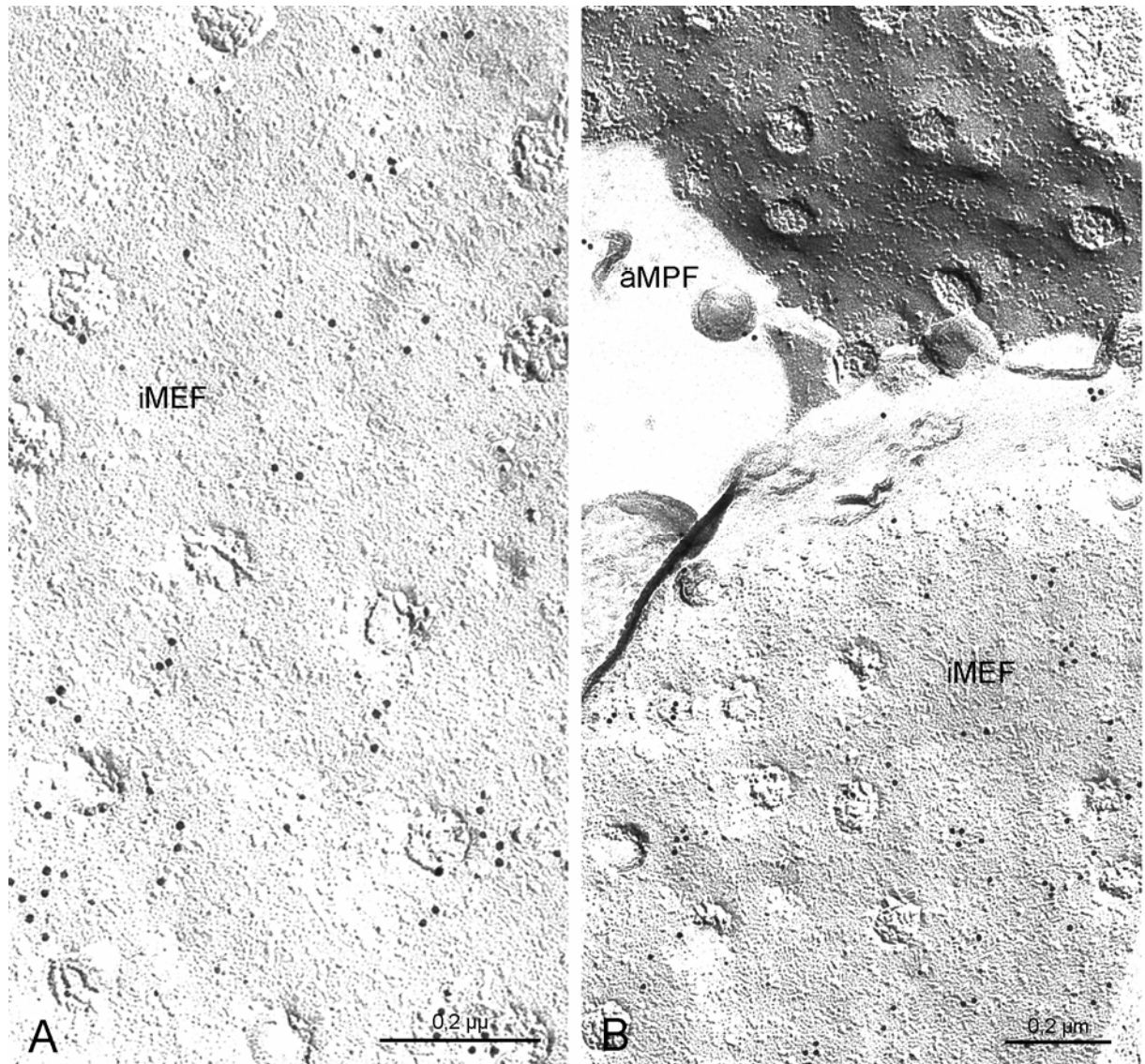


Abbildung 16: Gefrierbruchreplikas von Kernmembranen humaner glatter Muskelzellen nach Immungoldmarkierung von Caveolin-1. A) Vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 15. B) Im Gegensatz zur E-Hälfte der inneren Kernmembran ist die P-Hälfte der äußeren Kernmembran frei von Goldpartikeln.

### 3.2.4 Endogenes Adipophilin in Makrophagen

Adipophilin ist ein Fettropfen-assoziiertes Protein und wurde in vielen Zellen und Geweben und in fast allen Lipidtropfen gefunden. Es gehört mit Perilipin und TIP47 zur Familie der sogenannten PAT-Proteine. Über seine Funktion ist nur wenig bekannt. Die ubiquitäre Verbreitung von Adipophilin hat zu der Annahme geführt, dass es eine Schlüsselrolle bei der Lipidtropfenbiogenese spielt. Dafür spricht die Tatsache, dass auch in Prä-Adipozyten zunächst Adipophilin exprimiert wird, das jedoch im Verlauf der Entwicklung der Adipozyten durch Perilipin ersetzt wird.

Jüngste Untersuchungen haben gezeigt, dass Adipophilin nicht nur in Lipidtropfen, sondern auch in der Plasmamembran und im Endoplasmatischen Retikulum vorkommen kann (Robenek et al., 2005; 2006b). In dieser Arbeit konnte Adipophilin darüber hinaus im Zellkern von THP1 Makrophagen nachgewiesen werden.

Adipophilin ist in charakteristischer Weise ausschließlich in der P-Hälfte der äußeren Kernmembran lokalisiert (Abb. 17). Die E-Hälfte der äußeren Kernmembran und die E-Hälfte/P-Hälfte der inneren Kernmembran sind vollkommen frei von Goldpartikeln. Das Verteilungsmuster dieser Proteine ist relativ homogen und variiert nur wenig zwischen den einzelnen Kernen der Makrophagen. Es ließ sich feststellen, dass die Adipophilin-Markierung mit Ausnahme der Kernporen in allen Bereichen der P-Hälften der äußeren Kernmembranen vorkommt. Bevorzugte oder spezielle Areale, die keine Markierung enthielten, wurden nicht beobachtet. Die Goldpartikel sind gleichmäßig über die gesamte Bruchfläche in unregelmäßiger Anordnung verteilt. Die benutzten Antikörper sind äußerst spezifisch, so dass der Background vernachlässigbar gering ist.

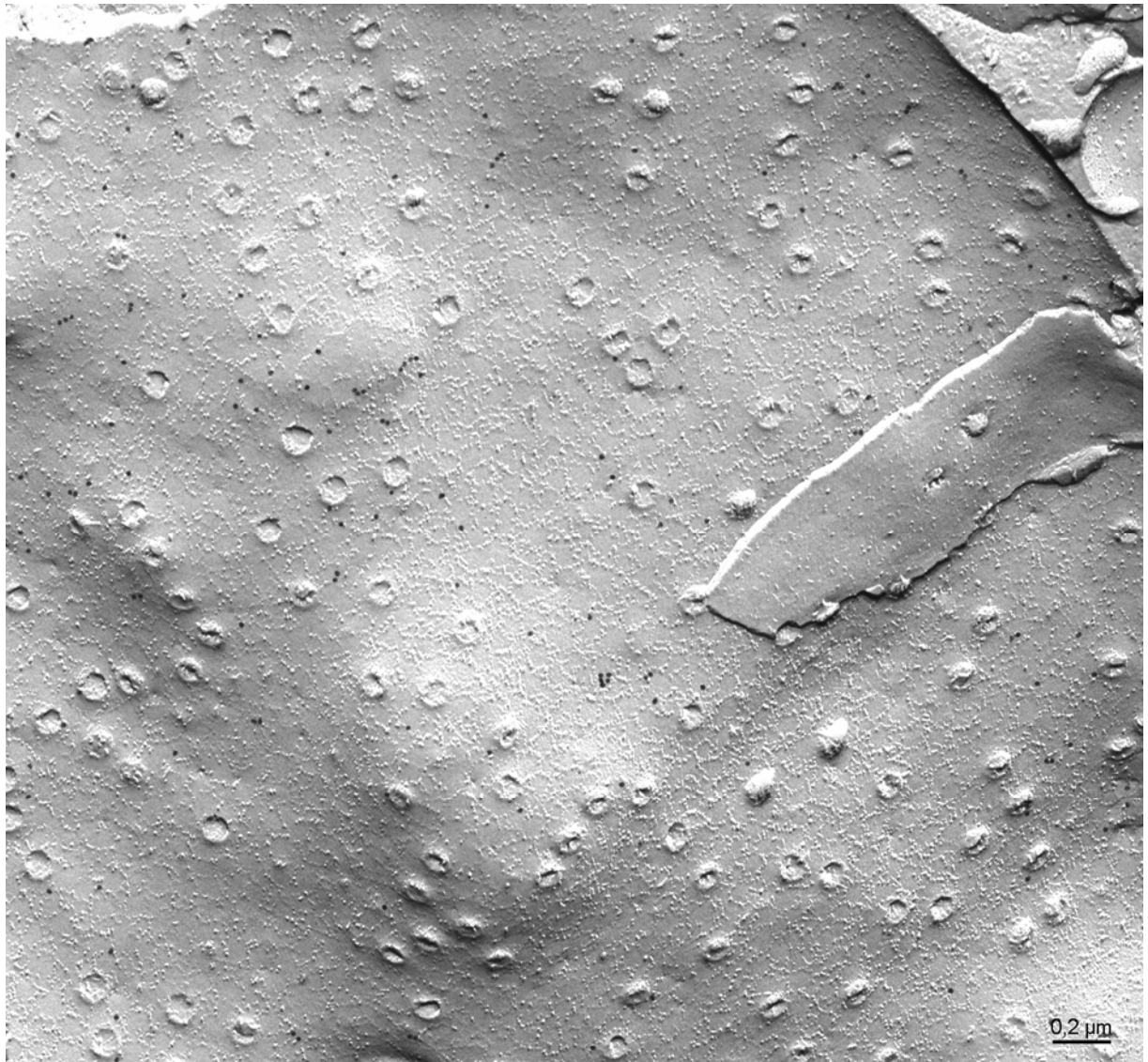


Abbildung 17: Lokalisation von Adipophilin in der Kernmembran eines THP1 Makrophagen nach Immungoldmarkierung am Gefrierbruchreplika. Die Immungoldmarkierung befindet sich auf der P-Hälfte der äußeren Kernmembran. Die Goldpartikel sind gleichmäßig zwischen der Kernporen auf der Membranbruchfläche verteilt.

### 3.2.5 Adipophilin-GFP nach Transfektion

#### 3.2.5.1 Niemann-Pick Typ C Fibroblasten

Mit Niemann-Pick Typ C (NPC) bezeichnet man eine autosomal rezessive Lipidspeicherkrankheit, die durch eine progressive Neurodegeneration charakterisiert ist. Verursacht durch Mutationen im NPC 1 Gen kommt es zur Speicherung von Lipiden im endosomal/lysosomalen Kompartiment von Zellen anstelle von Lipidtropfen. NPC Zellen sind folglich gekennzeichnet durch das Fehlen von Lipidtropfen, selbst wenn sie massiv mit Lipiden inkubiert werden. Wir haben in dieser Arbeit das Verhalten von Adipophilin, insbesondere im Hinblick auf seine Lokalisation in den Kernmembranen von NPC Fibroblasten untersucht. Zu diesem Zweck haben wir NPC Fibroblasten mit Adipophilin, das an grün fluoreszierendes Protein (GFP) gekoppelt wurde, transient transfiziert. GFP ist ein natürlich fluoreszierender Marker, der nachdem er an ein spezifisches Protein gekoppelt wurde, hauptsächlich eingesetzt wird, um die Lokalisation und Mobilität dieses Proteins mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes in der lebenden Zelle zu verfolgen. Nachteil dieser Methode ist das geringe Auflösungsvermögen der Fluoreszenzmikroskopie. Dadurch lassen sich mögliche Effekte der Kopplung des GFP auf die Eigenschaften des zu untersuchenden Proteins, wie zum Beispiel die intrazelluläre Transportroute oder die Orientierung in der Membran, kaum feststellen.

Wir haben erstmals die SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie eingesetzt, um diese Nachteile zu vermeiden. Um das Potential dieser Methode zu demonstrieren, zeigen wir hier die Lokalisation von Adipophilin-GFP in den Kernmembranen transfizierter NPC Fibroblasten mit Hilfe von primären Antikörpern sowohl getrennt gegen Adipophilin und gegen GFP als auch nach Doppelmarkierung mit zwei unterschiedlich großen Goldpartikeln in Gefrierbruchreplika.

Die Abbildung 18 zeigt, dass nach Inkubation der Gefrierbruchreplikas mit GFP- (Abb. 18A) und Adipophilin-Antikörpern (Abb. 18B) und entsprechenden goldmarkierten sekundären Antikörpern Adipophilin-GFP nicht nur auf der P-Hälfte der äußeren Kernmembran wie im Falle bei endogenem Adipophilin in



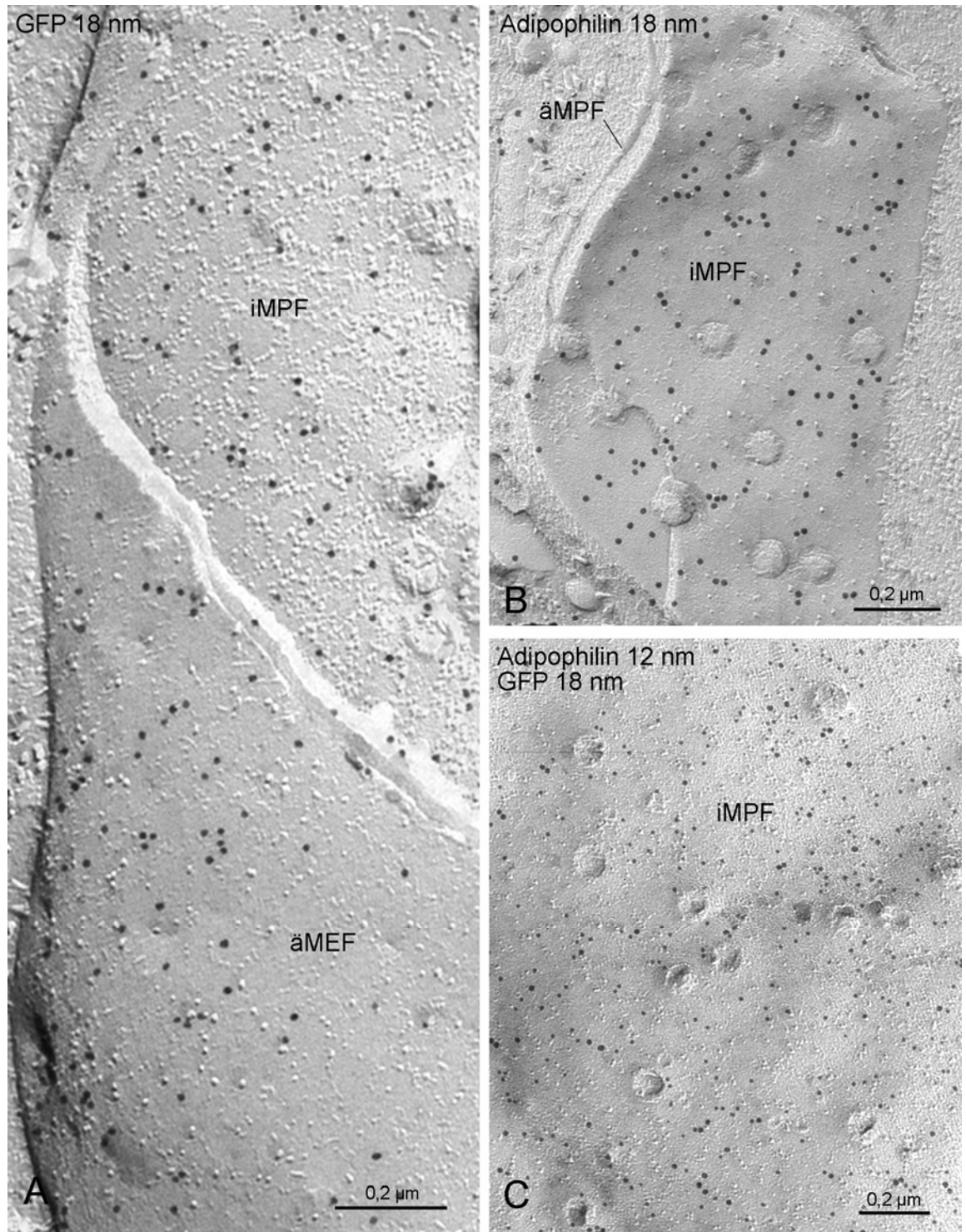


Abbildung 18: Gefrierbruchreplikas von Kernmembranen aus NPC Fibroblasten nach Transfektion mit Adipophilin-GFP und Immungoldmarkierung. Adipophilin-GFP ist in allen vier möglichen Kernmembranbruchflächen lokalisiert. Die Immungoldmarkierung erfolgte mit GFP- (A), Adipophilin- (B) und gleichzeitig mit beiden Antikörpern (C).

Makrophagen (siehe Abb.12 und 13) lokalisiert ist, sondern auch auf den E-Hälften der äußeren Kernmembran und beiden Membranhälften der inneren Kernmembran. Diese Beobachtung wird durch die Doppelmarkierung von Adipophilin und GFP mit unterschiedlich großen Goldpartikeln bestätigt (Abb. 18C).

Die Daten belegen, dass es vermutlich aufgrund der Kopplung von Adipophilin an GFP zu einer Umverteilung des Adipophilins in den transfizierten Zellen kommt. Im Gegensatz zu natürlich vorkommendem endogenem Adipophilin ausschließlich in der P-Hälfte der äußeren Kernmembran, lässt sich in Adipophilin-GFP transfizierten Zellen darüber hinaus eine Lokalisation in der E-Hälfte der äußeren Kernmembran und in den beiden Membranbruchflächen der inneren Kernmembran nachweisen. Die Ergebnisse aus diesen Experimenten zeigen, dass sich die Methode der SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie speziell zur Untersuchung der Topographie und Orientierung von Proteinen in Membranen eignet.

#### 3.2.5.2 Makrophagen

Um weitere Informationen über die Verteilung von Adipophilin-GFP zu gewinnen, wurde Adipophilin-GFP in THP1 Makrophagen überexprimiert. Wir haben dazu ein Adipophilin-Deletionskonstrukt hergestellt, bei dem am C-Terminus des Proteins die Aminosäuren 1-181 fehlten. Dieses Deletionsprotein wurde an GFP gekoppelt und in Makrophagen transfiziert. Die Immungoldmarkierung wurde mit Antikörpern gegen GFP durchgeführt.

Dieses Deletionsprotein ist – wie endogenes Adipophilin - immer noch in der Lage, an Lipidtropfen, dem eigentlichen Bestimmungsort, zu binden (Abb. 19A). Ferner ist es, wie bereits beschrieben, in der Plasmamembran lokalisiert (Abb. 19B) (Robenek et al., 2005). Daraus lässt sich schließen, dass dieses Adipophilin-Deletionskonstrukt, zumindest was seine Lokalisation in der Plasmamembran und den Lipidtropfen betrifft, sich wie endogenes natives Adipophilin verhält.

Darüber hinaus sind alle vier möglichen Bruchflächen der Kernmembranen markiert. In den Abbildungen 20-22 sind die Markierungsmuster des Adipophilin-Deletionsproteins dargestellt.

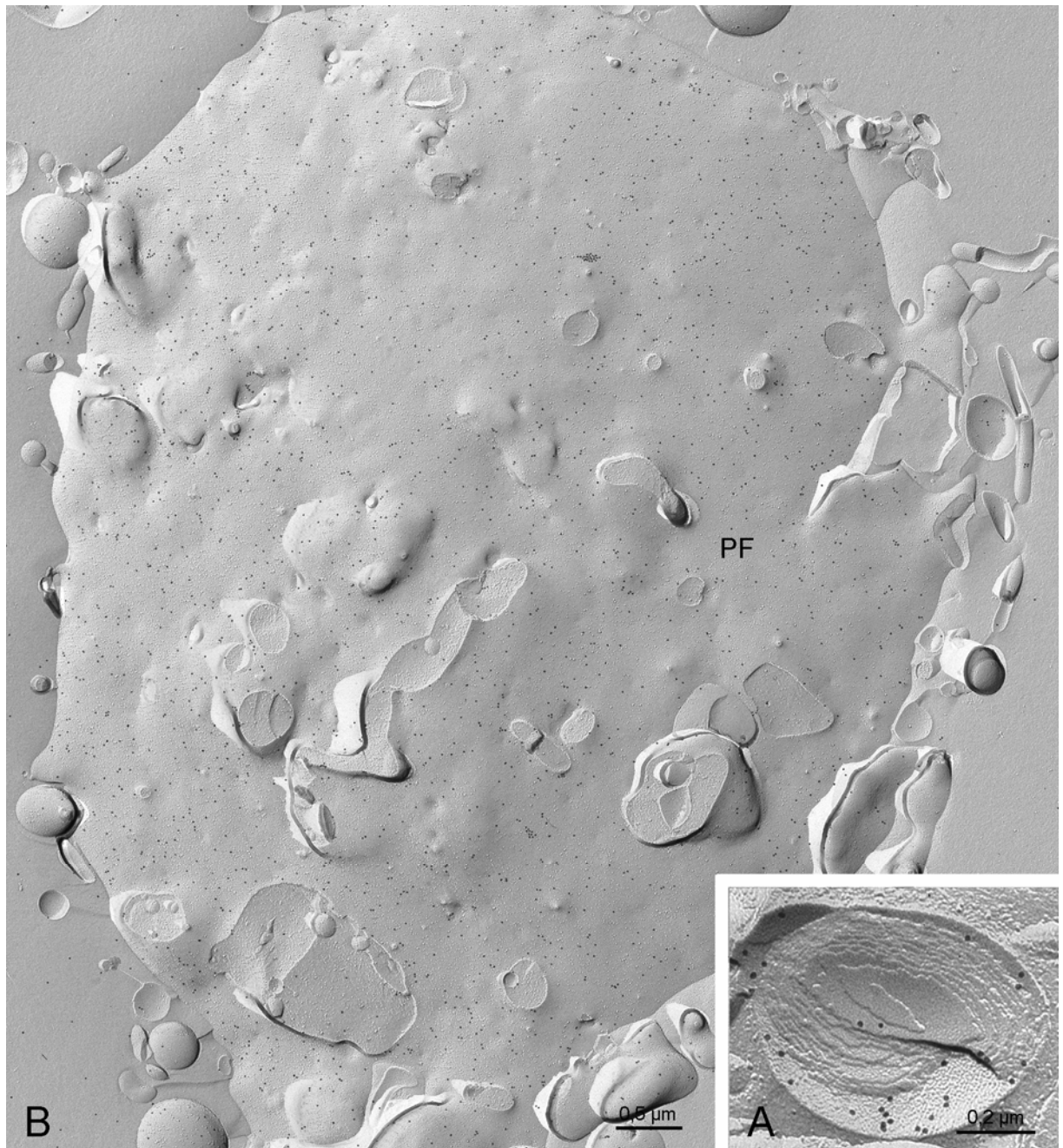


Abbildung 19: Gefrierbruchreplika eines THP1 Makrophagen und Immunogoldmarkierung von Adipophilin-Deletionskonstrukt-GFP. Die Goldpartikel sind sowohl auf Lipidtropfen (A) als auch auf der P-Hälfte der Plasmamembran (B) lokalisiert.

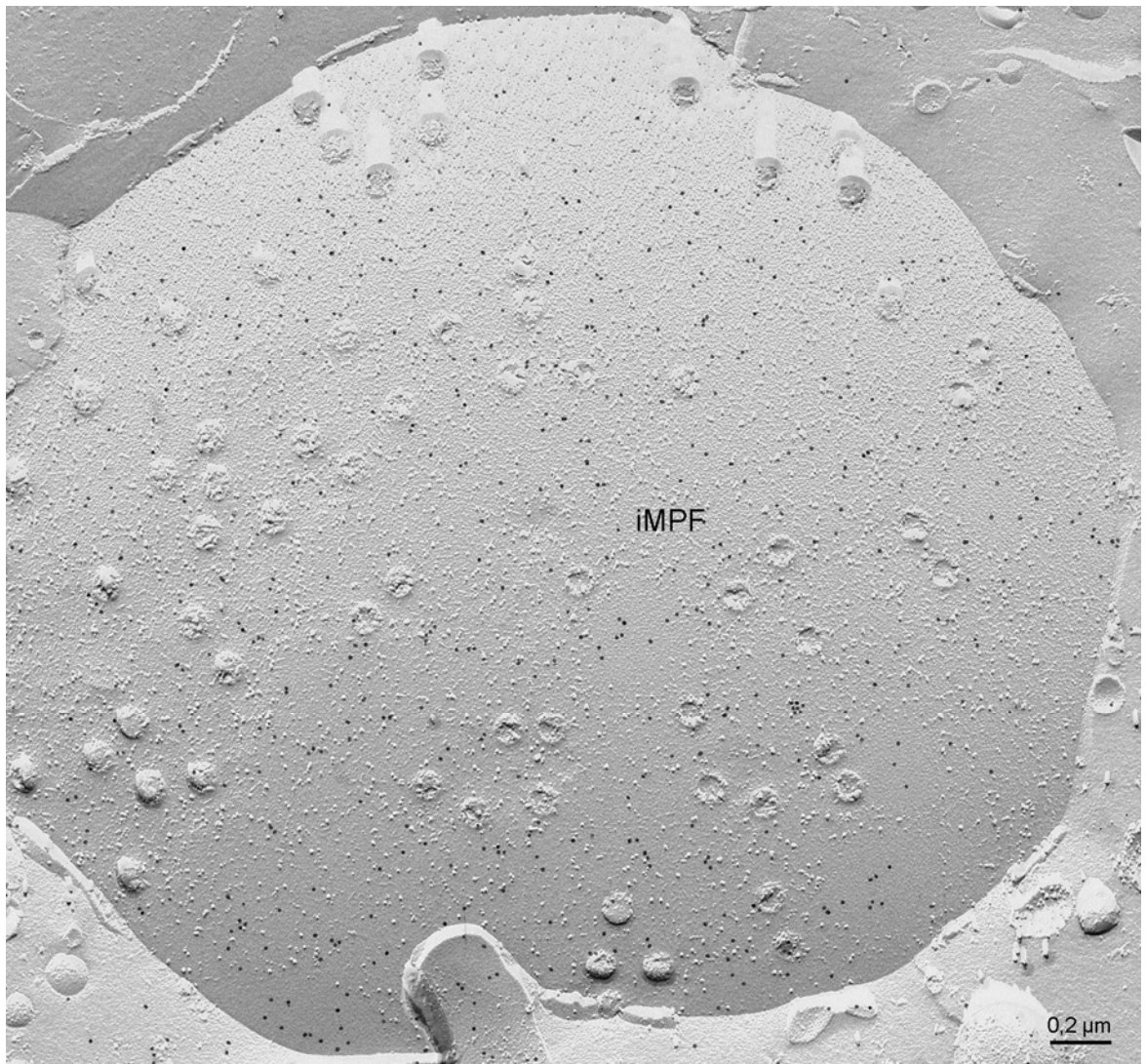


Abbildung 20: Gefrierbruchreplika eines Zellkerns aus einem THP1 Makrophagen und Immungoldmarkierung von Adipophilin-Deletionskonstrukt-GFP. Die Goldpartikel sind gleichmäßig auf der P-Hälfte der inneren Kernmembran verteilt.

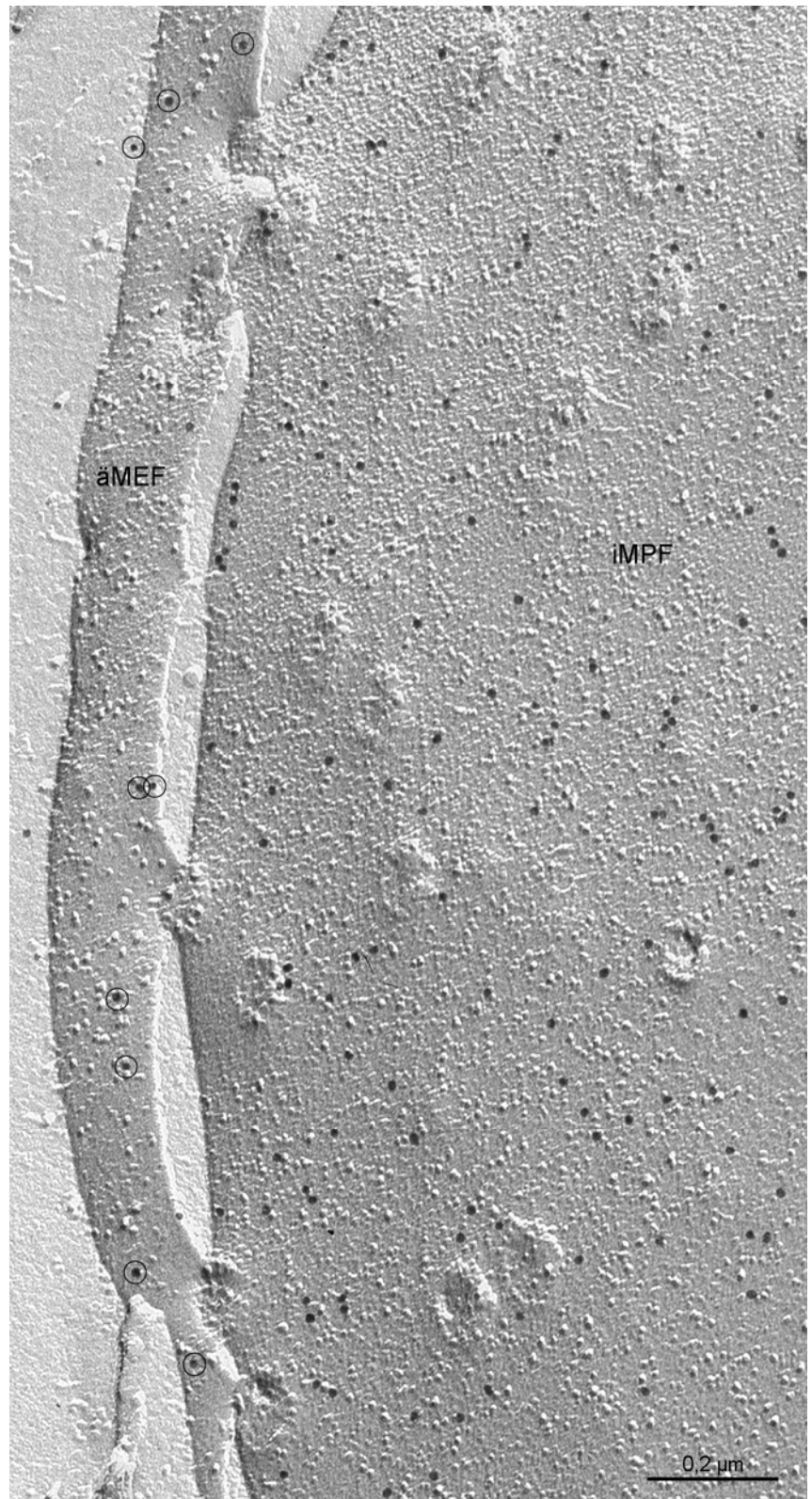


Abbildung 21: Gefrierbruchreplika eines Zellkerns aus einem THP1 Makrophagen und Immungoldmarkierung von Adipophilin-Deletionskonstrukt-GFP. Es ist sowohl die E-Hälfte der äußeren als auch die P-Hälfte der inneren Kernmembran markiert.

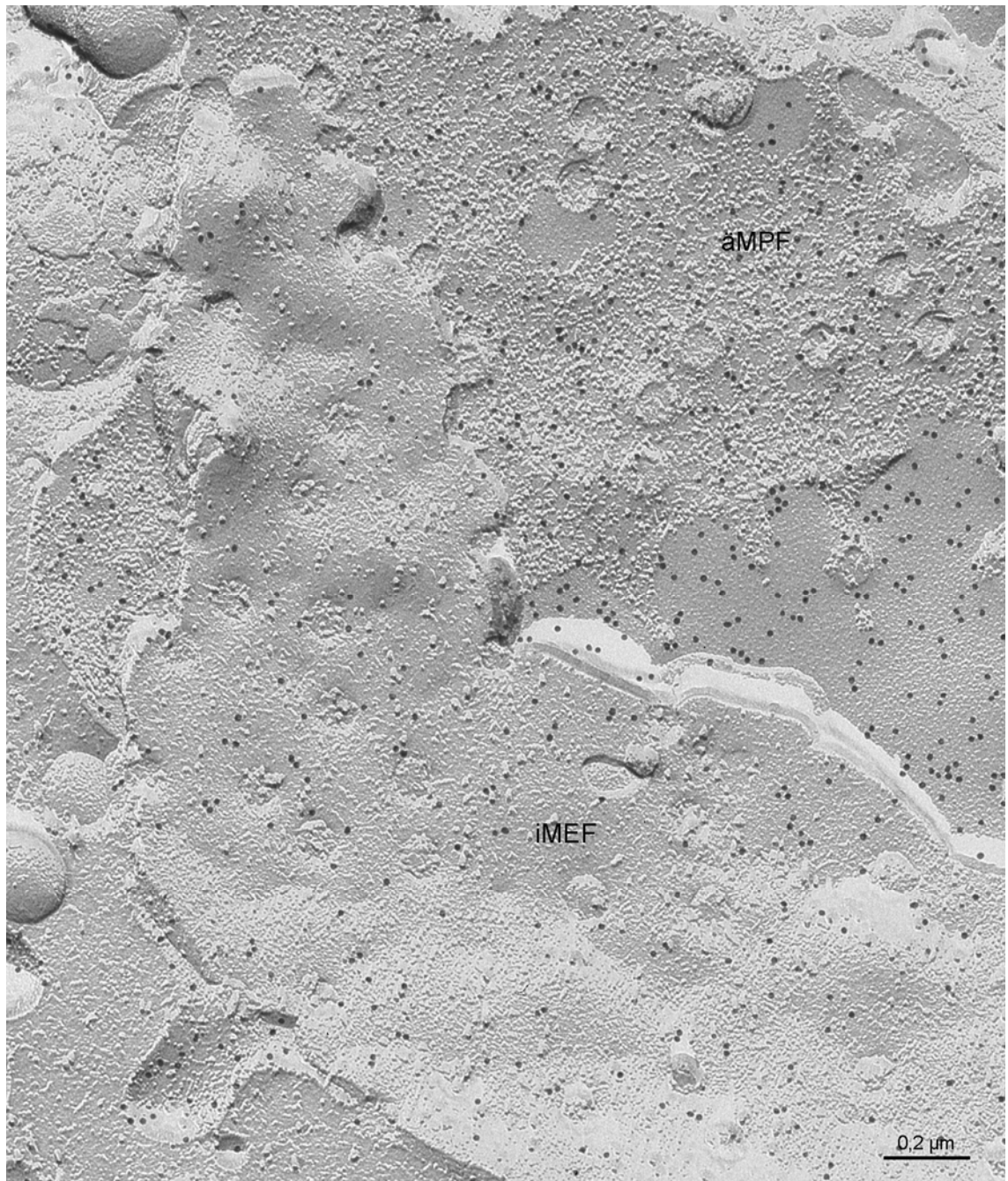


Abbildung 22: Gefrierbruchreplika eines Zellkerns aus einem THP1 Makrophagen und Immungoldmarkierung von Adipophilin-Deletionskonstrukt-GFP. Es ist sowohl die E-Hälfte der inneren als auch die P-Hälfte der äußeren Kernmembran markiert.

Diese Daten deuten darauf hin, dass die Kopplung des GFP an das Adipophilin-Deletionskonstrukt zu einer abnormen Orientierung des Adipophilin-Deletionskonstruktes in den Kernmembranen führt, da das endogene Protein unter normalen Bedingungen ausschließlich in der P-Hälfte der äußeren Kernmembran gefunden wurde.

## 4. DISKUSSION

### 4.1 METHODISCHE ASPEKTE

Die Morphologie von Zellen kann nur mit Hilfe der Mikroskopie untersucht werden. Unser Wissenszuwachs über den Aufbau von Zellen und ihren Komponenten ist daher engstens mit der Entwicklung und Anwendung leistungsfähiger Mikroskope und Techniken zur Probenvorbereitung verbunden. Die mikroskopischen Techniken erfahren heute eine rasante Entwicklung. Sowohl licht- als auch elektronenmikroskopische Verfahren haben heute durch ihren Vorstoß bis in den makromolekularen Bereich der Ultrastrukturforschung unsere Kenntnisse über die Feinstruktur der Zellen in hervorragender Weise verbessert. In vielen Fällen sind neue Verfahren erst vom Prinzip her demonstriert. Die Prüfung ihrer Anwendbarkeit in der biologischen Grundlagenforschung und die problemgerichtete Nutzung nimmt erst ihren Anfang.

#### 4.1.1 Konventionelle Transmissionselektronenmikroskopie

Methoden der klassischen Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) sind heute fester Bestandteil bei der Untersuchung vieler biologischer Proben. Neben der Standard-TEM wurden insbesondere im Bereich der Immunzytochemie in den letzten Jahren durch die Entwicklung von Kryotechniken und Tieftemperatur-Einbettungsmedien sowie der Entwicklung von Markersystemen bedeutende Fortschritte erzielt (Plattner und Hentschel, 2002; Robenek, 1992). Die Kryoelektronenmikroskopie ist eine Methode, deren Potential in der biomedizinischen Forschung bisher allerdings nur sehr unvollkommen ausgeschöpft wurde. Insgesamt steht uns heute auf feinstrukturellem Niveau ein breites Methodenspektrum zur Verfügung, und der derzeitige Stand der TEM-Techniken ermöglicht unter Anwendung einzelner bzw. in Kombination mit verschiedenen Methoden die Bearbeitung von qualitativen und quantitativen Fragestellungen sowie Aussagen zu funktionellen Zusammenhängen.



#### 4.1.2 Kryoultramikrotomie

Für viele Antigene, die nicht an Kunstharz-eingebetteten Zellen darstellbar sind, hat sich die Kryoultramikrotomie für die Elektronenmikroskopie besonders bewährt. Das Objekt muss allerdings auch für diesen Präparationsvorgang stabilisiert werden. Zum Unterdrücken von Eiskristallartefakten beim Einfrieren verwendet man eine 2,3 M Saccharoselösung als Frostschutz. Eine solche hochkonzentrierte Lösung kann jedoch nur an durch chemische Fixation stabilisierten Zellen angewandt werden. Hierzu genügen Aldehyde in vergleichsweise schwachen Konzentrationen, welche in den meisten Fällen die Immunaktivität nicht störend beeinflussen.

Ein vollständiger Verzicht auf chemische Fixierung ist nur mit Hilfe der Kryofixation möglich. Damit wird auch eine ultrastrukturelle Darstellung hochempfindlicher antigener Bindungsstellen erreicht, die sonst schon bei schwacher chemischer Fixierung zerstört werden.

#### 4.1.3 Gefrierbruchmethode

Die Einführung der Gefrierbruchmethode und ihre erfolgreiche Weiterentwicklung und Anwendung auf biologische Systeme hat die Untersuchung der Membranstruktur revolutioniert und zur Entdeckung einer Fülle vorher ungeahnter Details der Membranarchitektur geführt. Ferner sind durch die breite Anwendung dieser Methode neue Perspektiven zum Verständnis der Beziehungen zwischen Membranstruktur und ihrer Funktion eröffnet worden. Der Verlauf des Gefrierbruchs entlang der hydrophoben Zone der Lipid-Doppelschicht der Membran und die daraus resultierende Flächendarstellung der Membraninnenansichten ist eine der wesentlichsten Vorteile dieser Methode. Während die konventionelle Dünnschittechnik nur Schnittbilder liefert und in den Dünnschnitten ein vorwiegend laminarer Schichtenaufbau der Membran sichtbar wird, lässt sich in Gefrierbruchreplikas bei ähnlichem Auflösungsvermögen ein wesentlich differenzierteres Membranbild beobachten. In den Gefrierbruchreplikas der Membranen tritt vor allem eine granuläre Substruktur hervor. Hierbei handelt es sich um die intramembranösen Partikel (IMP). Ihre Darstellung in den Replikas ermöglicht

auf diese Weise eine detaillierte Analyse ihrer Topographie und Dynamik unter physiologischen, experimentellen und pathologischen Bedingungen. Die Methodik zur Identifikation spezifischer Proteine in gefriergebrochenen Membranen ist bisher weitestgehend auf einen morphologischen Vergleich von Form und Größe der IMP beschränkt geblieben. Eine direkte immunzytochemische Markierung bestimmter IMP würde hier bessere Ergebnisse liefern.

#### 4.1.4 Gefrierbruch-Immunzytochemie

Die Entwicklung von Verfahren, die eine gleichzeitige subzelluläre Lokalisation und biochemische Identifizierung der Membranproteine erlauben, ist daher seit langem das Hauptziel der Gefrierbruchmethode. Pinto da Silva und Kan (1984) entwickelten mit der „label-fracture“ Technik eine zytochemische Methode, bei der die Markierung vor dem Gefrierbruch an der Außenseite der Membranen durchgeführt wird. Eine Abwandlung dieser Technik stellt die „fracture-flip“ Methode dar (Andersson-Forsman und Pinto da Silva, 1988). Hier werden vor dem Gefrierbruch markierte Zellen gefriergebrochen und zunächst nur mit Kohlenstoff bedampft. Die Kohlenstoff-Replikas werden dann in einem zweiten Schritt invertiert und nochmals mit Platin bedampft. Auch nach dem Gefrierbruch wurde versucht, die erzeugten Replikas zu markieren (Dinchuk et al., 1987; Gruijters et al., 1987). Der Hauptnachteil aller dieser Techniken besteht jedoch darin, dass nur Immunzytochemie an der äußeren exoplasmatischen Hälfte (EF) der Membranen möglich ist. Die innere protoplasmatische Hälfte (PF) erwies sich mit diesen Methoden als unzugänglich. Ferner sind die bisher eingeführten Methoden umständlich, kompliziert und wenig reproduzierbar. Ihre Aussagekraft ist oft limitiert und ungenau, so dass sie daher keine weite Verbreitung gefunden haben.

Erst durch die Verwendung des Detergens Sodium Dodecyl Sulfat (SDS) anstelle von Chlorbleiche für die Reinigung der Replikas von anhaftenden Zellresten ist es möglich, auch die P-Hälften von Membranen nach dem Gefrierbruch zytochemisch zugänglich zu machen. Die Methode der SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie geht von nativen, chemisch unfixierten, wasserhaltigen Zellen aus. Daraus ergibt sich eine verbesserte

Strukturerhaltung, wie sie für die Kryofixierungsmethode bekannt ist (Dubochet und Sartori Blanc, 2001; Murk et al., 2003). Demgegenüber treten in chemisch fixierten, entwässerten und eingebetteten Zellen häufig Artefakte durch Schrumpfung (Vernetzung) auf. Während der Entwässerung und Einbettung werden oftmals antigen-wirksame Strukturen geschädigt. Die Kryofixierung resultiert in einer verbesserten Erhaltung der Antigene und damit einer erhöhten Bindung der verwendeten Antikörper.

Nach der Reinigung der Replikas von Zellresten bleiben Membranlipide, periphere Membranproteine und Transmembranproteinkomplexe am Platin/Kohlenstoff Replika ortsfest gebunden. Diese Biomoleküle können mit physiologischem Puffer schonend reaktiviert werden und sind dann der Immunmarkierung zugänglich.

Die SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie basiert auf der Hypothese, dass die gespaltenen Membranhälften nach dem Gefrierbruch durch die Platin/Kohlenstoffbedampfung auf die apolare Bruchfläche physikalisch stabilisiert (fixiert) werden und die Membrankomponenten dadurch unlöslich für Detergentien werden.

Die Signifikanz dieser Hypothese für integrale Membranproteine wurde von Fujimoto (1995) für Connexine in gap junctions und Occludin in tight junctions gezeigt. Es lassen sich auch asymmetrische Membranlipidverteilungen unter Verwendung lipidspezifischer monoklonaler Antikörper nachweisen (Fujimoto et al., 1996). Mittlerweile ist diese Methode für die Lokalisation verschiedener Proteine eingesetzt worden (siehe Severs und Robenek, 2007; Robenek und Severs, 2007). Die bisher durchgeführten Untersuchungen zur Lokalisation zahlreicher Proteine in Biomembranen haben einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis ihrer Struktur- und Funktionsbeziehungen geliefert. Der entscheidende Vorteil der Methode ist die spezifische Erfassung flächenhafter Protein- oder Lipidverteilungsmuster in der Membranebene mit hoher Ortsauflösung (20-30 nm) und die Erfassung zeitlicher Veränderungen von Verteilungsmustern bei Wechselwirkungsprozessen. Die Markierungseffizienz für Membranproteine ist am Gefrierbruchreplika gegenüber chemisch fixierten und eingebetteten Zellen stark erhöht und sie kann durch Variationen der Bedampfungsbedingungen noch verbessert werden (Schlörmann et al., 2007). Die Methode der SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie kann zusätzlich zur

Proteinlokalisierung auch Hinweise zur Orientierung von Proteinen in der Membran geben. Ferner kann sie nicht nur zwischen Membran-Mikrodomänen der Innen- und Außenseite von Membranen differenzieren, sondern sie kann auch auf Proteine des Zytoplasmas angewendet werden. Eine weiterführende Anwendungsmöglichkeit der SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie ist die genaue Lokalisation von GFP-gekoppelten Proteinen in transfizierten Zellen, wie sie erstmals hier in der vorliegenden Arbeit am Beispiel von Adipophilin beschrieben wird. Eine noch genauere Lokalisation von Proteinepitopen wäre mit der SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie durch Anwendung von Nanogold-gekoppelten Primärantikörpern zu erwarten.

## 4.2 LOKALISATION DER KERNMEMBRAN-PROTEINE: EIN VERGLEICH

### 4.2.1 LAP2 $\beta$ und Emerin

Es gibt eine Reihe von Arbeiten, die sich mit dem Transport integraler Membranproteine in die innere Kernmembran beschäftigt haben (Smith und Blobel, 1993; Wu et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass die karyoplasmatischen Domänen von LAP2 $\beta$  und Emerin über Signalsequenzen für den gerichteten Transport in die innere Kernmembran verfügen. Es wird angenommen, dass die an den Membranen des rauhen Endoplasmatischen Retikulums synthetisierten Proteine in die Membranen des Endoplasmatischen Retikulums inkorporiert werden. Da die Membranen des Endoplasmatischen Retikulums kontinuierlich mit den Membranen des Kerns in Verbindung stehen, können die Proteine dann in die innere Kernmembran diffundieren. Die Proteine erreichen die innere Kernmembran, indem sie den Kanal des Kernporen-Komplexes passieren (Wu et al., 2002). Wenn sie in der P-Hälfte der inneren Kernmembran angekommen sind, werden sie gebunden und in ihrer Mobilität blockiert. Im Gegensatz zu Caveolin-1 können sie unter normalen Bedingungen nicht in die Membranen des Endoplasmatischen Retikulums zurückdiffundieren. Die Blockierung des freien Transportes von LAP2 $\beta$  und Emerin geschieht wahrscheinlich entweder durch Bindung an Lamine, die sich in der Lamina befinden, oder/und an Chromatin. In den in dieser Arbeit untersuchten Zellen

konnte weder LAP2 $\beta$  noch Emerin in den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums nachgewiesen werden.

Die Lokalisation von LAP2 $\beta$  und Emerin in den inneren Kernmembranen konnte in dieser Arbeit – wie erwartet – auf hervorragende Weise mit der SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie bestätigt werden. Durch Verzicht auf die Fixierung der Zellen bei der Herstellung der Replikas wurde eine intensive Immungoldmarkierung als immunzytochemischer Nachweis von LAP2 $\beta$  und Emerin in den inneren Kernmembranen erzielt. Die Immungoldmarkierung ist ausschließlich auf den P-Hälften der inneren Kernmembranen lokalisiert. In den E-Hälften der inneren und beiden Hälften der äußeren Kernmembranen sowie den Membranen aller anderen Zellorganellen, einschließlich der Plasmamembranen, konnte keine Immungoldmarkierung für diese beiden Proteine beobachtet werden.

#### 4.2.2 Caveolin-1

Während Arbeiten zur Lokalisation von Caveolin-1 in Plasmamembranen verschiedener Zellen vorliegen, ist über die Lokalisation von Caveolin-1 in intrazellulären Membranen nur wenig berichtet worden (Li et al., 2001). Im Gegensatz zu LAP2 $\beta$  und Emerin ist Caveolin-1 ausschließlich auf den E-Hälften sowohl der inneren als auch der äußeren Kernmembranen lokalisiert. Zusätzlich konnten Robenek et al. (2003; 2004) in kultivierten humanen glatten Muskelzellen, Endothelzellen, Makrophagen und Fibroblasten weitere Kompartimente identifizieren, in denen Caveolin-1 vorkommt, wie zum Beispiel auf der Zelloberfläche in der Plasmamembran und den Caveolae und im Zellinneren im Endoplasmatischem Retikulum, Golgi-Apparat, Trans-Golgi-Netzwerk und den Lipidtropfen. Während die Immungoldmarkierung als zytochemischer Nachweis für Caveolin-1 in den untersuchten Zellen ausschließlich auf den P-Hälften der Plasmamembranen beobachtet wurde, ist sie bei den intrazellulären Kompartimenten, einschließlich der Zellkerne, ausschließlich auf den E-Hälften der Membranen lokalisiert. Caveolin-1 ist sowohl auf der E-Hälfte der inneren als auch der äußeren Kernmembran in etwa gleicher Menge vorhanden.

#### 4.2.3 Adipophilin und Adipophilin-GFP

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) hat die Möglichkeiten, die Lokalisation und den Transport von Proteinen in lebenden Zellen zu verfolgen, revolutioniert (Chalfie et al., 1994; Prior et al., 2001). GFP ist ein Protein aus der Qualle *Aequora victoria*, besteht aus 238 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 29,6 kDa. Bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht fluoresziert es grün. GFP kann als Marker für andere Proteine benutzt werden, indem es mit beliebigen anderen Proteinen genspezifisch fusioniert wird. Durch die Fluoreszenz des GFP kann so die räumliche und zeitliche Verteilung des Proteins in lebenden Zellen, Geweben oder sogar ganzen Organismen direkt beobachtet werden. Zur Herstellung von GFP-Fusionsproteinen wird die DNA des zu untersuchenden Proteins mit der GFP-DNA verbunden und in einen Vektor gebracht, der von der Zelle aufgenommen werden kann. Das Fusionsprotein wird von der Zelle hergestellt und im günstigsten Fall an seinen korrekten Bestimmungsort in der Zelle transportiert. Mit dem an das zu untersuchende Protein gekoppelte GFP steht ein natürlich fluoreszierender molekularer Marker zur Verfügung, der ungiftig für Zellen ist und leicht im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden kann. Neue Varianten des fluoreszierenden Proteins und Fortschritte in der bildgebenden Technologie haben gleichermaßen den ursprünglichen Anwendungsbereich zur Analyse der Funktion von Proteinen enorm erweitert. Trotz der großen Fortschritte, die auf diesem Gebiet erzielt wurden, gibt es eine Reihe von bisher ungelösten Problemen bei der Anwendung dieser Methode. Ungeklärt ist die Frage, welche möglichen Veränderungen der Eigenschaften der Proteine durch die Kopplung an das GFP hervorgerufen werden können, die sich auf die Funktion, ihre Transportrouten oder ihre Orientierung in den Membranen auswirken könnten. Ein weiterer Nachteil ist die geringe Auflösung der Fluoreszenzmikroskopie, die eine zweifelsfreie Identifizierung aller zellulärer Organellen und präzise Zuordnung des fluoreszierenden Signals in oder an ihren Membranen nicht zulässt.

Mit der SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie waren wir in der Lage, die oben genannten Nachteile weitestgehend zu überwinden. Diese Methode hat alle Vorteile der Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie durch die hochauflösende

Darstellung der Membranbruchflächen von Organellen kombiniert mit der Fähigkeit GFP nach Immungoldmarkierung mit hoher Präzision auf den Membranbruchflächen zu lokalisieren. Sie ermöglicht die spezifische Erfassung flächenhafter Adipophilin- und Adipophilin-GFP-Verteilungsmuster in der Membranebene. Zusätzlich zur Proteinlokalisierung gibt die SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie auch Hinweise ihrer Orientierung in der Membran.

In dieser Arbeit stand der Vergleich der Integration von Adipophilin und Adipophilin-GFP in Kernmembranen im Mittelpunkt. Die Gefrierbruchtechnik erlaubt es, die Spaltflächen der inneren und äußeren Kernmembranen zu unterscheiden. Die dem Zytoplasma zugewandte Spaltfläche (PF) der äußeren Kernmembran ist durch ihre konkave Form und ihren hohen Besatz an IMP zu identifizieren, während die dem perinukleären Raum zugewandte exoplasmatische Spaltfläche der äußeren Kernmembran konvex geformt ist und nur wenige IMP aufweist. Die dem Karyoplasma zugewandte Spaltfläche (PF) der inneren Kernmembran ist durch eine konvexe Form und ihren hohen IMP-Besatz gekennzeichnet, während die dem perinukleären Raum zugewandte exoplasmatische Spaltfläche (EF) der inneren Kernmembran konkav geformt ist und nur wenige IMP aufweist.

In NPC Fibroblasten und THP1 Makrophagen, die mit Adipophilin- bzw. Adipophilin-Deletionskonstrukt-GFP transfiziert wurden, fand sich eine Immungoldmarkierung auf allen vier möglichen Bruchflächen der Kernmembranen. Im Gegensatz dazu war endogenes natives Adipophilin in Makrophagen ausschließlich auf der P-Hälfte der äußeren Kernmembran vorhanden.

Diese Umverteilung und Fehlorientierung von Adipophilin ist vermutlich auf seine Kopplung an GFP zurückzuführen.

Die Darstellung der unterschiedlichen Verteilung von Adipophilin- und Adipophilin-Deletionskonstrukt-GFP demonstriert, dass mit der SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie mit GFP gekoppelte Proteine bei hoher Auflösung in einer Reihe von Zellen, Organellen und Membransystemen präzise lokalisiert werden können. Mit dieser Methode kann die spezifische Membranhälfte eindeutig identifiziert werden, in der ein Protein integriert ist und ob diese Lokalisation und Orientierung in der Membran durch die Kopplung an GFP verändert ist.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass bei der Darstellung von Membranen die SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie allen bisherigen Methoden überlegen ist und zur Zeit die Methode der Wahl bei der Identifizierung der Lokalisation und Dynamik von Membran-Proteinen in situ darstellt.



## 5. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Der Zellkern ist von einer Hülle, die aus der inneren und äußeren Kernmembran besteht, umgeben. Diese Arbeit verfolgte das Ziel, mit Hilfe der Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)-Gefrierbruch-Immunzytochemie neue Erkenntnisse über die Expression und Lokalisation von Proteinen in den Kernmembranen zu gewinnen. Die Untersuchungen konzentrierten sich auf die Proteine LAP2 $\beta$ , Emerin, Caveolin-1 und Adipophilin in arteriellen glatten Muskelzellen, Endothelzellen, Makrophagen und Fibroblasten. Grundlage der SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie bildet die elektronenmikroskopische Darstellung der Proteine in Platin/Kohle Replikas von Bruchflächen der Kernmembranen mittels primärer und goldmarkierter sekundärer Antikörper.

Insgesamt lassen sich vier Membranbruchflächen der Kernhülle unterscheiden: die dem Zytoplasma zugewandte Bruchfläche (PF) der äußeren Kernmembran ist durch ihre konkave Form zu identifizieren, während die der perinukleären Zisterne zugewandte Bruchfläche (EF) konvex geformt ist. Die dem Karyoplasma zugewandte Bruchfläche (PF) der inneren Kernmembran ist durch eine konvexe Form gekennzeichnet, während die der perinukleären Zisterne zugewandte Bruchfläche (EF) konkav geformt ist.

LAP2 $\beta$  und Emerin sind ausschließlich auf den P-Hälften der inneren Kernmembranen lokalisiert. Caveolin-1 ist ausschließlich auf den E-Hälften sowohl der inneren als auch der äußeren Kernmembranen lokalisiert. Endogenes natives Adipophilin ist in THP1 Makrophagen ausschließlich auf den P-Hälften der äußeren Kernmembranen vorhanden. Im Gegensatz dazu fand sich in NPC Fibroblasten und THP1 Makrophagen, die mit Adipophilin-GFP bzw einem Adipophilin-Deletionskonstrukt-GFP transient transfiziert wurden, die Immungoldmarkierung auf allen vier möglichen Bruchflächen der Kernmembranen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass mit der SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie Unterschiede in der Verteilung von Proteinen in den Kernmembranen präzise lokalisiert werden können. Ferner kann die spezifische Membranhälfte eindeutig identifiziert werden, in der ein Protein integriert ist. Am Beispiel von Adipophilin konnte gezeigt werden, dass seine Kopplung an GFP

zu einer Umverteilung und einer Umorientierung in den Kernmembranen von transfizierten Zellen führen kann.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass die SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie bei der Darstellung von Membranen allen bisherigen Methoden überlegen ist und zur Zeit die Methode der Wahl bei der Identifizierung der Lokalisation und Dynamik von Membran-Proteinen in situ darstellt.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- Akhtar A, Gasser SM (2007) The nuclear envelope and transcriptional control. *Nature* 8, 507-517
- Andersson-Forsman C, Pinto da Silva P (1988) Fracture-flip: new high-resolution images of cell surfaces after carbon stabilization of freeze-fractured membranes. *J Cell Sci* 90, 531-541
- Bione S, Maestrini E, Rivella S, Mancini M, Regis S, Romeo G, Toniolo D (1994) Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* 8, 323-327
- Bonne G, DiBarletta MR, Varnous S, Becane HM, Hamonda EH, Merlini L (1999) Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* 21, 285-288
- Bonne G, Mercuri E, Muchir A, Urtizberea A, Becane H-M, Recan D, Merlini L, Wennert M, Boor R, Reuner U (2000) Clinical and molecular genetic spectrum of autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy due to mutations of the lamin A/C gene. *Ann Neurol* 48, 170-180
- Branton D, Bullivant S, Gilula NB, Karnovsky MJ, Moor H, Mühlethaler K, Northcote DH, Packer L, Satir B, Satir P, Speth V, Staehelin LA, Steere RL, Weinstein RS (1975) Freeze-etching nomenclature. *Science* 190, 54-56
- Bretscher MS (1973) Membrane structure: some general principles. *Science* 181, 622-629
- Bretscher MS, Munro S (1993) Cholesterol and the golgi apparatus. *Science* 261, 1280-1281
- Bridger JM, Kill JR, O'Farrel M, Hutchison CJ (1993) Internal lamin structures within G1 nuclei of human dermal fibroblasts. *J Cell Sci* 104, 297-306
- Broers JC, Machiels BM, Kuijpers HJ, Smedts FR, Raymond Y, Ramaekers FC (1997) A- and B-type lamins are differently expressed in normal human tissues. *Histochem Cell Biol* 107, 505-517
- Broers JC, Machiels BM, Van Eys GJ, Kuijpers HJ, Manders EM, Van Driel R, Ramaekers FC (1999) Dynamics of the nuclear lamina as monitored by GFP-tagged A-type lamins. *J Cell Sci* 112, 3463-3475

- Brown DA, London E (1997) Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes? *Biochem Biophys Res Commun* 240, 1-7
- Brown DA, London E (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 111-136
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805
- Chamley-Campbell C, Campbell GR, Ross R (1979) The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev* 59, 1-61
- Danielli JF, Davson H (1935) A contribution to the theory of permeability of thin films. *J Cell Physiol* 5, 495-508
- Dechat T, Vlcek S, Foisner R (2000) Review: lamina-associated polypeptide 2 isoforms and related proteins in cell cycle-dependent nuclear structure dynamics. *J Struct Biol* 129, 335-345
- Devaux PF, Zachowski A (1994) Maintenance and consequences of membrane phospholipid asymmetry. *Chem Phys Lipids* 73, 107-120
- Dietzen DJ, Hastings WR, Lublin DM (1995) Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J Biol Chem* 270, 6838-6842
- Dinchuk JE, Johnson TJA, Rash JE (1987) Postreplication labelling of E-leaflet molecules: membrane immunoglobulins localized in sectioned, labelled replicas examined by TEM and HVEM. *J Electron Microscop Tech* 7, 1-16
- Dubochet J, Sartori Blanc N (2001) The cell in absence of aggregation artifacts. *Micron* 32, 91-99
- Emery AE (2000) Emery-Dreifuss muscular dystrophy – a 40year retrospective. *Neuromuscul Disord* 10, 228-232
- Fairley EA, Kendrick-Jones J, Ellis JA (1999) The Emery-Dreifuss muscular dystrophy phenotype arises from aberrant targeting and binding of emerin at the inner nuclear membrane. *J Cell Sci* 112, 2571-2582
- Foisner R, Gerace L (1993) Integral membrane proteins of the nuclear envelope interact with lamins and chromosomes, and binding is modulated by mitotic phosphorylation. *Cell* 73, 1267-1279
- Fujimoto K (1995) Freeze-fracture replica electron microscopy combined with SDS digestion for cytochemical labelling of integral membrane proteins.

- Application to the immunogold labelling of intercellular junctional complexes. *J Cell Sci* 108, 3443-3449
- Fujimoto K (1997) SDS-digested freeze-fracture replica labelling electron microscopy to study the two-dimensional distribution of integral membrane proteins and phospholipids in biomembranes: practical procedure, interpretation and application. *Histochem Cell Biol* 107, 87-96
- Fujimoto K, Nagafuchi A, Tsukita S, Kuraoka A, Ohokuma A, Shibata Y (1997a) Dynamics of connexins, E-cadherin and  $\alpha$ -catenin on cell membranes during gap junction formation. *J Cell Sci* 110, 311-322
- Fujimoto K, Noda T, Fujimoto T (1997b) A simple and reliable quick freezing/freeze-fracturing procedure. *Histochem Cell Biol* 107, 81-84
- Fujimoto T, Hagiwara H, Aoki T, Kogo H, Nomura (1998) Caveolae: a morphological point of view. *J Electron Microsc* 47, 451-460
- Fujimoto T, Kogo H, Nomura R, Une T (2000) Isoforms of caveolin-1 and caveolar structure. *J Cell Sci* 113, 3509-3517
- Fujimoto K, Umeda M, Fujimoto T (1996) Transmembrane phospholipid distribution revealed by freeze-fracture replica labelling. *J Cell Sci* 109, 2453-2460
- Fujimoto T, Kogo H, Ishiguro K, Tauchi K, Nomura R (2001) Caveolin-2 is targeted to lipid droplets, a new membrane domain in the cell. *J Cell Biol* 152, 1079-1086
- Furukawa K, Pante N, Aebi U, Gerace L (1995) Cloning of a cDNA for lamina-associated polypeptide 2 (LAP2) and identification of regions that specify targeting to the nuclear envelope. *EMBO J* 14, 1626-1636
- Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S (1998) A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol* 143, 391-401
- Gant TM, Wilson KL (1997) Nuclear assembly. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 669-695
- Goldberg M, Harel A, Gruenbaum Y (1999) The nuclear lamina: molecular organization and interaction with chromatin. *Crit Rev Eukaryotic Gene Expr* 9, 285-293
- Gorter E, Grendel R (1925) On bimolecular layers of lipid on the chromocytes of the blood. *J Exp Med* 41, 439-443

- Gotzmann J, Foisner R (1999) Lamins and lamin-binding proteins in functional chromatin organization. *Crit Rev Eukaryotic Gene Expr* 9, 257-265
- Gruijters WTM, Kistler J, Bullivant S, Goodenough DA (1987) Immunolocalization of MP70 in lens fiber 16-17-nm intercellular junctions. *J Cell Biol* 104, 565-572
- Hakomori SI (1986) Glycosphingolipide. *Spektrum der Wissenschaft* 7, 90-100
- Harris CA, Andryuk PJ, Cline SW, Mathew S, Siekierka JJ, Goldstein G (1995) Structure and mapping of the human thymopoietin (TMPO) gene and relationship of human TMPO beta to rat lamin-associated polypeptide 2. *Genomics* 28, 198-205
- Hinshaw JE, Carragher BO, Milligan RA (1992) Architecture and design of the nuclear complex. *Cell* 69, 1133-1141
- Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M (2000) *Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. Thieme Verlag, Stuttgart
- Holmer L, Worman HJ (2001) Inner nuclear membrane proteins: functions and targeting. *Cell Mol Life Sci* 58, 1741-1747
- Hozak P, Sasseville AM, Raymond Y, Cook PR (1995) Lamin proteins form an internal nucleoskeleton as well as a peripheral lamina in human cells. *J Cell Sci* 108, 635-644
- Hülser DF, Rehkopf B, Traub (1997) Dispersed and aggregated gap junction channels identified by immunogold labelling of freeze-fractured membranes. *Exp Cell Res* 233, 240-251
- Ipsen JH, Karlstrom G, Mouritsen OG, Wennerstrom H, Zuckermann MJ (1987) Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochim Biophys Acta* 905, 162-172
- Kurzchalia TV, Dupree P, Parton RG, Kellner R, Virta H, Lehnert M, Simons K (1992) VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi network-derived transport vesicles. *J Cell Biol* 118, 1003-1014
- Li W-P, Liu P, Pilcher BK, Anderson RGW (2001) Cell-specific targeting of caveolin-1 to caveolae, secretory vesicles, cytoplasm or mitochondria. *J Cell Sci* 114, 1397-1408
- Manilal S, Nguyen TM, Sewry CA, Morris GE (1996) The Emery-Dreifuss muscular dystrophy protein, emerin, is a nuclear membrane protein. *Hum Mol Genet* 5, 801-808

- Manilal S, Recan D, Sewry CA, Hoeltzenbein M, Liense S, Leturcq F (1998) Mutation in Emery-Dreifuss muscular dystrophy and their effects on emerin protein expression. *Hum Mol Genet* 7, 855-864
- McKeon F (1991) Nuclear lamin proteins: domains required for nuclear targeting, assembly, and cell cycle regulated dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 3, 82-86
- Moir RD, Montag LM, Goldman RD (1994) Dynamic properties of nuclear lamins. Lamin B is associated with sites of DNA replication. *J Cell Biol* 125, 1201-1212
- Moir RD, Spann TP, Goldman RD (1995) The dynamic properties and possible functions of nuclear lamins. *Int Rev Cytol* 162B, 141-182
- Monier S, Parton RG, Vogel F, Henske A, Kurzchalia TV (1995) VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell* 6, 911-927
- Moor H, Mühlethaler K, Waldner H, Frey-Wyssling A (1961) A new freezing-ultramicrotome. *J Biophys Biochem Cytol* 10, 1-13
- Moor H, Mühlethaler K (1963) Fine structure in frozen etched yeast cells. *J Cell Biol* 17, 609-628
- Morita K, Sasaki H, Fujimoto K, Furuse M, Tsukita S (1999) Claudin-11/OSP-based tight junctions of myelin sheaths in brain and Sertoli cells in testis. *J Cell Biol* 145, 579-588
- Murk JL, Posthuma G, Koster AJ, Geuze HJ, Verkleij AJ, Kleijmeer MJ, Humbel BM (2003) Influence of aldehyde fixation on the morphology of endosomes and lysosomes: quantitative analysis and electron tomography. *J Microsc* 212, 81-90
- Nagano A, Koga R, Ogawa M, Kurano Y, Kawada J, Okada R (1996) Emerin deficiency at the nuclear membrane in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* 12, 254-259
- Needham D, McIntosh TJ, Evans E (1988) Thermomechanical and transition properties of dimyristoyl-phosphatidylcholine/cholesterol bilayers. *Biochemistry* 27, 4668-4673
- Nomura R, Fujimoto K (1996) Tyrosine-phosphorylated caveolin-1: immunolocalization and molecular characterization. *Mol Cell Biol* 10, 975-986
- Parton RG (1996) Caveolae and caveolin. *Curr Opin Cell Biol* 8, 542-548

- Petersson C, Larsson B, Mahdavi J, Boren T, Magnusson K-E (2000) A new method to visualize the *Helicobacter pylori*-associated Lewis-binding adhesion utilizing SDS-digested freeze-fracture replica labelling. *J Histochem Cytochem* 48, 877-883
- Pinto da Silva P, Kan FW (1984) Label-fracture: a method for high resolution labelling of cell surfaces. *J Cell Biol* 99: 1156-1161
- Plattner H, Hentschel J (2002) *Zellbiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Prior, LA, Harding A, Yan J, Sluimer J, Parton RG, Hancock JF (2001) GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity. *Nat Cell Biol* 3, 368-375
- Robenek MJ, Schlattmann K, Zimmer K-P, Plenz G, Troyer D, Robenek H (2003) Cholesterol transporter caveolin-1 transits the lipid bilayer during intracellular cycling. *FASEB J* 13, 1940-1942
- Robenek MJ, Severs NJ, Schlattmann K, Plenz G, Zimmer K-P, Troyer D, Robenek H (2004) Lipids partition caveolin-1 from ER membranes into lipid droplets: updating the model of lipid droplet biogenesis. *FASEB J* 18, 866-868
- Robenek H, Severs NJ (2007) Recent Advances in freeze-fracture electron microscopy: the replica immunolabeling technique. *Biological Procedures Online*, im Druck
- Robenek H, Robenek MJ, Troyer D (2005a) PAT family proteins pervade lipid droplet cores. *J Lipid Res* 46, 1331-1338
- Robenek H, Lorkowski S, Schnoor M, Troyer D (2005b) Spatial integration of TIP47 in macrophage lipid bodies. *J Biol Chem* 280, 5789-5794
- Robenek H, Robenek MJ, Buers I, Lorkowski S, Hofnagel O, Troyer D, Severs NJ (2005c) Lipid droplets gain PAT family proteins by interaction with specialized plasma membrane domains. *J Biol Chem* 280, 26330-26338
- Robenek H, Hofnagel O, Buers I, Lorkowski S, Schnoor M, Robenek MJ, Heid H, Troyer D, Severs NJ (2006a) Butyrophilin controls milk fat globule secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 10385-10390
- Robenek H, Hofnagel O, Buers I, Robenek MJ, Troyer D, Severs NJ (2006b) Adipophilin-enriched domains in the endoplasmic reticulum membrane: sites of lipid droplet biogenesis. *J Cell Sci* 119, 4215-1224
- Robenek H (1995) *Mikroskopie in Forschung und Praxis*. GIT Verlag, Darmstadt



- Robertson JD (1967) Origin of the unit membrane concept. *Protoplasma* 63, 218-245
- Ross R (1971) The smooth muscle cell. II. Growth of smooth muscle cell in culture and formation of elastic fibers. *J Cell Biol* 50, 172-186
- Sargiacomo M, Sudol M, Tang ZL, Lisanti MP (1993) Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J Cell Biol* 122, 789-807
- Scherer PE, Okamoto T, Chun MY, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP (1996) Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 131-135
- Schlörmann W, John M, Steiniger F, Westermann M, Richter W (2007) Improved antigen retrieval in freeze-fracture cytochemistry by evaporation of carbon as first replication layer. *Histochem Cell Biol* 127, 633-639
- Severs NJ (1989) Freeze-fracture cytochemistry: review of methods. *J Electron Microsc* 13, 175-203
- Severs NJ, Robenek H (1983) Detection of microdomains in biomembranes: an appraisal of recent developments in freeze-fracture cytochemistry. *Biochim Biophys Acta (Reviews on Biomembranes)* 737, 373-408
- Severs NJ, Shotton DM (1995) Rapid freezing, freeze fracture, and deep etching. Wiley Liss Inc, New York
- Severs NJ, Robenek H (2007) Freeze-fracture cytochemistry in cell biology. *Techniques in Cell Biology*, im Druck
- Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572
- Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 31-39
- Singer SJ, Nicholson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731
- Smith S, Blobel G (1993) The first membrane spanning region of the lamin B receptor is sufficient for sorting to the inner nuclear membrane. *J Cell Biol* 120, 631-637
- Stoffler D, Fahrenkrog B, Aebi U (1999) The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 11, 391-401

- Stuurman N, Heins S, Aebi U (1998) Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J Struct Biol* 122, 42-66
- Takayama I, Terada N, Baba T, Ueda H, Kato Y, Juji Y, Ohno S (1999) In vivo cryotechnique in combination with replica immuno electron microscopy for caveolin in smooth muscle cells. *Histochem Cell Biol* 112, 443-445
- Takizawa T, Takuma S, Robinson JM (1998) Freeze-fracture cytochemistry: a new method combining immunocytochemistry and enzyme cytochemistry on replicas. *J Histochem Cytochem* 46, 11-17
- Takizawa T (1999) High-resolution immunocytochemical labelling of replicas with ultrasmall gold. *J Histochem Cytochem* 47, 569-573
- Takizawa T, Robinson JM (2000) Freeze-fracture cytochemistry: a new fracture labelling method for topological analysis of biomembrane molecules. *Histol Histopathol* 15, 515-522
- Tanford C (1978) The hydrophobic effect and the organization of living matter. *Science* 200, 1012-1018
- Tang ZL, Scherer PE, Okamoto T, Song K, Chu C, Kohtz S, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti M (1996) molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem* 271, 2255-2261
- Tokuyasu KT (1980) Immunohistochemistry on ultrathin sections. *Histochem J* 12, 381-403
- Vlcek S, Just H, Dechat T, Foisner R (1999) Functional diversity of LAP2 $\alpha$  in postmitotic chromosom association is caused by an  $\alpha$ -specific nuclear targeting domain. *EMBO J* 18, 6370-6384
- Wu C, Butz S, Ying YS, Anderson RGW (1997) Tyrosine kinase receptors concentrated in caveolae-like domains from neuronal plasma membrane. *J Biol Chem* 272, 3554-3559
- Yates JR, Wehnert M (1999) The Emery-Dreifuss muscular dystrophy mutation database. *Neuromuscul Disord* 9, 199

## **7. DANKSAGUNG**

Bei Herrn Prof. Dr. Horst Robenek möchte ich mich für die interessante Themenstellung, die freundschaftliche Zusammenarbeit und die jederzeit hilfsbereite Betreuung bedanken.

Frau Karin Schlattmann danke ich für ihre Hilfe beim Anfertigen der Gefrierbruch-Replikas und der Immunzytochemie.

Bei Frau Marianne Opalka und Frau Christina Köppler bedanke ich mich für die Anfertigung der Fotos.

## 8. LEBENSLAUF

## 9. ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Doktorarbeit mit dem Titel:

LOKALISATION VON PROTEINEN IN KERNMEMBRANEN MIT DER SDS-  
GEFRIERBRUCH-IMMUNZYTOCHEMIE

im Leibniz-Institut für Arterioskleroseforschung an der Universität Münster

unter Anleitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. H. Robenek

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Münster, den 01.02.2008

Claudia Becker