

# **Die Rolle von eIF-5A und Kernaktin bei Kernexportprozessen**

**Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Wilma Hofmann**

**aus  
Meiningen**

**Würzburg, 2002**

Eingereicht am: .....

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: .....

1. Gutachter: Prof. Dr. M.-C. Dabauvalle

2. Gutachter: Prof. Dr. C.R. Müller-Reible

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

Bedanken möchte ich mich .....

..... ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Marie-Christine Dabauvalle für das interessante Thema, die gute Betreuung, das nette Arbeitsklima und das viele gute Essen.

..... bei Prof. Dr. Ulrich Scheer für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die vielen hilfreichen Kommentare.

..... ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. Joachim Hauber für die gute Kooperation, und die vielen Tips und aufbauenden Worte.

..... bei Prof. Dr. H.W. Zehntgraf für die Überlassung der Immunisierungsmethode.

..... bei Corinna Zütkler für die hervorragende technische Unterstützung.

..... bei Elina Müller für die vielen tollen Bilder.

..... bei Dr. Manfred Alsheimer und Dr. Robert Hock für viele, viele konstruktive Gespräche.

..... bei Silke Hofbauer und Dr. Manfred Alsheimer für ihre Bemühungen, mir den Computer näher zu bringen.

..... bei Dr. Andrea Ewald, Beate Reichart, Tim Krüger, Frau Rosi Rudt und allen Mitarbeitern des Institutes für die Unterstützung und gute Zusammenarbeit während der ganzen Zeit.

..... bei Simone Janzen für die Geduld.

..... **bei meiner Mama!**

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
<b>1.1</b>	<b>Der Kernporenkomplex</b> .....	1
1.1.1	Aufbau des Kernporenkomplexes.....	1
1.1.2	Die Kernporenproteine.....	3
1.1.3	Nucleocytoplasmatischer Transport über den Kernporenkomplex.....	6
<b>1.2</b>	<b>Kernimport</b> .....	10
<b>1.3</b>	<b>Kernexport</b> .....	12
1.3.1	Retroviraler Kernexport.....	13
1.3.1.1	Rev-vermittelter RNA Export von HIV-1.....	14
1.3.2	mRNA Export.....	17
1.3.3	rRNA Export.....	19
1.3.4	U snRNA Export.....	21
1.3.5	tRNA Export.....	21
<b>1.4</b>	<b>NS Signale</b> .....	22
<b>1.5</b>	<b>Der eukaryotische Initiationsfaktor 5A</b> .....	23
<b>1.6</b>	<b>Kernaktin</b> .....	25
<b>1.7</b>	<b>Ziele der Arbeit</b> .....	27
<b>2.</b>	<b>Material</b> .....	28
<b>2.1</b>	<b>Biologisches Material</b> .....	28
2.1.1	Tiere.....	28
2.1.2	Zelllinien.....	28
2.1.3	Primäre Antikörper.....	29
2.1.4	Sekundäre Antikörper.....	30
2.1.5	Bakterienstämme.....	30
<b>2.2</b>	<b>Molekularbiologisches Material</b> .....	31
2.2.1	Vektoren.....	31
2.2.2	Enzyme.....	32
2.2.3	Oligonukleotide.....	32
2.2.4	Kits.....	34
2.2.5	Proteine und RNAs.....	34
<b>2.3</b>	<b>Chemikalien</b> .....	36



<b>2.4</b>	<b>Material für die Zellkultur</b> .....	36
<b>2.5</b>	<b>Geräte</b> .....	36
<b>2.6</b>	<b>Fotomaterial</b> .....	38
<b>3.</b>	<b>Methoden</b> .....	39
<b>3.1</b>	<b>Mikroinjektion in <i>Xenopus laevis</i> Oocyten</b> .....	39
3.1.1	Präparation der Oocyten.....	39
3.1.2	Mikroinjektion in den Kern von <i>Xenopus</i> Oocyten.....	40
3.1.3	Mikroinjektion in das Cytoplasma von <i>Xenopus</i> Oocyten.....	42
3.1.4	Inkubation der Oocyten mit Leptomycin B bzw. Actinomycin D vor der Mikroinjektion.....	43
3.1.5	Manuelle Trennung von Kern und Cytoplasma.....	43
<b>3.2</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b> .....	44
3.2.1	<u>Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</u>	44
3.2.1.1	Herstellung der Gele.....	45
3.2.1.2	Vorbereitung und Auftragen der Proben.....	46
3.2.1.3	Elektrophorese.....	47
3.2.1.4	Coomassie-Färbung.....	47
3.2.2	<u>2-Dimensionale Gelelektrophorese (NEPHGE)</u> .....	47
3.2.2.1	Vorbereitung der Proben.....	49
3.2.2.2	Zweite Dimension: SDS-Polyacrylamid-Flachgele.....	50
3.2.3	<u>2-Dimensionale Gelelektrophorese (IEF)</u> .....	51
3.2.3.1	Vorelektrophorese.....	52
3.2.3.2	Vorbereitung der Proben.....	53
3.2.3.3	Zweite Dimension: SDS-Polyacrylamid-Flachgele.....	53
3.2.4	<u>Silberfärbung von Proteingelen</u> .....	53
3.2.5	<u>Herstellung Massenisolierter Kerne aus <i>Xenopus laevis</i> Oocyten</u> .....	55
3.2.6	<u>Manuelle Isolierung von Kernhüllen</u> .....	57
3.2.7	<u>Pull down</u> .....	58
3.2.8	<u>Overlay Blot Assay</u> .....	61
3.2.9	<u>Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen</u> .....	62
3.2.10	<u>Bestimmung der Proteinkonzentration</u> .....	63
<b>3.3</b>	<b>Immunologische Methoden</b> .....	63

3.3.1	<u>Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie auf Gefrierschnitten von <i>Xenopus laevis</i> Oocyten</u> .....	64
3.3.1.1	Präparation des Ovars.....	64
3.3.1.2	Anfertigung von Gefrierschnitten.....	65
3.3.1.3	Fixierung der Schnitte und Inkubation mit Antikörpern.....	65
3.3.1.4	Mikroskopie.....	66
3.3.2	<u>Immungoldlokalisation auf manuell isolierten <i>Xenopus laevis</i> Kernen</u> .....	66
3.3.2.1	Fixierung der Proben.....	67
3.3.2.2	Entwässerung und Einbettung der Proben in Epon.....	67
3.3.2.3	Anfertigung und Auswertung der Ultradünnschnitte.....	68
3.3.3	<u>Immunpräzipitation mit aktivierter CNBr-Sepharose</u> .....	68
3.3.4	<u>Immunblot</u> .....	71
3.3.4.1	Transfer der Proteine vom Gel auf die Nitrocellulose.....	72
3.3.4.2	Anfärbung der transferierten Proteine.....	73
3.3.4.3	Immunreaktion.....	73
3.3.4.4	Entfernung gebundener Antikörper.....	75
<b>3.4</b>	<b>Herstellung Monoklonaler Antikörper</b> .....	75
3.4.1	Immunisierung der Maus.....	76
3.4.2	Fusion.....	76
3.4.3	Bestimmung der Antikörper-Subklasse.....	77
<b>3.5</b>	<b>Mikrobiologische Methoden</b> .....	78
3.5.1	Flüssigkultur von Bakterien.....	78
3.5.2	Glycerinkulturen.....	79
3.5.3	Bakterienkultur auf Agarplatten.....	79
3.5.4	Herstellung kompetenter Bakterien.....	79
3.5.5	Transformation von Vektor-DNA in Bakterien.....	80
3.5.6	Expression von GST-Fusionsproteinen in Bakterien.....	81
<b>3.6</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b> .....	81
3.6.1	<u>RNA Isolierung mit peqGOLD Trifast aus <i>Xenopus laevis</i> Oocyten</u> .....	81
3.6.2	<u>RNA-Gelelektrophorese</u> .....	82
3.6.2.1	Auftrennung von RNA über ein RNA-Agarosegel.....	82
3.6.2.2	Auftrennung von RNA über ein RNA-Acrylamidgel.....	84
3.6.3	<u>Detektion von <sup>32</sup>P-RNA durch Autoradiographie</u> .....	85
3.6.4	<u>Northern Blot</u> .....	85

3.6.5	<u>Detektion Digoxigenin-markierter RNA</u> .....	87
3.6.5.1	Detektion über alkalische Phosphatase und NBT/BCIP.....	87
3.6.5.2	Detektion über Peroxidase mit ECL.....	88
3.6.5.3	Strippen eines Northern Blots.....	88
3.6.6	<u>DNA-Gelelektrophorese</u> .....	88
3.6.6.1	<u>Gelextraktion von DNA-Fragmenten (Qiagen)</u> .....	89
3.6.7	<u>Gewinnung von Vektor-DNA durch Qiagen Plasmid Mini-Präp</u> .....	90
3.6.8	<u>DNA-Sequenzierung</u> .....	90
3.6.9	<u>Herstellung Digoxigenin-markierter Oocyten-Typ 5S rRNA aus</u> <u><i>Xenopus laevis</i> Gesamt-RNA</u> .....	92
3.6.9.1	RT-PCR.....	92
3.6.9.2	PCR.....	93
3.6.9.3	Klonierung von PCR-Fragmenten in den pCR <sup>®</sup> 2.1-Vektor.....	94
3.6.9.4	Restriktionsverdau.....	96
3.6.9.5	<i>in vitro</i> Transkription und Digoxigenin-Markierung der RNA.....	97
3.6.10	<u>Herstellung des GST-TFIIIA-NES</u> .....	98
3.6.10.1	Hybridisierung der Primer.....	98
3.6.10.2	Phosphorylierung der Schnittenden.....	99
3.6.10.3	Ligation und Transformation.....	99
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	102
<b>4.1</b>	<b>eIF-5A ist ein essentieller Cofaktor im Rev-vermittelten</b> <b>RNA Export</b> .....	102
4.1.1	Rev-NES interagiert mit <i>Xenopus</i> Oocyten eIF-5A.....	103
4.1.2	Antikörper gegen eIF-5A hemmen den Export des Rev-NES in <i>Xenopus</i> Oocyten.....	103
4.1.3	Antikörper gegen eIF-5A hemmen den Rev-vermittelten RNA Export in <i>Xenopus</i> Oocyten.....	105
4.1.4	eIF-5A ist nicht am CTE-vermittelten RNA Export beteiligt.....	107
4.1.5	eIF-5A ist nicht am Export des PKI-NES beteiligt.....	109
4.1.6	Die eIF-5A Mutante M14 inhibiert den Kernexport des Rev-NES und den Rev-vermittelten RNA Export in <i>Xenopus</i> Oocyten.....	110

4.1.7	Die eIF-5A Mutante M14 hat keinen Einfluß auf den CTE-vermittelten RNA Export.....	112
4.1.8	Die eIF-5A Mutante M14 wird nicht aus dem Kern exportiert.....	114
4.1.9	Die eIF-5A Mutante M14 bindet nicht an CRM1/exportin1.....	115
4.1.10	eIF-5A ist ein Adapter, der die Bindung des Exportrezeptors CRM1/exportin1 an Rev-NES vermittelt.....	116
<b>4.2</b>	<b>Identifikation von eIF-5A Bindungspartnern, die mit der Kernhülle assoziiert sind.....</b>	<b>119</b>
<b>4.3</b>	<b>Lokalisation der Tissue Transglutaminase in <i>Xenopus</i> Oocyten.....</b>	<b>124</b>
<b>4.4</b>	<b>eIF-5A ist am TFIIIA-vermittelten Export der Oocyten-Typ 5S rRNA in <i>Xenopus</i> Oocyten beteiligt.....</b>	<b>128</b>
4.4.1	TFIIIA und die Oocyten-Typ 5S rRNA werden über den Exportrezeptor CRM1/exportin1 exportiert.....	129
4.4.2	Antikörper gegen eIF-5A inhibieren den Export des TFIIIA-NES und den TFIIIA-vermittelten Export der Oocyten-Typ 5S rRNA.....	133
4.4.3	eIF-5A ist ein Adapter der die Bindung des TFIIIA-NES an CRM1/exportin1 vermittelt.....	135
4.4.4	Herstellung monoklonaler Antikörper gegen <i>Xenopus</i> TFIIIA.....	139
<b>4.5</b>	<b>eIF-5A ist am Kernexport der CD83 mRNA beteiligt.....</b>	<b>141</b>
4.5.1	HuR aktiviert den Export der CD83 HRE RNA in <i>Xenopus</i> Oocyten.....	142
4.5.2	HuR wird in <i>Xenopus</i> Oocyten nur mit CD83 HRE RNA exportiert.....	144
4.5.3	HuR-vermittelter Export der CD83 HRE RNA erfolgt über den Exportrezeptor CRM1/exportin1 und nicht über TAP.....	147
4.5.4	Der HuR Ligand APRIL ist in den Export der CD83 HRE RNA involviert.....	151
4.5.5	eIF-5A ist ein weiterer Cofaktor im HuR-vermittelten Export der CD83 HRE RNA.....	154
<b>4.6</b>	<b>Die Hypusinmodifikation des eIF-5A ist essentiell für den Import, nicht jedoch für den Export.....</b>	<b>161</b>
<b>4.7</b>	<b>Export anderer Proteine mit Leucin-reichen NES in <i>Xenopus</i> Oocyten.....</b>	<b>164</b>
4.7.1	Der Protein Kinase Inhibitor (PKI) .....	164

4.7.2	Aufstellung einer vergleichenden Exportkinetik für verschiedene Leucin-reiche Kernexportsignale in <i>Xenopus</i> Oocyten.....	168
<b>4.8</b>	<b>Kernaktin</b> .....	172
4.8.1	Aktin ist auch an RNA Exportwegen beteiligt.....	173
4.8.2	Eine monomere oder oligomere Form von Aktin ist an Kernexportprozessen beteiligt.....	175
4.8.3	Identifikation Aktin-bindender Kernproteine.....	177
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b> .....	181
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung / Summary</b> .....	193
<b>7.</b>	<b>Abkürzungen</b> .....	197
<b>8.</b>	<b>Literatur</b> .....	202
<b>9.</b>	<b>Publikationen</b> .....	221
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	223

## 1. Einleitung

In der eukaryotischen Zelle ist die DNA Replikation und RNA Biogenese, die im Zellkern stattfindet, von der Proteinsynthese im Cytoplasma durch die Kernhülle getrennt. Diese räumliche Trennung ermöglicht zusätzliche Kontrollen der Genexpression, erfordert jedoch auch einen bidirektionalen, Energie-abhängigen Transport von Proteinen und RNPs (Ribonucleoprotein Partikel) über die doppelte Membran der Kernhülle. Der Transport läuft in beiden Richtungen über hochspezialisierte Strukturen, die in die Kernhülle eingelagert sind und als Kernporenkomplexe bezeichnet werden. Die Spezifität der Import- und Exportvorgänge wird im Allgemeinen durch Signalsequenzen erreicht, die sich auf den zu transportierenden Molekülen befinden und von speziellen Rezeptoren erkannt werden.

### 1.1 Der Kernporenkomplex (NPC: nuclear pore complex)

Die Kernhülle ist aus drei biochemisch unterschiedlichen Domänen aufgebaut. Die äußere Kernmembran befindet sich auf der cytoplasmatischen Seite und geht in das Endoplasmatische Retikulum über, während die innere Membran auf der nucleoplasmatischen Seite liegt. Die innere Kernmembran unterscheidet sich biochemisch von der äußeren. Hier sind, unter anderem, die Lamin-bindenden Proteine Lap1 und Lap2 (lamina associated polypeptide) sowie der Lamin B-Rezeptor lokalisiert. Diese verankern die, auf der nucleoplasmatischen Seite der Kernhülle liegende Kernlamina. Die Kernlamina besteht aus einem Netzwerk von Intermediärfilament-ähnlichen Proteinen, den Laminen und dient wahrscheinlich der Stabilisierung der Kernhülle und als Verankerungsstelle für Chromatin (Gerace & Foisner, 1994; Georgatos, 1994).

Durch eine Fusion der äußeren und inneren Kernmembran entsteht eine dritte Membrandomäne, die Porenmembran, an der die Kernporenkomplexe assoziiert sind. Diese Porenkomplexe verbinden das Nucleoplasma mit dem Cytoplasma.

#### 1.1.1 Aufbau des Kernporenkomplexes

Der Vertebraten NPC ist ein supramolekularer Komplex in der Größenordnung von ca. 125MDa, der in die Doppelmembran der Kernhülle eingebettet ist. Obwohl der Hefe-

Kernporenkomplex mit ca. 60MDa in seiner linearen Struktur 15% kleiner ist, scheint die 3-Dimensionale Architektur von Hefe bis zu höheren Eukaryoten hoch konserviert zu sein (Fahrenkrog et al., 1998; Yang et al., 1998).

Kerne von Hefezellen besitzen etwa 100-200 Kernporenkomplexe, Kerne von Säugerzellen ein paar Tausend und Kerne von Amphibienoocyten ca. 50 Millionen, wobei die Anzahl der Kernporenkomplexe abhängig von der transkriptionellen Aktivität der jeweiligen Zelle ist (Maul, 1977).

Elektronenmikroskopische Analysen haben mittlerweile zu einem Konsensmodell bezüglich des Aufbaus des NPC's geführt (Abb.1.1) (reviewed in: Pante & Aebi, 1996; Stoffler et al., 1999).

Der NPC weist eine oktagonale Radiärsymmetrie auf und besteht aus zwei koaxialen Annuli, die über eine Struktur aus vertikalen und horizontalen Speichenelementen miteinander verbunden sind. Die Annuli werden aus je acht globulären Untereinheiten gebildet, von denen filamentartige Strukturen ins Nucleoplasma und Cytoplasma reichen.

Der cytoplasmatische Ring ist mit 8 ca. 50nm langen Filamenten dekoriert. Am nukleären Ring hingegen befindet sich eine korbähnliche Struktur, der sog. nucleäre Basket, der sich aus 8 ca. 50-100nm langen Fibrillen zusammensetzt. Diese treffen sich am distalen Ende und bilden einen Ring mit einem Durchmesser von 30-50nm. Von dort ausgehend reichen die nucleären Filamente jedoch noch weit in das Nucleoplasma, bis hin zum Nucleolus.

Im Zentrum des Porenkomplexes befindet sich ein zentraler Kanal, durch den der Transport stattfindet.

Häufig erscheint der zentrale Kanal durch ein "Partikel", auch bezeichnet als "Central Plug", von variabler Größe und Morphologie verschlossen. Das Vorhandensein des Central Plug wird zur Zeit jedoch noch kontrovers diskutiert (Fahrenkrog et al., 2001).

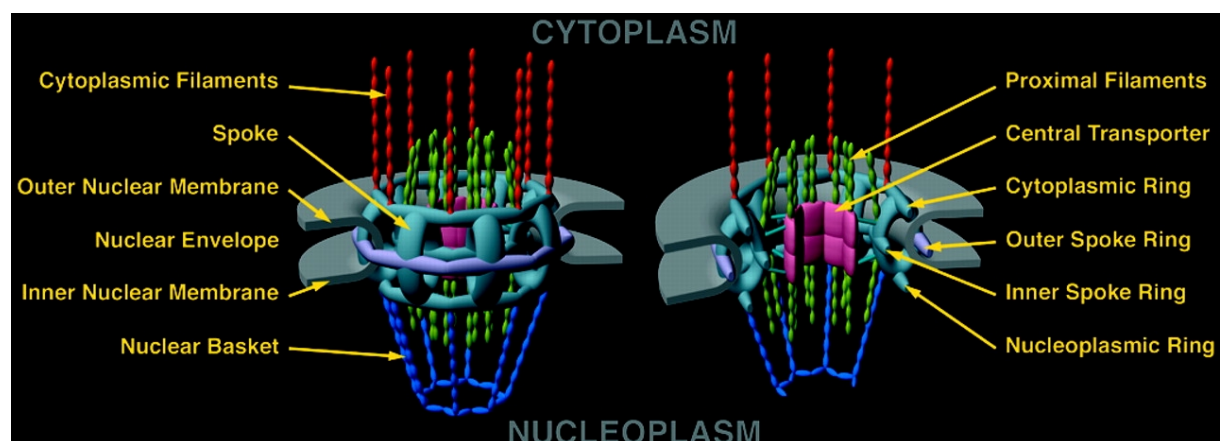


Abb.1.1: Struktur des NPC (Rout & Aitchison, 2001)

### 1.1.2 Die Kernporenproteine

Basierend auf der Größe sowie seiner Struktur geht man davon aus, daß der Vertebraten NPC aus ca. 50-70 verschiedenen und der Hefe NPC aus ca. 30 verschiedenen Proteinen, den sogenannten Nukleoporinen besteht, von denen bis heute etwa 20 Vertebraten- und 30 Hefe-Nukleoporine identifiziert und charakterisiert wurden (Abb.1.2) (Stoffler et al., 1999; Rout et al., 2000).

Integrale Membranproteine dagegen, die um den NPC herum gelagert sind, werden als Poms bezeichnet (pore membrane proteins).

Obwohl relativ wenig über die Funktion der einzelnen Poms bekannt ist, könnten sie eine Rolle beim Zusammenbau des Kernporenkomplexes, indem sie die Bildung der Porenmembrandomäne initiieren, sie stabilisieren und als Membranankerstelle für den wachsenden Kernporenkomplex dienen (Wozniak et al., 1989; Greber et al., 1990; Hallberg et al., 1993; Gajewski et al., 1996; Daigle et al., 2001).

Nukleoporine werden aufgrund von Sequenzmotiven in ihrer primären Aminosäuresequenz in mehrere Gruppen unterteilt.

Die Mehrzahl enthalten charakteristische Phenylalanin-Glycin (FG) Repeats. FG Repeats basieren auf hochkonservierten, hydrophoben Regionen, die ein oder zwei Phenylalanine enthalten und durch hydrophile Spacer variabler Sequenz verbunden werden, die reich an geladenen und polaren Resten sind (Doye & Hurt, 1997; Rout et al., 2000; Rout & Went, 1994)

Es wurden zwei Klassen von FG Repeats identifiziert. Zum einen GLFG und zum anderen FXFG, wobei X gewöhnlich ein kleiner Rest wie Serin, Glycin oder Alanin ist.

Es konnte gezeigt werden, daß *in vitro* einige lösliche Transportfaktoren mit diesen FG Repeats interagieren können (Iovine et al., 1995; Nehrass et al., 1996; Rexach and Blobel, 1995) (siehe auch Tab.1.2), was darauf hindeutet, daß diese Repeats direkt am Kerntransport beteiligt sind (siehe auch Kap.1.1.3).

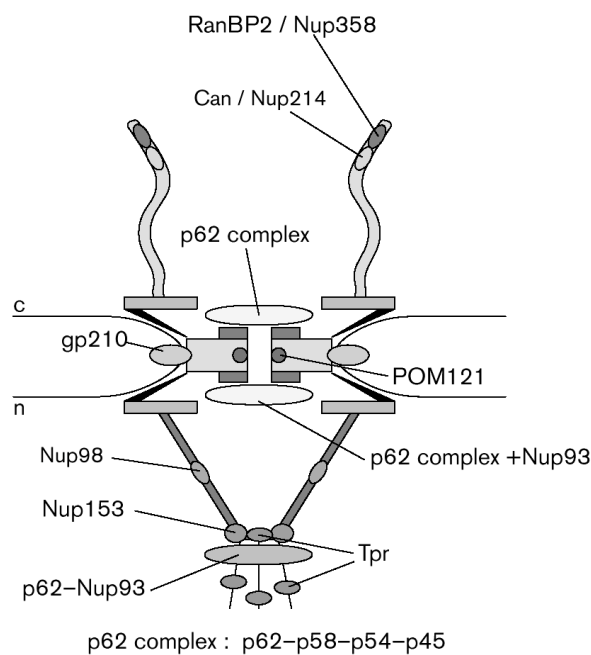
Viele dieser FG Repeats sind durch die Addition eines einzigen O-gebundenen N-Acetylglucosamin-Restes an Serin und Threonin modifiziert (Davis & Blobel, 1987; Park et al., 1987). Diese Modifikation wird spezifisch von dem Lektin WGA (wheat germ agglutinin) erkannt. Es konnte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gezeigt werden, daß durch eine Bindung des WGA an diese Modifikation, der Proteintransport komplett inhibiert werden kann (Finlay et al., 1987; Yoneda et al., 1987; Dabauvalle et al., 1988; Newmeyer & Forbes, 1988). Dies deutet darauf hin, daß speziell diese Modifikation an Transportprozessen über die Pore beteiligt ist.



FG-Nucleoporine sind entlang der ganzen Pore verteilt, ausgehend von den Spitzen der cytoplasmatischen Filamente, durch den zentralen Transporter, bis hin zum distalen Ring des nukleären Baskets (siehe Abb.1.2).

Neben den FG Repeats gibt es noch andere Strukturmodule (siehe auch Tab.1.1). So enthalten einige Nucleoporine Leucin-Zipper mit noch unbekannter Funktion oder coiled-coil Strukturen, die vermutlich eine strukturelle Rolle spielen oder wichtig für die Formation von Komplexen sind (Doye & Hurt, 1997). Bei anderen Modulen, wie den hydrophoben Segmenten, scheint es sich um integrale Membrandomänen zu handeln.

Zwei Vertebraten Nucleoporine Nup153 und Nup358 enthalten außerdem Zink-Finger Module, die sowohl an DNA als auch an die GTPase Ran (Ras related nuclear protein) binden können (Sukegawa & Blobel, 1993; Nakielny et al., 1999).



**Abb.1.2:** Lokalisierung einiger ausgewählter Nucleoporine auf Strukturen des Vertebraten NPC  
(Stoffler et al., 1999)

Name	Sequenz-motive	Lokalisierung	Funktion	Literatur
p45	FG; coiled coil	cytoplasmatische und nukleäre Peripherie des zentralen Kanals	Rolle im Kernimport von Proteinen	Pante & Aebi, 1996 Hu & Gerace, 1998
p54	FG; PA; coiled coil	cytoplasmatische und nukleäre Peripherie des zentralen Kanals	Rolle im Kernimport von Proteinen	Pante & Aebi, 1996 Hu & Gerace, 1998 Hu et al., 1996
p58	FG; PA; coiled coil	cytoplasmatische und nukleäre Peripherie des zentralen Kanals	Rolle im Kernimport von Proteinen	Pante & Aebi, 1996 Hu & Gerace, 1998
p62	FXFG; coiled coil	cytoplasmatische und nukleäre Peripherie des zentralen Kanals; Kernbasket	Rolle im Kernimport von Proteinen; im Komplex mit p45, p54 und p58	Pante & Aebi, 1996 Fischer et al., 1997 Paschal & Gerace, 1995
Nup88	coiled coil	cytoplasmatische Seite des NPC	C-terminale Domäne enthält Bindungsstelle für CAN/Nup214	Fornerod et al., 1997 Bastos et al., 1997
Nup93	coiled coil	Kernperipherie des zentralen Kanals; Kernbasket	Rolle beim NPC-Zusammenbau; im Komplex mit p205	Grandi et al., 1997
Nup98	FXFG; GLFG; FG	Kernbasket; Kern	Rolle beim Export von snRNA, 5S rRNA; rRNA, mRNA; Rolle beim Import und Export von HIV-1 Proteinen	Pante & Aebi, 1996 Zolotukhin & Felber, 1999 Kasper et al., 1999 Powers et al., 1997 Bachi et al., 2000
Nup107	Leucin-Zipper	unbekannt	unbekannt	Pante & Aebi, 1996
Pom121	FXFG; Transmembrandomäne	NPC-Core	Verankerung des NPC an der Kernhülle	Pante & Aebi, 1996 Söderqvist et al., 1997
Nup153	FXFG; 4 Zinkfinger; M9-ähnliches NLS; Ran-bindungs Domäne	Kernbasket; mobil innerhalb des NPC	Terminationsstelle für Proteinimport; Rolle beim Export von snRNA, 5S rRNA; rRNA, mRNA; Rolle beim Export von Proteinen mit NES	Nakielny et al., 1999 Ullman et al., 1999 Pante & Aebi, 1996 Enarson et al., 1998 Shah et al., 1998 Wu et al., 1995
Nup155	unbekannt	cytoplasmatische und nukleäre Oberfläche des NPC	unbekannt	Pante & Aebi, 1996 Gigliotti et al., 1998
gp210	Transmembrandomäne	Lumen der Kernhülle	Verankerung des NPC an der Kernhülle	Pante & Aebi, 1996
CAN/Nup 214	FXFG; FG; Leucin-Zipper	cytoplasmatische Fibrillen	Komplex mit CRM1 und Nup88; Rolle beim Kernimport von Proteinen; Rolle beim mRNA Export	Pante & Aebi, 1996 Fornerod et al., 1997 Zolotukhin & Felber, 1999 Bastos et al., 1997 Boer et al., 1997
Tpr	coiled coil	Kernbasket und intranukleäre Filamente	C-Terminus essentiell für Kernimport; N-Terminus verantwortlich für NPC-Assoziation; vermutliche Rolle beim mRNA Export oder Recycling	Pante & Aebi, 1996 Cordes et al., 1997 Cordes et al., 1998 Bangs et al., 1998
RanBP2/ Nup358	Ran-Bindungs Domäne; FG; FXFG; 8 Zink-Finger	cytoplasmatische Fibrillen	nucleocytoplasmatischer Transport	Wilken et al., 1995 Wu et al., 1995 Delphin et al., 1997 Mahajan et al., 1997 Saitoh et al., 1996

Tab.1.1: Vertebraten Nucleoporine

Immunogold-Elektronenmikroskopie Analyse hat gezeigt, daß viele Nucleoporine multiple Lokalisierungen innerhalb des NPC aufweisen (Guan et al., 1995; Grandi et al., 1997; Fahrenkrog et al., 1998; 2000a; Strahm et al., 1999).

Shuttling von Nucleoporinen konnte kürzlich für 3 Vertebraten Nucleoporine gezeigt werden, Nup98, Nup153 und CAN/Nup214 (Boer et al., 1997; Nakielny et al., 1999; Zolothukin & Felber, 1999). Nup98, das sich am nukleären Basket und damit innerhalb des Kerns befindet, verlagert sich in HeLa-Zellen, nach Zugabe des Transkriptioninhibitors Actinomycin D, ins Cytoplasma (Zolothukin & Felber, 1999).

Nup153 ist am distalen Ring des nukleären Baskets lokalisiert und am mRNA Export sowie am Import von Proteinen beteiligt. Offensichtlich shuttelt Nup153, nach Assoziation mit dem Exportsubstrat-Komplex, von der Kernperipherie auf die cytoplasmatische Seite (Nakielny et al., 1999). CAN/Nup214 dagegen befindet sich an den cytoplasmatischen Fibrillen und ändert seine Lokalisation, nach Überexpression in HeLa-Zellen, hin zum nukleären Basket (Boer et al., 1997).

Dies deutet darauf hin, daß der NPC eher eine dynamische als eine statische Struktur besitzt.

### 1.1.3 Nucleocytoplasmatischer Transport über den Kernporenkomplex

Moleküle, die sich vom cytoplasmatischen Kompartiment der Zelle in das nukleäre und umgekehrt bewegen, können in zwei Klassen unterteilt werden. Zum einen erlaubt der Kernporenkomplex passive Diffusion von Ionen und kleinen Molekülen, wobei die Diffusionsrate von Molekülen komplett von ihrer Größe abzuhängen scheint (Paine et al., 1975). Die Diffusion findet umgekehrt proportional zur Größe statt, mit einem Größenlimit von 20-40kDa. Dies ist jedoch eine theoretische Größe, da die große Mehrheit von Proteinen in der Zelle, die unter diesem Größenlimit liegt, nicht durch Diffusion sondern durch aktiven Transport von einem Kompartiment in das andere gelangt. Ein gutes Beispiel hierfür bieten die HMG (high mobility group) Proteine. Bei diesen handelt es sich um eine Familie von Proteinen mit einem Molekulargewicht von  $\pm 10$ kDa, die jedoch alle ausschließlich Signal-abhängig in den Kern importiert werden (Hock et al., 1998).

Interessanterweise steigert in Hefe das Entfernen der "Core"-Region Komponenten Nup170p und Nup188p die nichtselektive Permeabilität des Kernporenkomplexes (Shulga et al., 2000). Dies ist ein erster Hinweis darauf, daß auch passive Diffusion durch den NPC kontrolliert werden könnte.

Die zweite Art von nucleocytoplasmatischem Transport durch den Kernporenkomplex ist ein Signal-abhängiger Transport von Proteinen und RNPs.

Dieser Signal-abhängige, nucleocytoplasmatische Transport erfolgt mittels eines geordneten Prozesses. Ein zu transportierendes Substrat (Cargo) enthält ein Kernlokalisierungssignal (NLS: nuclear localization signal), ein Kernexportsignal (NES: nuclear export signal) oder eine nucleocytoplasmatische Shuttelsequenz (NS) welches, in der Regel, durch lösliche Transportrezeptoren erkannt wird, die variabel als Karyopherin (Kap), Importin, Exportin oder Transportin bezeichnet werden.

Der Rezeptor/Cargo Komplex heftet sich am Kernporenkomplex an und bewegt sich dann auf die gegenüberliegende Seite des NPC. Auf dieser dissoziiert der Rezeptor/Cargo Komplex dann und entläßt das transportierte Substrat in den Kern bzw. das Cytoplasma, während der Transportrezeptor recycelt wird.

Mit Hilfe von Gold-gekoppeltem Nucleoplasmin (einem nucleären Protein, welches ein klassisches NLS enthält), dessen Transport durch den NPC mittels Elektronenmikroskopie verfolgt wurde (Feldherr et al., 1984 ), konnte gezeigt werden, daß ein NPC eine Vielzahl von verschiedenen Substraten zur gleichen Zeit importiert. Des weiteren konnte gezeigt werden, daß diese verschiedenen Transportsubstrate, während ihres Weges durch den NPC, an vielen Stellen mit diesem assoziiert sind. Dies deutet darauf hin, daß es multiple Bindungsstellen entlang der gesamten Länge des NPC gibt.

Durch Injektion von Gold-gekoppeltem Nucleoplasmin in das Cytoplasma und Gold-gekoppelter RNA in den Kern wurde gezeigt, daß derselbe NPC zur selben Zeit beide Substrate transportiert (Dworetzky & Feldherr, 1988 ), was bedeutet, daß innerhalb desselben NPC ein bidirektionaler Transport stattfindet.

Am nucleocytoplasmatischen Transport über die Pore scheinen FG Repeats enthaltende Nucleoporine, die sich ja an den cytoplasmatischen und den nucleären Fibrillen sowie entlang der Innenseite des zentralen Transporters befinden, direkt beteiligt zu sein. Alle bisher bekannten und untersuchten Transportfaktoren können an Nucleoporine binden (reviewed in: Ryan & Wentz, 2000) (siehe auch Tab.1.2), wobei verschiedene Transportfaktoren dabei vorzugsweise an spezifische Nucleoporine und/oder Nucleoporin-Klassen binden.

Demnach scheinen alle FG-Nucleoporine die Möglichkeit zu haben *in vitro* mit mindestens einem Transportfaktor zu interagieren (siehe auch Tab.1.2).

Aufgrund dieser Daten ergeben sich verschiedene Möglichkeiten, wie Nucleoporine am Transport über den Kernporenkomplex beteiligt sind. Sie könnten Material, das transportiert werden soll, entlang des Einganges zum Kernporenkomplex konzentrieren (Rout et al., 2000). Material könnte auch durch den Kernporenkomplex transportiert werden, indem sich

Transportfaktoren, aufgrund ihrer Bindungsfähigkeit an FG Repeats, entlang des Transporters durch wiederholte Assoziation und Dissoziation von FG-Nucleoporin zu FG-Nucleoporin bewegen (Bayliss et al., 2000; Bayliss et al., 1999; Stewart, 2000). Alternativ könnten diese Nucleoporine jedoch auch eine Barriere für den freien Transport von Makromolekülen über die Pore bilden (Bayliss et al., 2000; Rout et al., 2000; Ribbeck & Görlich, 2001).

<b>Nup</b>	<b>Transportrezeptor</b>	<b>Transportfaktor</b>	<b>Literatur</b>
p62	Kap $\beta$ 1/Importin $\beta$ Kap $\beta$ 2/Transportin Kap $\beta$ 3 CRM1	NTF2 (nuclear transport factor)	Hu et al., 1996; Moroianu et al., 1995; Yaseen & Blobel, 1997; Kehlenbach et al., 1999; Percipalle et al., 1997
Nup54	Kap $\beta$ 1	NTF2	Hu et al., 1996
Nup58	Kap $\beta$ 1	NTF2	Hu et al., 1996
Nup98	Kap $\beta$ 1/Importin $\beta$ Kap $\beta$ 2/Transportin Kap $\beta$ 3 CRM1 scCRM1/Xpo1/Kap124	Gle2/Rae1; TAP	Moroianu et al., 1995; Bonifaci et al., 1997; Yaseen & Blobel, 1997; Hodge et al., 1999; Zolotukhin & Felber, 1999; Pritchard et al., 1999
Nup153	Kap $\beta$ 1/Importin $\beta$ Kap $\beta$ 2/Transportin Kap $\beta$ 3 Kap $\beta$ CRM1	Ran	Nakielny et al., 1999; Shah & Forbes, 1998; Yaseen & Blobel, 1997; Moroianu et al., 1997; Wu et al., 1995
Nup214/ CAN	Kap $\beta$ 1/Importin $\beta$ Kap $\beta$ 2/Transportin Kap $\beta$ 3 CRM1 scCRM1/Xpo1/Kap124	Dbp5; TAP	Moroianu et al., 1995; Bonifaci et al., 1997; Yaseen & Blobel, 1997; Askjaer et al., 1999; Hodge et al., 1999; Schmitt et al., 1999; Bachi et al., 2000; Katahira et al., 1999
Nup358/ RanBP2	Kap $\beta$ 1/Importin $\beta$ Kap $\beta$ 2/Transportin Kap $\beta$ 3	RanGAP1-SUMO; Ran	Kehlenbach et al., 1999; Moroianu et al., 1995; Bonifaci et al., 1997; Yaseen & Blobel, 1997; Mahajan et al., 1997; Saitoh et al., 1996
Tpr	Kap $\beta$ 1/Importin $\beta$		Shah et al., 1998

**Tab.1.2:** Interaktionen von Nucleoporinen mit Transportrezeptoren und Transportfaktoren

Nucleocytoplasmatischer Transport ist ein Energie-abhängiger Prozeß. Die einzige bekannte Quelle für diese Energie ist die kleine GTPase Ran. Wie andere Ras-ähnliche GTPasen kann Ran jedoch nicht selber Nukleotide hydrolysieren und austauschen. Dazu braucht es die Funktion eines GTPase aktivierenden Proteins (GAP: GTPase activating protein) und eines GDP-GTP Austauschfaktors (GEF: GDP-GTP exchange factor). Das einzige bekannte Säuger RanGEF, bezeichnet als RCC1 (regulator for chromosome condensation), ist ein Chromatin

assoziiertes Kernprotein (Ohtsubo et al., 1989). Das einzige bekannte RanGAP Protein, RanGAP1, ist dagegen ein cytoplasmatisches Protein, das an den cytoplasmatischen Fibrillen liegt, wo es an RanBP2 (Ran binding protein) bindet (Mahajan et al., 1997; Matunis et al., 1996; Wu et al., 1995; Saitoh et al., 1996). Diese Lokalisierung von RanGAP und RCC1 führt dazu, daß cytoplasmatisches Ran hauptsächlich in GDP-gebundener Form und nucleäres Ran vorwiegend in GTP-gebundener Form vorliegt.

Verschiedene Gruppen haben in letzter Zeit die Energie-Erfordernisse des Translokationsschrittes über die Pore untersucht und festgestellt, daß dieser Schritt selbst keine Hydrolyse eines Nukleotid-Triphosphates erfordert um Energie für die Bewegung eines Transportkomplexes über die Pore bereitzustellen (Englmeier et al., 1999; Schwoebel et al., 1998; Nakielny & Dreyfuss, 1998).

Die Funktion von Ran und des RanGTP-RanGDP Gradienten scheint daher in der Sicherstellung der Direktionalität des Transportes zu liegen, indem es das Be- und Entladen von Transportsubstraten an Importine und Exportine reguliert (Izaurrealde et al., 1997).

Im Gegensatz zu Ras, bei dem lediglich die GTP-gebundene Form aktiv ist, sind bei Ran beide Nukleotid-Stadien für den Transport wichtig, wobei RanGDP mit dem Import und RanGTP mit verschiedenen Exportwegen assoziiert ist (Melchior & Gerace, 1998; Görlich et al., 1996). Eine grundlegende Funktion der RanGTP-Bindung an Transportrezeptoren ist die Änderung der Affinität des Rezeptors für das Transportsubstrat. Auf der nucleoplasmatischen Seite des Kernporenkomplexes dissoziiert RanGTP Importrezeptoren von ihren Substraten, indem RanGTP an die Importrezeptoren bindet und ihre Affinität für Importsubstrate verringert, wodurch der Importprozess beendet wird (Görlich & Kutay, 1999).

Der Importrezeptor/RanGTP Komplex wird daraufhin ins Cytoplasma recycelt, wo RanGAP die Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP fördert. Dies wiederum führt zu einer Dissoziation von RanGDP und dem Importrezeptor, der damit recycelt wurde.

Im Gegenzug fördert RanGTP im Nucleoplasma die Bindung von Exportrezeptoren an ihre Exportsubstrate. Die Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP im Cytoplasma führt dann zu einer Dissoziation des Exportkomplexes, wodurch der Exportprozess beendet wird (Allen et al., 2000; Bayliss et al., 2000; Stoffler et al., 1999; Görlich & Kutay, 1999).

## 1.2 Kernimport

Für den selektiven, Energie-abhängigen Import aus dem Cytoplasma in den Kern, besitzt ein zu importierendes Substrat ein Kernlokalisierungssignal (NLS), welches von einem Importrezeptor erkannt wird. Dieser Rezeptor agiert dann als Träger, der dieses Substrat über den Kernporenkomplex in den Kern bringt. Innerhalb des nukleären Kompartimentes dissoziiert der Rezeptor/Substrat Komplex, wodurch das Substrat im Kern freigesetzt wird, während der Importrezeptor wieder ins Cytoplasma zurückkehrt.

Der am Besten untersuchte und verstandene Importweg ist der, der durch klassische NLS vermittelt wird, die auch als basische oder "canonical" NLS bezeichnet werden.

Es gibt zwei Kategorien von klassischen NLS, die monopartiten und die bipartiten NLS. Das monopartite NLS besteht aus einer einfachen Sequenz aus 4-6 basischen Aminosäureresten [(K/R)<sub>4-6</sub>], die manchmal mit Prolin oder Glycin assoziiert sind. Der Prototyp eines monopartiten, klassischen NLS ist das NLS vom SV40 T-Antigen des Simian Virus (Kalderon et al., 1984; Landford & Butel, 1984). Das bipartite NLS dagegen besteht aus einer einfachen Sequenz von 10 Aminosäureresten downstream eines basische Dipeptids [(K/R)<sub>2</sub>X<sub>10-12</sub>(K/R)<sub>3</sub>]. Nucleoplasmin ist hier ein klassischer Vertreter, der diese Art von NLS besitzt (Robbins et al., 1991).

Importfaktoren für diese klassischen NLS-enthaltenden Proteine sind Importin $\alpha$  und Importin $\beta$  (Görlich et al., 1994, 1995; Chi et al., 1995; Enenkel et al., 1995; Imamoto et al., 1995a,b; Moroiianu et al., 1995; Radu et al., 1995; Weis et al., 1995).

Importin $\alpha$  besitzt eine große zentrale Domäne von 8-10 sogenannten *armadillo* Repeats die von relativ kurzen Amino- und Carboxylenden flankiert wird. Eine aminoternale Domäne, die reich an basischen Aminosäureresten ist, dient als Bindungsstelle für Importin $\beta$  und wird demzufolge auch als IBB- (importin $\beta$  binding) Domäne bezeichnet (Görlich et al., 1996; Weis et al., 1996). Der saure Carboxylterminus wird für den Export von Importin $\alpha$  durch das Exportin CAS (cellular apoptosis susceptibility protein) benötigt (Herold et al., 1998).

Importin $\alpha$  ist der cytoplasmatische Rezeptor für klassische NLS, an die es über die *armadillo* Region bindet. Nach Bindung an Importin $\beta$  über die IBB-Domäne ist dieser trimere Komplex nun in der Lage, sich an die cytoplasmatischen Filamente des Kernporenkomplexes anzulagern, wobei diese Bindung durch Importin $\beta$  erfolgt (Görlich et al., 1994, 1995). Nach dem Transport über den NPC bindet RanGTP im Kern an Importin $\beta$ , wodurch der Importkomplex dissoziiert. Importin $\beta$ , eventuell an RanGTP gebunden, wird über einen noch

unbekannten Exportweg sofort wieder in das Cytoplasma reexportiert. Importin $\alpha$  wird dagegen exportiert, indem es an CAS, einen spezifischen Exportfaktor bindet, der wiederum an RanGTP gebunden ist.

Neben den klassischen, basischen Kernlokalisierungssignalen wurden mittlerweile eine Reihe anderer Sequenzmotive identifiziert, die in der Lage sind Kernimport zu vermitteln. Dazu gehören sehr kurze Sequenzen wie in Sam68 (P-P-X-X-R) (Ishidate et al., 1997) und Cdc6 (S/T-P-X-K-R-L/I) (Takei et al., 1999), ein G-R Repeat-Motiv, das die Kerntranslokationen der großen Isoformen von FGF-2 vermitteln soll (Dono et al., 1998) oder Ankyrin Repeats von I $\kappa$ B $\alpha$  (Sachdev et al., 1998). Neben den klassischen, basischen NLS scheint also eine große Vielzahl anderer Sequenzen den Import von Proteinen in den Kern vermitteln zu können.

Neben Proteinen werden auch verschiedene RNAs in Form von RNPs in den Kern importiert, wie z.B. U snRNPs. Hier werden, nach der Transkription, zunächst die snRNAs (U1, U2, U4 und U5), in Assoziation mit Proteinen als RNPs, in das Cytoplasma exportiert (DeRobertis, 1982; Mattaj, 1988). Im Cytoplasma assoziieren sie mit mehreren spezifischen Proteinen, den sogenannten Sm core Proteinen, und werden am 5'cap methyliert, ehe sie in den Kern reimportiert werden (Izaurrealde & Mattaj, 1995). In diesem Fall ist die Bindung der Sm core Proteine essentiell für den Import. Die Bildung des Trimethyl-Guanosin Caps (m<sub>3</sub>G-cap) erhöht die Importeffizienz, abhängig von der jeweiligen U snRNA oder des Zelltypes (Marshallsay & Lührmann, 1994), wobei noch ungeklärt ist, wie diese beiden Signale miteinander kooperieren.

Die große Variabilität beim Kernimport entsteht, neben einer Vielzahl verschiedener Kernlokalisierungssignale, auch durch eine Fülle von Importrezeptoren.

Da viele dieser Rezeptoren von mehreren Gruppen gleichzeitig charakterisiert wurden, gibt es mehrere Bezeichnungen für den selben Rezeptor. In dieser Arbeit wurden nur die unterstrichenen Bezeichnungen verwendet:

- Importin $\alpha$  / Karyopherin $\alpha$  / PTAC58 / SRP1 / KAP60 / NBP70 / p54/56 / NPI-1 / pendulin / oho31 / Rch1
- Importin $\beta$  / Karyopherin $\beta$ 1 / PTAC97 / KAP95 / RSL1 / p97
- Transportin / Karyopherin $\beta$ 2
- RanBP5 / Karyopherin $\beta$ 3 / PSE1
- RanBP4 / Karyopherin $\beta$ 4 / Kap123
- RanBP7



So kann Importin $\beta$  nicht nur den Kernimport von Proteinen mit klassischen NLS vermitteln, sondern auch den anderer Proteine wie Stat1 mit anderen NLS. Die Bindung von Stat1 an Importin $\beta$  wird dabei von einem spezifischen Mitglied der Importin $\alpha$  Familie vermittelt (Sekimoto et al., 1997).

Neben Mitgliedern der Importin $\alpha$  Familie kann Importin $\beta$  auch andere Adaptoren verwenden, die die Bindung an ein Importsubstrat vermitteln, oder Adapter-unabhängig direkt an ein Substrat binden (Jäkel & Görlich, 1998). Neben Importin $\beta$  gibt es zusätzlich noch eine Reihe Importin $\beta$ -verwandter Transportrezeptoren wie Transportin, das die M9-Sequenz in hnRNP A1 und A2 erkennt, aber nicht mit mono- oder bipartiten NLS interagiert (Pollard et al., 1996) (siehe auch Kap.1.4). Die Importin $\beta$ -verwandten RanBP5 und RanBP7 sind dagegen für den Import ribosomaler Proteine verantwortlich (Jäkel & Görlich, 1998).

### 1.3 Kernexport

Ähnlich dem Kernimport findet auch der Kernexport von Proteinen und RNAs über den NPC statt, ist Signal-vermittelt und Energie-abhängig. RNA verläßt den Kern in der Regel jedoch nicht als "nackte" RNA sondern in Assoziation mit Proteinen als RNP Komplex (Visa et al., 1996a,b). Daher kann man den RNA Export als einen modifizierten Protein Export sehen. Es konnte bereits gezeigt werden, daß es in der eukaryotische Zelle mindestens 4 Hauptexportwege gibt, die für die jeweiligen RNA-Klassen, d.h. für mRNA, tRNA, rRNA, 5S rRNA und U snRNA, spezifisch sind (Mattaj & Englmeier, 1998). Für ein besseres Verständnis des zellulären Exportes, hat die Analyse des retroviralen RNA Exportes wesentlich beigetragen.

Retrovirale Replikation erfordert die Expression von sowohl vollständig gespleißter, als auch nicht- oder unvollständig gespleißter viraler mRNA. Die eukaryotische Zelle codiert nun jedoch für Faktoren, die den Export Intron-enthaltender RNA verhindern. Um dieses Problem zu umgehen, haben Retroviren die Fähigkeit entwickelt, zelluläre RNA Exportwege zu benutzen (Cullen, 1998; Hammarskjöld, 1997).

### 1.3.1 Retroviraler RNA Export

Die Genome humaner Retroviren sind relativ klein (ca. 10kb) und durch eine komplexe Organisation charakterisiert. Wie alle Retroviren enthalten sie Gene, die für die Strukturproteine und Enzyme Gag, Pol und Env codieren. Zusätzlich codieren sie aber auch für eine Vielzahl von regulatorischen und akzessorischen Proteinen. Um die Limitierung, die sich aus dem relativ kleinen Genom ergibt zu umgehen, benutzen Retroviren überlappende Gene und verschiedene Leseraster. Alle Retroviren verwenden alternatives Spleißen, um eine Vielzahl verschiedener RNA Transkripte zu erhalten. Ein Problem dem sie sich dabei stellen müssen ist das Vorhandensein von unvollständig gespleißten oder ungespleißten viralen Transkripten, die aus dem Kern exportiert werden müssen. Die Fähigkeit von Retroviren cytoplasmatische mRNAs zu exprimieren, die ein oder mehr Introns enthalten, steht in starkem Kontrast zu zellulären Expressionsmustern. In der eukaryotischen Zelle werden in der Regel nur vollständig gespleißte mRNAs aus dem Kern exportiert, um eine korrekte Translation zu gewährleisten. Unter normalen Umständen verbleibt zelluläre Intron-enthaltende RNA, aufgrund der Interaktion mit Spleißfaktoren im Kern, bis sie entweder vollständig gespleißt oder degradiert ist (Legrain & Rosbash, 1989; Fischer et al., 1994; Nakielny et al., 1997).

Retroviren haben nun zwei unterschiedliche posttranskriptionelle Mechanismen entwickelt, mit deren Hilfe sie diese zelluläre Kontrollbarriere umgehen können.

Komplexe Retroviren wie HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus Typ 1) codieren für einen viralen trans-Aktivator, im Fall von HIV-1 ist das das viral codierte Protein Rev, welcher direkt mit einer *cis*-liegenden Zielsequenz interagiert, die in allen Intron-enthaltenden viralen mRNAs vorhanden ist und deren Kernexport vermittelt (Malim et al., 1989a).

Einfachere Retroviren wie MPMV (Mason-Pfizer Monkey Virus) dagegen, codieren nicht für ein solches Protein. Der Kernexport ihrer Intron-enthaltenden RNAs wird direkt durch eine *cis*-liegende RNA Sequenz vermittelt, die als CTE (constitutive transport element) bezeichnet wird. Im Gegensatz zum Rev-vermittelten RNA Export von HIV-1 wirkt CTE unabhängig von anderen viral codierten Proteinen (Bray et al., 1994; Ernst et al., 1997b). Der zur Zeit vielversprechendste zelluläre Faktor, der am CTE-vermittelten RNA Export beteiligt ist, ist das Protein TAP (Tip associated protein). TAP ist ein nucleocytoplasmatisches Shuttleprotein (Bear et al., 1999; Kang & Cullen, 1999), welches direkt an das CTE bindet (Grüter et al., 1998).

Die beiden retroviralen Systeme scheinen sich daher unterschiedlicher Exportwege und Faktoren zu bedienen, die aber beide auch von zellulären RNAs benutzt werden.

Durch Überexpression des Rev-NES in *Xenopus* Oocyten konnte gezeigt werden, daß sich der Rev-vermittelte RNA Exportweg vom zellulären mRNA Exportweg unterscheidet. Allerdings wird durch eine Überexpression der Kernexport von 5S rRNA und U snRNA gehemmt, was darauf hindeutet, daß diese beiden zellulären RNAs gleiche Faktoren für ihren Export benutzen, wie sie auch Rev benutzt (Fischer et al., 1994). Während eine Überexpression des Rev-NES keinen Einfluß auf zellulären mRNA Export hat, so inhibiert CTE Überexpression in *Xenopus* Oocyten deutlich den zellulären mRNA Export, hat aber keinen Einfluß auf den Export der 5S rRNA und U snRNA (Pasquinelli et al., 1997; Saavedra et al., 1997).

### 1.3.1.1 Rev-vermittelter RNA Export von HIV-1

HIV-1 exprimiert 9 verschiedene Genprodukte, deren RNAs in 3 Klassen aufgeteilt werden (siehe Abb.1.3). Die 2kb Klasse ist vielfach gespleißt und codiert für die regulatorischen Proteine Tat, Nef und Rev. Die 4kb Klasse ist einfach gespleißt und codiert für die akzessorischen Proteine Env, Vif, Vpr und Vpu, während die 9kb Klasse vollständig ungespleißt ist und entweder für die beiden Produkte Gag (gruppenspezifische Antigene) und Pol (enzymatische Aktivität, d.h. Reverse Transkriptase etc.) codiert, oder als Genom für neue Viren verwendet wird.

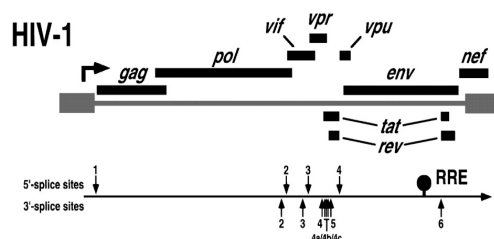


Abb.1.3: Genomaufbau des HIV-1

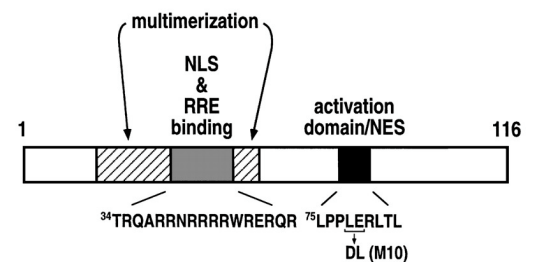


Abb.1.4: Das HIV-1 Rev Protein und seine Domänen

Früh im Replikationszyklus reichert sich vollständig gespleißte virale mRNA im Cytoplasma an, die über den normalen zellulären mRNA Exportweg transportiert wurde und für Tat, Nef und Rev codiert. Später, aufgrund der Koordination durch Rev, gelangen auch die restlichen, Intron-enthaltenden RNAs ins Cytoplasma (Emmerman et al., 1989; Chang & Sharp 1989; Felber et al., 1989; Hammarskjöld et al., 1998; Malim et al., 1989a).

Rev ist ein kleines 13kDa großes Phosphoprotein, das Sequenz-spezifisch an RNA binden kann und durch eine modulare Domänenorganisation charakterisiert ist (Cochrane et al., 1989; Malim et al., 1989a). Sowohl Kernimport als auch RNA-Bindung erfolgt durch eine Arginin-reiche Domäne, die die Aminosäuren 33-46 umfaßt (siehe Abb.1.4) (Hammerschmid et al., 1994; Hope et al., 1990; Kjems et al., 1992; Zapp et al., 1991). Mit dieser Domäne bindet Rev spezifisch an eine 240 Basen umfassende, komplexe RNA Sekundärstruktur, das RRE (Rev Response Element), welches sich im *env*-Intron befindet und daher in allen Intron-enthaltenden mRNAs vorliegt (Daly et al., 1989; Zapp & Green, 1989; Heaphy et al., 1990). Nach Bindung von Rev an das RRE als Monomer, kommt es dann an diesem zur Bildung eines multimeren Rev Komplexes (Cole et al., 1993; Daly et al., 1989, 1993a).

Die Multimerisationsdomänen befinden sich seitlich neben der NLS/RNA-Bindungsdomäne und umfassen die Aminosäuren an den Positionen 18-32 und 47-60 (Madore et al., 1994; Brice et al., 1999).

Eine weitere Domäne, die sogenannte Aktivierungs- oder Effektor-domäne umfaßt die Aminosäuren 75-93 (siehe Abb.1.4). Sie ist essentiell für den Export des Rev/RNA Komplexes und enthält 4 gleich verteilte Leucine, die ein prototypisches Kernexportsignal (NES) bilden (Fischer et al., 1995; Wen et al., 1995).

### Leucin-reiche NES

Das HIV-1 Rev Protein war das erste Protein, in dem ein solches Leucin-reiches Kernexportsignal beschrieben wurde (Fischer et al., 1995). Mittlerweile wurde eine zunehmende Zahl von viralen und zellulären Proteinen, mit einer Vielzahl von biologischen Funktionen identifiziert, die ebenfalls ein Rev-ähnliches, Leucin-reiches Kernexportsignal besitzen.

Rev	70-	P V P L Q	L	P	P	L	E	R	L	T	L	D	C	N	E	
PKI	33-	N S N E	L	A	L	K	L	A	G	L	D	I	N	K	T	E
TFIIIA	325-	S K A D P	L	P	V	L	E	N	L	T	L	K	S	S	N	
Aktin	171-		L	P	H	A	I	M	R	L	D	L	A			
p53	337-	R F E M	F	R	E	L	N	E	A	L	E	L	K	D	A	

**NES Konsensus-Sequenz:** L x (1-3) L x (2-3) L x L

Mehrere zellulärer Proteine konnten bisher identifiziert werden, die direkt oder indirekt mit diesem NES von Rev interagieren.

Der wohl bekannteste Faktor ist CRM1/exportin1 (chromosome maintanance region protein). Eine Vielzahl von Studien hat gezeigt, daß CRM1/exportin1 ein bona fide Exportrezeptor ist, der die nucleocytoplasmatische Translokation des Rev/RNA Komplexes über den NPC vermittelt (reviewed in: Ohno et al., 1998; Görlich & Kutay, 1999; Nakielny & Dreyfuss, 1999; Stutz & Rosbash, 1998; Weis, 1989). CRM1/exportin1 hat eine signifikante Ähnlichkeit zu Importin $\beta$  (Görlich et al., 1997), ist sowohl im Kern als auch an den nucleoplasmatischen und cytoplasmatischen Filamenten des NPC lokalisiert (Fornerod et al., 1997a) und im Besonderen mit dem Nucleoporin CAN/Nup214 assoziiert (Fornerod et al., 1996). Durch Leptomycin B, einem spezifischen Inhibitor von CRM1/exportin1 (Kudo et al., 1998, 1999), konnte gezeigt werden, daß CRM1/exportin1 nicht nur die nucleocytoplasmatische Translokation des HIV-1 Rev Protein vermittelt (Wolff et al., 1997), sondern auch den Kernexport aller anderen Proteine, die ein Rev-ähnliches, Leucin-reiches NES enthalten (Fornerod et al., 1997b; Fukuda et al., 1997; Elfgang et al., 1999).

CRM1/exportin1 interagiert nur in Gegenwart von RanGTP mit dem Rev-NES (Fornerod et al., 1997b; Stade et al., 1997), wobei diese Interaktion scheinbar auch die Richtung des Exportes festlegt (Fischer et al., 1999). Quantitative Studien mit RanGTP und Kernexportsignalen verschiedener Proteine haben ergeben, daß es signifikante Unterschiede in der Bindungsaffinität zwischen CRM1/exportin1 und den verschiedenen NES gibt (Askjaer et al., 1999). Im Besonderen wurde gezeigt, daß die Affinität von CRM1/exportin1 für das Rev-NES extrem niedrig ist (Askjaer et al., 1999). Dies deutet darauf hin, daß zwar CRM1/exportin1 und RanGTP essentiell für die Translokation des Rev/RNA Komplexes über die Kernpore ist, sie deuten aber auch auf das Vorhandensein zusätzlicher Faktoren hin, die die Interaktion zwischen Rev und CRM1/exportin1 vermitteln.

Ein weiterer Bindungspartner von Rev, der durch biochemische cross-linking Experimente identifiziert wurde, ist der eukaryotische Initiationsfaktor 5A (eIF-5A) (siehe auch Kap.1.4) (Ruhl et al., 1993).

Der deutlichste Hinweis darauf, daß eIF-5A ein Cofaktor von Rev ist, ergab sich durch konstitutive Expression von mutierten eIF-5A Proteinen (im Besonderen eIF-5A-M14), die die Rev-Funktion und dadurch HIV-1 Replikation *in trans* blockiert haben (Bevec et al., 1996; Junker et al., 1996). Des weiteren konnten gezeigt werden, daß durch Mikroinjektion von eIF-5A-M14 in den Kern somatischer Zellen sowie durch Mikroinjektion von eIF-5A Antikörpern in den Kern von *Xenopus* Oocyten, der Kernexport von Rev inhibiert wird (Elfgang et al., 1999; Hofmann, W. Diplomarbeit 1999; Hofmann et al., 2001). eIF-5A

scheint daher eine Rolle im Rev-vermittelten Kernexport zu spielen. Die genaue Funktion von eIF-5A, sowie die Wirkungsweise der eIF-5A-M14 Mutante war bis jetzt jedoch noch unklar.

### 1.3.2 mRNA Export

Die meisten mRNAs werden als pre-mRNAs transkribiert und durchlaufen mehrere posttranskriptionelle Prozessierungsschritte bis zur Reifung: die Addition einer 7-Monomethyl-Guanosin ( $m^7G$ ) Cap Struktur an das 5' Ende des Transkriptes, Entfernung der Introns durch Spleißen und Polyadenylation an einer definierten Stelle innerhalb der 3' untranslatierten Region (reviewed in: Banerjee, 1980; Moore et al., 1993).

Die ersten Proteine bei denen eine Rolle beim Kernexport der mRNA vermutet wurde, waren die hnRNPs (heterogenous nuclear RNA-binding proteins). hnRNPs sind eine Familie von Proteinen, die während der Transkription mit pre-mRNA assoziiert sind und auch nach dem Spleißen mit ihr verbunden bleiben (Piñol-Roma et al., 1988; reviewed in: Dreyfuss et al., 1993). Obwohl einige hnRNPs wie hnRNP C beim Export durch den NPC von der mRNA entfernt werden, bleiben einige, im Besonderen hnRNP A1 und hnRNP K während des Exportes mit ihr assoziiert (Piñol-Roma & Dreyfuss, 1992, 1993). Außerdem besitzen sowohl hnRNP A1 als auch hnRNP K Kernexportsignale, die den Export von Proteinen, in Abwesenheit von RNA, vermitteln können (Michael et al., 1995). Bindung von mRNA an diese beiden hnRNPs ist jedoch nicht ausreichend für den Export, da diese beiden auch an mRNAs binden, die den Kern nicht verlassen können.

In letzter Zeit wurde ein weiteres Protein identifiziert, welches in den Export von mRNA involviert sein soll, der Kernexportfaktor TAP. TAP wurde zuerst als Exportfaktor für CTE-enthaltende virale RNA identifiziert (siehe Kap.1.3.1) (Grüter et al., 1998). Neben einer CTE-spezifischen Bindungsdomäne enthält TAP eine essentielle carboxyterminale Sequenz, die sowohl als Kernexportsignal als auch als Bindungsdomäne für Nucleoporine dient (Bachi et al., 2000; Bear et al., 1999; Kang & Cullen, 1999). Die zentrale Domäne von TAP interagiert mit p15, einem kleinen Protein, das mit dem RanGDP-bindenden Kernexportfaktor NTF2 verwandt ist (Katahira et al., 1999). TAP-p15 Heterodimerisation scheint für einen effizienten mRNA Export erforderlich zu sein (Braun et al., 2001; Guzik et al., 2001). Im Gegensatz zum viralen, CTE-vermittelten Export, bindet TAP beim zellulären mRNA Export jedoch nicht direkt an die RNA. Dies deutet darauf hin, daß reife zelluläre mRNA TAP über eine Protein-Protein-Interaktion mit einem noch unbekanntem Faktor rekrutiert, während CTE über eine direkte Interaktion mit TAP in den zellulären mRNA Exportweg einsteigt.

Der TAP-vermittelte Export scheint ein genereller Exportweg für zelluläre mRNAs zu sein. Jedoch haben in letzter Zeit mehrere Studien gezeigt, daß unter besonderen zellulären Umständen, wie etwa Hitzeschock, mRNAs auch über andere, spezifische Wege exportiert werden können.

So wird in Säugerzellen durch Hitzeschock nicht nur die Transkription von hsp70 und anderen Streß-verbundenen mRNAs induziert, sondern auch die Stabilität sowie der Export der jeweiligen mRNAs gesteigert (Banerji et al., 1986). Im Gegensatz dazu werden die meisten anderen mRNAs transkriptionell herunterreguliert und sammeln sich im Kern an (Sadis et al., 1988). Die Unterschiede im Exportverhalten der jeweiligen mRNAs, also ein gesteigerter Export der Streß-verbundenen mRNAs und ein eingeschränkter Export aller anderen mRNAs, deutet darauf hin, daß diese Hitzeschock-mRNAs einen gesonderten Exportweg haben.

Die mRNAs von Early Response Genen (ERGs) haben normalerweise eine kurze Halbwertszeit. Sie besitzen AU-reiche Elemente (AREs) in ihrer 3' untranslatierten Region (UTR), die mit zahlreichen Proteinen interagieren, wodurch ihre Halbwertszeit reguliert wird (Chen & Shyu, 1995; DeMaria & Brewer, 1996; Brennan & Steitz, 2001). Eines dieser Proteine ist HuR, ein ubiquitär exprimiertes Mitglied der ELAV (embrionic lethal abnormal vision) Familie von RNA-bindenden Proteinen (Ma et al., 1996). Bindung von HuR an AREs führt zur Stabilisierung der jeweiligen mRNAs (Fan & Steitz, 1998b; Peng et al., 1998). HuR enthält drei konservierte RNA Erkennungsmotive (RREs: RNA recognition element) und eine "Hinge"-Region, die sich zwischen RRE2 und RRE3 befindet (Antic & Keene, 1997; Fan & Steitz, 1998a). In der "Hinge"-Region befindet sich eine Shuttle-Domäne (HNS: HuR nucleocytoplasmic shuttling), die keine Ähnlichkeit zu früher beschriebenen Shuttlesequenzen aufweist und sowohl Import als auch Export vermittelt (Fan & Steitz, 1998a) (siehe auch Kap.1.4). Kürzlich wurden zwei Bindungspartner von HuR identifiziert, APRIL (acidic protein rich in leucine) und pp32, die beide Rev-ähnliche, Leucin-reiche NES enthalten (Chen et al., 1996; Mencinger et al., 1998; Brennan et al., 2000). Inhibition des CRM1/exportin1 abhängigen Exportweges mit Leptomycin B (s.o.) hat gezeigt, daß der Export von APRIL und pp32 gehemmt wird, während es keinen Einfluß auf die nucleocytoplasmatische Verteilung von HuR gibt (Brennan et al., 2000). Nach UV-cross-linking von HuR an polyadenylierte RNA wird jedoch der Export dieses Komplexes ebenfalls durch Leptomycin B inhibiert (Brennan et al., 2000; Gallouzi et al., 2000). Dies läßt darauf schließen, daß HuR zwei alternative Exportwege benutzt: einen, nach Bindung an Streß-mRNA, der die beiden Liganden APRIL und pp32 involviert und CRM1/exportin1 abhängig

ist und einen zweiten, CRM1/exportin1 unabhängigen, der durch die HNS Sequenz vermittelt wird.

### 1.3.3 rRNA Export

Die Biogenese eukaryotischer Ribosomen erfolgt im Nucleolus und erfordert den koordinierten Zusammenbau von vier verschiedenen rRNAs und ca. 80 ribosomalen Proteinen. Die 5,8S, 18S und 28S rRNA werden im Nucleolus durch die RNA Polymerase I synthetisiert, während die 5S rRNA durch die RNA Polymerase III im Nucleoplasma transkribiert wird. Die ribosomalen Proteine werden von mRNAs codiert, die durch die RNA Polymerase II synthetisiert werden. Nach der Translation werden diese Proteine in den Nucleolus importiert, wo der Zusammenbau zu den 40S und 60S ribosomalen Untereinheiten erfolgt, die dann wiederum ins Cytoplasma exportiert werden (Warner, 1990; Scheer & Weisenberger, 1994; Shaw & Jordan, 1995).

Neben der Tatsache, daß ribosomale Untereinheiten in einem unidirektionellen, Energie-abhängigen Prozeß über den NPC transportiert werden, weiß man über diesen Exportweg relativ wenig (Khanna-Gupta & Ware, 1989; Bataille et al., 1990).

Eine Besonderheit stellt hier die ribosomale 5S rRNA in Amphibien Oocyten dar. Amphibien Oocyten enthalten zwei Typen von 5S rRNA Genen, den Oocyten-Typ und den Somatisch-Typ, die während der Entwicklung unterschiedlich exprimiert werden und sich in nur 6 Nukleotiden unterscheiden (Wolffe & Brown, 1988). Dies beruht auf der Strategie in Oocyten und Eiern möglichst viele Ribosomen als Vorrat anzulegen, die dann später, während der Embryogenese, gebraucht werden.

Während der Oogenese in Stadium I-III Oocyten findet eine gesteigerte Expression der Oocyten-Typ 5S rRNA statt, ehe die Expression der anderen ribosomalen RNAs gesteigert wird. Diese Oocyten-Typ 5S rRNA migriert ins Cytoplasma, wo sie in Form von 7S oder 42S RNPs gelagert wird. Die 42S Partikel bestehen aus einer Mischung von 5S rRNA, tRNAs und verschiedenen Proteinen, während die 7S Partikel in einem 1:1 Verhältnis aus 5S rRNA und TFIIIA bestehen (reviewed in: Tafuri & Wolffe, 1993). Mit Beginn der Vitellogenese, wenn die Synthese der anderen ribosomalen Komponenten ebenfalls gesteigert wird, wird zum einen die Somatisch-Typ 5S rRNA exprimiert die direkt in den Nucleolus transportiert wird. Zum anderen wird die gelagerte Oocyten-Typ 5S rRNA aus dem Cytoplasma zurück in den Kern importiert (Dixon & Ford, 1982; Allison et al., 1991).



Drei Proteine sind bekannt, die direkt mit 5S rRNA interagieren können: das La Protein, der Transkriptionsfaktor IIIA (TFIIIA) und das ribosomale Protein L5. Das La Protein interagiert kurzfristig mit allen Pol III Produkten und wirkt in der Pol III Transkription-Termination (Rinke & Steitz, 1982; Gottlieb & Steitz, 1989; Guddat et al., 1990). TFIIIA erreicht während der Stadien I-III der Oogenese die höchste Konzentration (Dixon & Ford, 1982; Ginsberg et al., 1984) und hat während dieser Zeit zwei Funktionen. Zum einen bindet es an die 5S rRNA Gene und fördert die Transkription, zum anderen bindet TFIIIA aber auch direkt an die Oocyten-Typ 5S rRNA und bildet die 7S RNPs, die dann ins Cytoplasma exportiert werden (Honda & Roeder, 1980). Übereinstimmend mit einer Rolle von TFIIIA beim Export ist die Tatsache, daß TFIIIA ein Rev-ähnliches, Leucin-reiches NES besitzt (Fridell et al., 1996) und daß überexprimiertes Rev-NES effizient den Export der 5S rRNA hemmt (siehe Kap.1.3.1), was darauf hindeutet, daß der Rev-vermittelte virale RNA Export und der TFIIIA vermittelte 5S rRNA Export gemeinsame Exportwege benutzen.

Später in der Oogenese (Stadium III-VI), wenn die Synthese der anderen ribosomalen Komponenten ihr Maximum erreicht hat und sich eine bestimmte Menge von L5 Protein im Cytoplasma angereichert hat, wird TFIIIA in den cytoplasmatischen 7S RNPs gegen L5 ausgetauscht. Der so gebildete 5S RNP-Komplex aus 5S rRNA und L5 wird, mit Hilfe der Nucleolus-Lokalisations-Domäne in L5 (Michael & Dreyfuss, 1996), in den Nucleolus gebracht, um dort in die Ribosomen eingebaut zu werden (Allison et al., 1991,1993). Zur selben Zeit findet im Kern die Transkription der Somatisch-Typ 5S rRNA statt, die vorzugsweise direkt an L5 statt an TFIIIA bindet und vermutlich direkt zum Nucleolus gebracht wird, ohne Umweg über das Cytoplasma (Steitz et al., 1988; Denis & le Maire, 1983; Rudt & Pieler, 1996). TFIIIA bindet vorzugsweise an die Oocyten-Typ 5S rRNA, unter Bildung der 7S RNPs, und nicht an die Somatisch-Typ 5S rRNA. Diese spezifische Bindung erfolgt vermutlich aufgrund der 6 unterschiedlichen Nukleotide, da diese bevorzugte Bindung auch mit Hilfe von Mikroinjektionsexperimenten gezeigt werden konnte, bei denen Oocyten-Typ 5S rRNA in Stadium VI Oocyten injiziert wurde, so daß hier große Mengen beider RNA Typen vorhanden waren (Allison et al., 1995).

Wie TFIIIA besitzt auch L5 ein Leucin-reiches NES. Jedoch scheint der Export der Oocyten-Typ 5S rRNA ins Cytoplasma hauptsächlich mit Hilfe von TFIIIA zu erfolgen, während L5 die Aufgabe hat, die 5S rRNA in den Nucleolus zu bringen. Im Gegensatz zu Amphibien Oocyten transkribieren Säugerzellen nur Somatisch-Typ 5S rRNA, die nach der Transkription direkt an L5 bindet und sofort in den Nucleolus gebracht wird (Steitz et al., 1988). In diesen Zellen findet kein Shutteln der 5S rRNA statt und es finden sich keine 7S oder 5S RNPs im Cytoplasma (Honda & Roeder, 1980).

### 1.3.4 U snRNA Export

Die snRNPs U1, U2 U4/6 und U5 sind RNA-Protein Komplexe und Teil der Spleißosomen, in denen die pre-mRNA Prozessierung stattfindet. Jeder snRNP besteht aus je einer (U1, U2 und U5) oder zwei (U4/6) snRNAs, einem gemeinsamen Satz von Proteinen (den Sm Proteinen B, B', D1, D2, D3, E, F und G) und Proteinen die jeweils spezifisch für jeden U snRNP sind (Lührmann et al., 1990).

Alle spleißosomalen U snRNAs, mit Ausnahme der U6, werden nach der Transkription aus dem Kern ins Cytoplasma exportiert, wo sie sich mit den Sm Proteine zusammenlagern, um den Sm Core der U snRNPs zu bilden (DeRobertis, 1982; Mattaj, 1988; Izaurralde & Mattaj, 1992). Danach wird das m<sup>7</sup>G-Cap hypermethyliert um die m<sub>3</sub>G-Cap Struktur zu bilden, woraufhin der Import der U snRNPs in den Kern erfolgt (Mattaj, 1986,1988).

Alle U snRNAs scheinen über den gleichen Weg aus dem Kern exportiert zu werden, was auf eine gemeinsame Struktur der U snRNAs hindeutet, die am Export beteiligt ist (Jarmolowski et al., 1994). Als ein wichtiges Signalelement wurde die m<sup>7</sup>G-Cap Struktur identifiziert (Hamm & Mattaj, 1990), was wiederum zur Entdeckung eines m<sup>7</sup>G-Cap-bindenden Komplexes (CBC) führte (Ohno et al., 1990; Izaurralde et al., 1992; Kataoka et al., 1994). CBC besteht aus zwei Proteinen CBP80 und CBP20, deren Beteiligung am Export nachgewiesen ist (Izaurralde et al., 1995). Der genaue Ablauf des Exportes sowie die genaue Rolle von CBC ist allerdings noch nicht geklärt.

### 1.3.5 tRNA Export

Eukaryotische tRNAs werden als pre-tRNAs im Kern synthetisiert, durchlaufen dort mehrere Prozessierungsschritte und werden schließlich als reife tRNAs aus dem Kern exportiert (reviewed in: Deutscher, 1995; Westaway & Abelson, 1995). Der Exportfaktor für tRNA, Exportin-t oder Exportin (tRNA) wurde zuerst als ein RanGTP-bindendes Protein der Importinβ Familie identifiziert (Kutay et al., 1998). Exportin-t ist limitierend für den tRNA Export und der einzige bekannte Exportrezeptor, der direkt an RNA bindet (Arts et al., 1998a,b; Kutay et al.,1998; Lipowsky et al., 1999)

Exportin-t kann allerdings nicht zwischen Intron-enthaltender und Intron-freier tRNA unterscheiden (Arts et al., 1998b). Die Frage, warum dennoch keine ungespleißte tRNA ins Cytoplasma exportiert wird, wird zur Zeit noch kontrovers diskutiert (Görlich & Kutay, 1999).

## 1.4 NS Signale (nucleocytoplasmic shuttle signals)

Während einige Proteine nach dem Import in den Kern bzw. dem Export aus dem Kern im jeweiligen Kompartiment verbleiben, bewegen sich einige Proteine ständig zwischen Kern und Cytoplasma, was als Shutteln bezeichnet wird. In vielen Fällen wird Shutteln durch eine Kombination eines NLS und eines NES vermittelt. Es kann jedoch auch durch eine Klasse von Transportsignalen kontrolliert werden, die man als NS Signale bezeichnet. NS Signale sind weder NLS noch NES, sondern fungieren mit einem Signal für beide (reviewed in: Michael 2000). Da alle bislang bekannten Proteine mit einem solchen NS Signal mit mRNA interagieren, geht man davon aus, daß sie am mRNA Export beteiligt sind.

Das erste NS Signal wurde im hnRNP A1 Protein identifiziert. Dieses bindet an pre-mRNA im Kern und bleibt an dieser, auch während der Prozessierungsschritte und der anschließenden Translokation über den NPC, gebunden (Michael et al., 1995). Shutteln von hnRNP A1 wird durch eine 38 Aminosäure lange Sequenz vermittelt, die als M9 Domäne bezeichnet wird (Siomi & Dreyfuss, 1995). Der Kernimport erfolgt durch den Importrezeptor Transportin, der direkt an die M9 Domäne bindet (Pollard et al., 1996), während der Exportrezeptor noch unbekannt ist.

Neben hnRNP A1 wurden bisher noch 4 weitere Proteine mit NS Signalen identifiziert. Dabei handelt es sich um die Proteine TAP, hnRNP K, HuR und RHA (RNA Helicase A) (Tang et al., 1999).

Der Transport von TAP wird durch zwei verschiedene Regionen des Proteins kontrolliert. Am N-Terminus befindet sich eine 43 Aminosäuren lange Domäne mit NS Signal Aktivität, wobei hier die Sequenz, die den Import und den Export vermittelt, nicht identisch ist (Bear et al., 1999). Eine zweite NS Signalsequenz befindet sich am C-Terminus (Kang & Cullen, 1999). Ob diese beiden Signale zusammen oder getrennt voneinander wirken, ist jedoch noch unklar.

Das hnRNP K Protein hat neben einem klassischen NLS noch zusätzlich ein NS Signal, das als KNS Domäne bezeichnet wird (Michael et al., 1997), während man das NS Signal bei HuR als HNS bezeichnet (Fan & Steitz, 1998).

## 1.5 Der eukaryotische Initiationsfaktor 5A (eIF-5A)

Der eukaryotische Initiationsfaktor 5A ist ein kleines, saures Protein mit einer Länge von 154 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 16,7kDa, das ubiquitär in Eukaryoten und Archaeobacteria, nicht aber in Eubacteria exprimiert wird (Smit-McBride et al., 1989a). eIF-5A ist einzigartig, da es das einzige, bis heute bekannte, zelluläre Protein ist, welches die ungewöhnliche Aminosäure Hypusin [ N<sup>ε</sup>-(4-amino-2-hydroxybutyl) lysin] enthält (Park et al., 1993a). Die Hypusin-Modifikation ist eine Spermidin-abhängige, posttranslationelle Reaktion, die in zwei Schritten erfolgt und von zwei verschiedenen Enzymen katalysiert wird. Zunächst erfolgt dabei, gleich im Anschluß an die Translation, der Transfer der Aminobutylgruppe von Spermidin auf die ε-Aminogruppe von Lysin an Position 50 von eIF-5A durch die Deoxyhypusinsynthase, wodurch ein Deoxyhypusinrest gebildet wird (Joe et al., 1995; Klier et al., 1995; Yan et al., 1996). In einem zweiten Schritt wird dieses Intermediat durch die Deoxyhypusin-Hydroxylase hydroxyliert, wodurch die aktive Form von eIF-5A entsteht (Csonga et al., 1996).

Obwohl Hypusin-modifiziertes eIF-5A essentiell für die Zellproliferation zu sein scheint (Park et al., 1993b), ist die genaue Funktion schwer zu erfassen. Die Bezeichnung "Initiationsfaktor" stammt von der anfänglichen Entdeckung, daß eIF-5A aus der Ribosomen-gebundenen Fraktion isoliert werden kann. Außerdem kann eIF-5A in einem *in vitro* Assay, der die Bildung der ersten Peptidbindung in der Proteinsynthese imitiert, die Bildung des Dipeptidanalogs Methionyl-Puromycin stimulieren (Park, 1989; Smit-McBride et al., 1989b; Benne & Hershey, 1978). Eine Rolle von eIF-5A in der Translations Initiation konnte jedoch nicht bestätigt werden, da es keine Korrelation zwischen eIF-5A und der generellen Proteinsynthese gibt (Kang & Hershey, 1994, Kang et al., 1993).

eIF-5A liegt in somatischen Zellen und *Xenopus* Oocyten sowohl im Cytoplasma als auch im Kern vor und reichert sich im Besonderen an der nucleoplasmatischen Seite des Kernporenkomplexes an (Rosorius et al., 1999b).

Eine potentielle neue Funktion von eIF-5A ergab sich aus Untersuchungen der posttranskriptionellen Regulation der HIV-1 Genexpression. In cross-linking Experimenten konnte eIF-5A als ein Cofaktor des HIV-1 Rev Proteins identifiziert werden, der an das NES von Rev bindet (Ruhl et al., 1993; siehe auch Kap.1.3.1). Durch konstitutive Expression von bestimmten eIF-5A Mutanten (im Besonderen eIF-5A-M14: die Aminosäuren L und S an den Positionen 138 und 139 wurden gegen D und L ausgetauscht), die noch die Fähigkeiten haben an den Rev/RNA Komplex zu binden, wurde die Rev-Funktion, und dadurch auch die HIV-1

Replikation *in trans* gehemmt (Bevec et al., 1996; Junker et al., 1996). Mikroinjektionsexperimente, bei denen Antikörper gegen eIF-5A in den Kern von somatischen Zellen oder *Xenopus* Oocyten injiziert wurden haben gezeigt, daß die Inhibition der Rev-Funktion auf einer Inhibition des Rev-Exportes beruht (Bevec, et al., 1996; Schatz et al., 1998; Hofmann, W. Diplomarbeit 1999; Hofmann et al., 2001). Diese Ergebnisse zeigen ganz deutlich, daß eIF-5A ein Faktor ist, der essentiell für den Rev-vermittelten RNA Export ist. Welche genaue Funktion eIF-5A bei diesem Export hat und warum die eIF-5A Mutante M14 den Kernexport hemmt, ist jedoch noch nicht klar.

Unterstützt wird die potentielle Rolle von eIF-5A als Exportfaktor auch durch die Tatsache, daß eIF-5A nach Mikroinjektion in den Kern Energie-abhängig exportiert wird (Rosorius et al., 1999b). Des weiteren bindet eIF-5A *in vitro* an den zellulären Exportrezeptor CRM1/exportin1, der ja auch im Rev-vermittelten RNA Export eine Rolle spielt (Rosorius et al., 1999b), sowie an einen neuen Exportrezeptor, Exportin4, wobei in diesem Fall die Bindung von der Hypusinmodifikation abhängig sein soll (Lipowsky et al., 2000). Außerdem interagiert eIF-5A in *Xenopus* Oocyten mit den Nucleoporinen CAN/Nup214, Nup153, Nup98 und Nup62, die alle in Kernexportprozessen involviert sind (Reichart, B., Diplomarbeit 1998; siehe auch Tab.1.2).

Ein weiterer Hinweis auf eine Rolle von eIF-5A beim zellulären RNA-Export kommt aus Dendritischen Zellen. Dendritische Zellen sind die leistungsfähigsten Antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems. Sie liegen in einer unreifen Form in den peripheren Geweben vor, wo sie Fremdartige aufnehmen. In Anwesenheit eines geeigneten Antigens beginnt der Reifungsprozess und die Dendritischen Zellen werden aktiviert (Banchereau & Steinman, 1998; Austyn, 1998; Reis e Sousa et al., 1999). Während des Reifungsprozesses zerlegen sie das aufgenommene Antigen in Peptide, die dann, zusammen MHC (major histocompatibility complex) Molekülen, an die Oberfläche transportiert werden. Des weiteren erhöht sich die T-Zell Adhäsion und die Expression costimulatorischer Moleküle, ebenso wie die Expression bestimmter Rezeptoren, die sie in die sekundären lymphatischen Organe leiten, wo sie die T-Zell spezifische Immunantwort auslösen (Banchereau & Steinman, 1998). Diese reifen Dendritischen Zellen sind durch ein bestimmtes phänotypisches Expressionsmuster von Oberflächenproteinen charakterisiert, wie z.B. die de novo Expression von CD83 (Banchereau & Steinman, 1998; Zhou & Tedder, 1995).

CD83 ist ein 45kDa Glycoprotein, dessen genaue Funktion noch nicht bekannt ist (Zhou et al., 1992). Allerdings deuten neuere Daten darauf hin, daß CD83 funktionell wichtig bei der T-Zell Aktivierung sein könnte (Lechmann et al., 2001).

Untersuchungen des mRNA Levels in humanen Zellen haben gezeigt, daß eIF-5A in Zelllinien und verschiedenen Geweben konstitutiv exprimiert wird. In primären lymphoiden Zellen dagegen, scheint das eIF-5A Gen gesondert reguliert zu werden. Hier ist die eIF-5A Genexpression konstitutiv niedrig und induzierbar durch T-Lymphocyten spezifische Stimulanzen (Bevec et al., 1994). Mit Hilfe von spezifischen Inhibitoren der Hypusinmodifikation konnte gezeigt werden, daß nach Zugabe dieser Inhibitoren ganz spezifisch der Export der CD83 mRNA blockiert wird, was zu einer Inhibition der CD83 Protein Expression führt (Kruse et al., 2000) (siehe auch: Kap.1.3.2).

Die genaue Funktion von eIF-5A bei diesem Prozeß muß jedoch noch geklärt werden.

## 1.6 Kernaktin

Obwohl Aktin als ein typisches cytoplasmatisches Protein angesehen wird, häufen sich doch die Beschreibungen von Aktin auch im Kern (DeBoni, 1994; Gonsior et al., 1999; Rando et al., 2000). Einige dieser Daten werden mit Skepsis betrachtet, da eine mögliche Kontamination von isolierten Kernen oder subnucleären Fraktionen mit cytoplasmatischem Aktin nicht unbedingt ausgeschlossen werden kann, konnte doch durch handisolierte Kerne oder Kerninhalt von Amphibien Oocyten das Vorhandensein von Kernaktin in einer Konzentration von 3-4mg/ml bestätigt werden (Clark & Merriam, 1977; Clark & Rosenbaum, 1979; Gounon & Karsenti, 1981; Parfenov et al., 1995).

Im Gegensatz zu cytoplasmatischem Aktin, liegt Kernaktin hauptsächlich in einer löslichen, jedoch Polymerisations-kompetenten Form vor. Trotz des bedeutenden Problems der cytoplasmatischen Kontamination ist es heute allgemein akzeptiert, daß Aktin nicht nur in Kernen von Amphibien Oocyten, sondern auch in Interphase-Kernen somatischer Zellen vorhanden ist. Aufgrund der vorliegenden Menge und des weit verbreiteten Vorkommens ist es sehr wahrscheinlich, daß Kernaktin an spezifischen Kernfunktionen beteiligt ist, obwohl bis heute noch keine eindeutige Funktion gefunden wurde.

So wurde z.B. vorgeschlagen, daß Kernaktin eine essentielle Komponente eines intranucleären Motorsystems sein könnte, welches an der dynamischen und strukturellen Form des Chromatins beteiligt ist (DeBoni, 1994), sowie am intranucleären Transport von RNA (Ueyama et al., 1987; Sahlas et al., 1993; Parfenov et al., 1995). Übereinstimmend mit dieser Hypothese wurden Aktinfilamente in Kernen von Amphibien Oocyten in direktem Kontakt mit RNPs beobachtet (Gounon & Karsenti, 1981). Des weiteren haben Mikroinjektionen von Aktin-Antikörpern und den Aktin-bindenden Proteinen Fragmin und

Gelsolin in Amphibien Oocytenkerne die Transkription durch die RNA Polymerase II inhibiert, sowie die Rückbildung der Loops der Lampenbürstenchromosome induziert (Scheer et al., 1984). Obwohl diese Ergebnisse darauf hindeuten, daß Kernaktin kritisch an der Genexpression beteiligt ist, so lassen sie doch nicht den eindeutigen Schluß zu, daß es sich bei dem Aktin-sensitiven Schritt um die Transkription an sich (Egly et al., 1984) oder um einen posttranskriptionellen Schritt handelt.

Kürzlich konnte gezeigt werden, daß Kernaktin an den Kernporenkomplex-assoziierten nucleoplasmatischen Filamenten lokalisiert ist und mit dem Exportfaktor eIF-5A interagiert (Hofmann, W. Diplomarbeit, 1999; Hofmann et al., 2001).

Diese Interaktion mit einem Exportfaktor könnte auf eine neue Funktion von Kernaktin im Kernexport hinweisen. Eine potentielle Rolle von Kernaktin beim Kernexport würde auch die kürzlich beobachtete Interaktion von Aktin mit mRNP Komplexen, von Beginn der Transkription bis hin zum Export dieser Komplexe aus dem Kern, erklären (Percipalle et al., 2001).

## 1.7 Ziele der Arbeit

Der eukaryotische Initiationsfaktor 5A (eIF-5A) konnte als ein Rev Cofaktor identifiziert werden, der an das NES von Rev bindet (Ruhl et al., 1993). Des weiteren haben Studien in *Xenopus* Oocyten gezeigt, daß eIF-5A an den NPC-assoziierten intranucleären Filamenten akkumuliert und mit dem Exportrezeptor CRM1/exportin1 interagiert (Rosorius et al., 1999b). Dies alles deutet darauf hin, daß eIF-5A ein essentieller Faktor für den Export des Rev ist, was auch durch Mikroinjektionsstudien in somatischen Zellen gezeigt werden konnte. Dabei wurden Antikörper gegen eIF-5A und spezifische Mutanten von eIF-5A (eIF-5A-M14) injiziert, die den Export von Rev bzw. die HIV-1 Replikation *in trans* inhibiert haben (Bevec et al., 1996; Junker et al., 1996; Elfgang et al., 1999).

Vorläufige Mikroinjektionsstudien haben bereits gezeigt, daß eIF-5A auch in *Xenopus* Oocyten ein essentieller Faktor für den Export des Rev ist (Hofmann, W. Diplomarbeit, 1999).

Ein Hinweis auf eine zelluläre Funktion von eIF-5A kommt aus Dendritischen Zellen (Kruse et al., 2000). Hier deuten die Ergebnisse darauf hin, daß eIF-5A am Kernexport der CD83 mRNA beteiligt sein könnte.

Unklar ist jedoch, welche genaue Funktion eIF-5A bei diesen Exportwegen hat. Mit Hilfe von Mikroinjektionsexperimenten sowie Bindungsstudien in Lösung, unter Verwendung verschiedener eIF-5A Konstrukte, sollte die Rolle des eIF-5A beim Kernexport des Rev und beim Kernexport der CD83 mRNA im Detail analysiert werden.

Des weiteren sollten neue eIF-5A-bindende Proteine identifiziert werden. Als ein Bindungspartner von eIF-5A konnte bereits Kernaktin identifiziert werden. Vorläufige Experimente deuten darauf hin, daß eine potentielle neue Funktion des Kernaktin im Kernexport liegt (Hofmann, W. Diplomarbeit, 1999). Mit Hilfe von Mikroinjektionen von Aktin-Antikörpern in Kerne von *Xenopus* Oocyten, sowie mit Hilfe verschiedener Aktin-bindender Proteine, sollte die Rolle von Kernaktin näher analysiert werden.

Durch die Identifikation weitere Bindungspartner sollte die zelluläre Funktion von eIF-5A in *Xenopus* Oocyten näher analysiert werden.



## 2. Material

### 2.1 Biologisches Material

#### 2.1.1 Tiere

- **Mäuse:** Balb/c Mäuse (4-6 Wochen alt) wurden von Charles River Wiga, Sulzfeld, bezogen.
- ***Xenopus laevis*:** Weibliche afrikanische Krallenfrösche wurden von einer Südafrikanischen Tierfarm (South African Snake Farm, Fish Hoek, Cape Province, Südafrika) oder aus institutseigener Nachzucht bezogen. Weibliche amerikanische Krallenfrösche wurden von Nasco (Wisconsin, USA) bezogen.

#### 2.1.2 Zelllinien

- **HeLa:** Diese Zelllinie stammt aus dem Epithelgewebe eines menschlichen Cervix-Karzinoms. Die Zellen wurden in Eagle's MEM mit Earle's Salzen und 10% FCS bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.
- **SP2/0:** Bei diesen Zellen handelt es sich um Mausmyelomzellen, die für Fusionen mit Lymphzellen der Maus verwendet wurden. Die Zellen wurden in RPMI mit 10% FCS, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% NEAA (non essential amino acids) und 0,5% Na-Pyruvat bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 2.1.3 Primäre Antikörper

- **anti-GST:** Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen Glutathion-S-Transferase (Sigma-Aldrich, Deisenhofen).
- **anti-BSA:** Monoklonaler Maus-Antikörper (Sigma-Aldrich, Deisenhofen).
- **anti-eIF-5A:** Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Hammerschmid et al., 1994). Dieser Antikörper wurde freundlicherweise von Prof. J. Hauber, Erlangen, zur Verfügung gestellt.
- **anti-Aktin (mAB 2G2):** Monoklonaler Maus-Antikörper (Gonsior et al., 1999). Dieser Antikörper wurde freundlicherweise von Prof. B.M. Jokusch, Braunschweig, zur Verfügung gestellt.
- **anti-HuR:** Polyklonaler Kaninchen-Antikörper. Dieser Antikörper wurde freundlicherweise von Dr. J. Keene, Duke, zur Verfügung gestellt
- **anti-His:** Monoklonaler Maus-Antikörper gegen Tetra-His (Qiagen, Hilden).
- **anti-CRM1:** Polyklonales Kaninchen-Antiserum (Kudo et al., 1997). Dieser Antikörper wurde freundlicherweise von Prof. J. Hauber, Erlangen, zur Verfügung gestellt.
- **mAB 414:** Monoklonaler Maus-Antikörper gegen eine Familie von Nucleoporinen mit FG Repeats (Davis & Blobel, 1986) (Hiss Diagnostics, Freiburg).
- **anti-TGase:** Monoklonaler Maus-Antikörper (Dunn Labortechnik, Asbach).
- **anti-TFIIIA (1):** Monoklonaler Maus-Antikörper (Krämer & Roeder, 1983). Dieser Antikörper wurde freundlicherweise von Prof. A. Krämer, Basel, zur Verfügung gestellt.
- **anti-TFIIIAW9:** Monoklonaler Maus-Antikörper (siehe Kap.3.4: Herstellung monoklonaler Antikörper).
- **anti-Digoxigenin (POD):** Fab-Fragmente eines anti-Digoxigenin-Antikörpers vom Schaf, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (Roche Diagnostics, Mannheim)

- **anti-Digoxigenin (AP):** Fab-Fragmente eines anti-Digoxigenin-Antikörpers vom Schaf, konjugiert mit alkalischer Phosphatase (AP) (Boehringer, Mannheim)

#### 2.1.4 Sekundäre Antikörper

- Antikörper gegen:
- **Maus** (IgG+IgM) gekoppelt an: Texas-Red  
12nm kolloidalem Gold  
Peroxidase
  - **Kaninchen** gekoppelt an: Peroxidase  
6nm kolloidalem Gold  
Texas-Red

Alle Sekundär-Antikörper wurden von Dianova (Hamburg) bezogen.

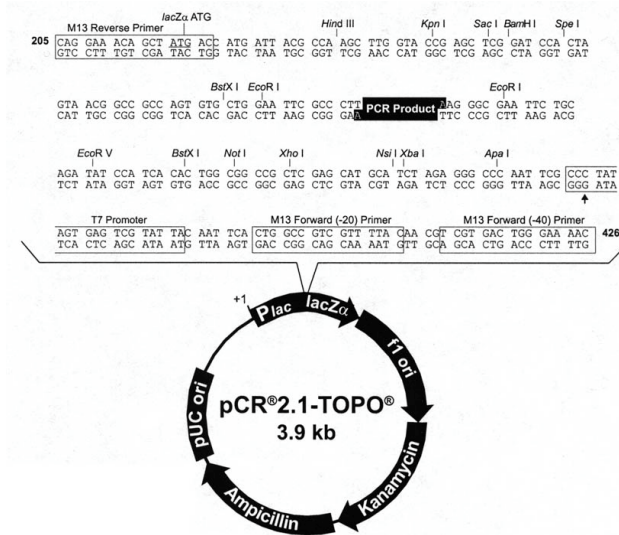
#### 2.1.5 Bakterienstämme

- ***E. coli TOP10 One Shot<sup>®</sup>***: Dieser Bakterienstamm wurde zur Transformation des pCR2.1 Vektors verwendet. Diese kompetenten Zellen waren im Topo-Kit der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bereits enthalten (siehe auch 2.2.5).
- ***E. coli BL21*** : Bei dem hier verwendeten *E. coli* Stamm handelt es sich um *E. coli BL21 CodonPlus<sup>™</sup> (DE3)-RIL* der Firma Stratagene (Amsterdam). Dieser Stamm zeichnet sich durch eine verminderte Protease Aktivität aus und besitzt außerdem zusätzliche Kopien seltener tRNA-Gene, was die Expression vieler Proteine deutlich verbessert.

## 2.2 Molekularbiologisches Material

### 2.2.1 Vektoren

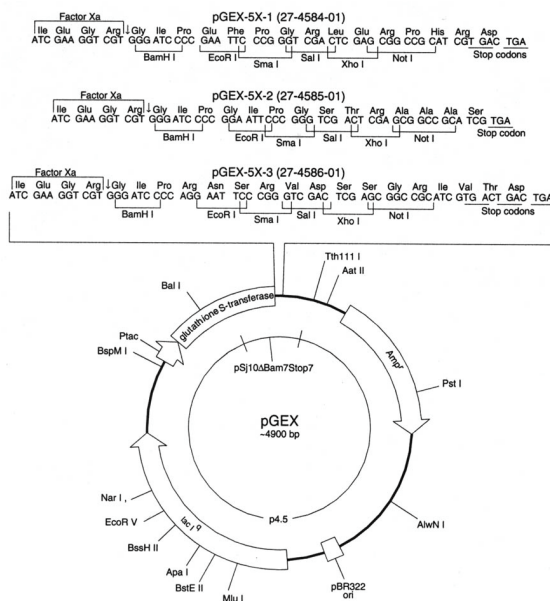
#### • pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup>



Dieser Vektor stammt aus einem Kit der Firma Invitrogen (Karlsruhe) und wurde für die direkte Klonierung von DNA-Fragmenten verwendet, die durch PCR gewonnen wurden. Der Vektor besitzt mehrere Resistenzen und eine Promotor-Sequenz für die T7 RNA-Polymerase.

Abb.2.1: pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup>

#### • pGEX-5X-1



Dieser Vektor der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) ist Teil eines Expressionssystems. Einklonierte cDNA wird als Fusionsprotein exprimiert, an das N-terminal das Enzym Glutathion-S-Transferase fusioniert ist. Über den GST-Anteil ist eine Aufreinigung des Fusionsproteins möglich. Der GST-Anteil kann später auch über die Erkennungssequenz für den Faktor X<sub>a</sub> abgespalten werden (siehe Vektorkarte, Abb.2.2).

Abb.2.2: pGEX-5X-1

### 2.2.2 Enzyme

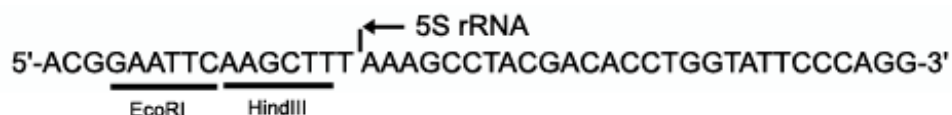
- **Restriktionsenzyme:** Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma MBI Fermentas (St.Leon Rot) bezogen.
- **Ligasen:** Alle verwendeten Ligasen wurden von der Firma MBI Fermentas (St.Leon Rot) bezogen.
- **Reverse Transkriptase:** Für die RT-PCR wurde die Superscript II-RT der Firma Stratagene (Amsterdam) verwendet.
- **Tfl-DNA-Polymerase:** Die, für alle DNA-Amplifikationen verwendete, DNA-Polymerase aus *Thermus flavus* wurde über die Firma Promega (Mannheim) bezogen.
- **T4-Polynucleotid-Kinase:** Diese Kinase wurde für die Phosphorylierung von Schnittenden verwendet und von der Firma Life Technologies (Hamburg) bezogen.

### 2.2.3 Oligonucleotide

- **5S rRNA Primer forward**

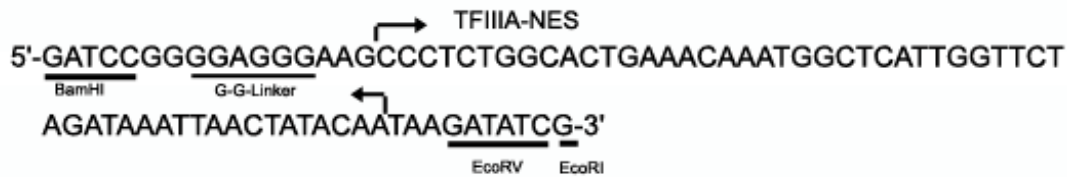


- **5S rRNA Primer reverse**

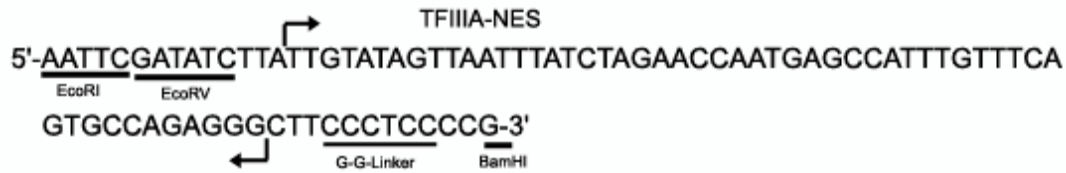


Diese Primer wurden freundlicherweise von Prof. T. Pieler, Göttingen, zur Verfügung gestellt und wurden verwendet, um die Sequenz der Oocyten-Typ 5S rRNA aus einer RT-PCR zu amplifizieren.

- **TFIIIA-NES forward**



- **TFIIIA-NES reverse**



Diese Oligonukleotide wurden bei der Firma Interaktiva (Ulm) bestellt, nach Vorlage des beschriebenen TFIIIA-NES (Fridell et al., 1996), um GST-TFIIIA-NES herzustellen.

- **pGEX 3'-Sequencing**

5'-CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG-3'

- **pGEX 5'-Sequencing**

5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3'

Diese Primer wurden verwendet, um Inserts des pGEX-5X-1 Vektors zu sequenzieren.

- **M13 forward und reverse**

Diese Primer wurden verwendet, um Inserts des pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO-Vektors zu sequenzieren.

- **Oligo (dT)-Primer**

Diese Primer wurden für die RT-PCR verwendet und waren Teil eines Kits der Firma Clontech (Heidelberg).

### 2.2.4 Kits

- Plasmid Mini-Präp (Qiagen, Hilden)
- QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden)
- TOPO<sup>®</sup> - und Original TA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe)

### 2.2.5 Proteine und RNAs

- **BSA:** Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
- **GST-TFIIIA-NES:** NES des TFIIIA Proteins; Herstellung: siehe Kap.3.6.10
- **Latrunculin B:** Aktin-bindendes Protein aus *Latrunculia magnifica*, Calbiochem (Darmstadt)
- **Swinholide A:** Aktin-bindendes Protein aus *Theonella swinhoei*, Alexis Biochemicals (Grünberg)
- **Aktin-Monomere:** Fluorescein-gelabeld. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. H. Hinssen, Bielefeld.
- **IgM:** Gereinigtes Maus IgM (Sigma-Aldrich, Deisenhofen).
- **IgG:** Gereinigtes Kaninchen IgG (Sigma-Aldrich, Deisenhofen).
- **WGA:** Lektin, das O-glycosidisch gebundene N-Acetyl-Glucosamine erkennt. Peroxidase-gekoppelt (wheat germ agglutinine; Sigma-Aldrich, Deisenhofen).
- **GST-TFIIIA:** Freundlicherweise von Prof. T. Pieler, Göttingen, zur Verfügung gestellt.

Die folgenden Proteine wurden freundlicherweise von Prof. J. Hauber, Erlangen, zur Verfügung gestellt.

- **GST; GST-eIF-5A; GST-eIF-5A-M14; eIF-5A-wt; His-CRM1; GST-HuR; His-HuRGST-APRIL; GST-pp32; His-HuR; GST-Ran;**
- **GST-Rev:** Rev Protein von HIV-1.
- **GST-Rev-NES:** NES des Rev von HIV-1.
- **GST-PKI-NES:** NES von PKI.

- **eIF-5A-GFP-His:** eIF-5A aus Insektenzellen.
  - **GST-NS2-NES-GFP:** NES des NS2 Proteins aus dem Minute Maus Virus.
  - **GST-Rex-NES-GFP:** NES des Rex Proteins aus HTLV-1.
  - **GST-Rev-NES-GFP:** NES des Rev Proteins aus HIV-1.
  - **GST-E1B-NES-GFP:** NES des E1B Proteins aus Adenovirus Typ5.
  - **GST-p53-NES-GFP:** NES des p53 Tumor Suppressor Proteins.
- 
- **5S rRNA-Digoxigenin:** Oocyten-Typ 5S rRNA; Herstellung siehe Kap.3.6.9.

Die folgenden RNAs wurden freundlicherweise von Prof. J. Hauber, Erlangen, zur Verfügung gestellt.

- **RRE-RNA-<sup>32</sup>P:** Die Rev-Response-Element Sequenz aus HIV-1.
  - **RRE d SLII RNA-<sup>32</sup>P:** Die Rev-Response-Element Sequenz aus HIV-1 mit einem deletierten Stem LoopII.
  - **CTE RNA-<sup>32</sup>P:** Die Constitutive-Transport-Element Sequenz aus MPMV.
  - **CTE M2/M11 RNA-<sup>32</sup>P:** Die Constitutive-Transport-Element Sequenz aus MPMV mit einer Doppelmutation an den Stellen M2 und M11.
  - **HRE RNA:** Die HuR-Response-Element Sequenz der CD83 mRNA.
- 
- **HRE RNA-Digoxigenin; CTE RNA-Digoxigenin; CTE RNA; U6 RNA-<sup>32</sup>P**

Alle Proteine und RNAs wurden in den angegebenen Laboratorien generiert.

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle verwendeten RNAs bereits Einsatz-fertig geliefert. Im Falle der GST-gekoppelten Proteine, wurden diese entweder als gereinigte Proteine zur Verfügung gestellt oder als entsprechender Expressionsvektor geliefert. In diesem Fall wurden die Proteine exprimiert und gereinigt wie unter 3.2.9 beschrieben.



### 2.3 Chemikalien

Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel in Analysenqualität von folgenden Firmen bezogen:

- Merck (Darmstadt)
- Roth (Karlsruhe)
- Serva (Heidelberg)
- Sigma-Aldrich (Deisenhofen)

### 2.4 Material für die Zellkultur

- **Gewebekulturplatten:** Costar (Cambridge, USA)
- **Gewebekulturflaschen:** Greiner (Frickenhausen)
- **Pipetten:** Greiner (Frickenhausen)
- **Petrischalen:** Nunc (über Hartenstein, Würzburg)

Alle Medien und Zusätze wurden von Gibco (Eggenstein) bezogen.

### 2.5 Geräte

Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank, CO <sub>2</sub> -Auto-Zero	Heraeus, Frankfurt
Drehtisch, regelbar	Heidolph, über Hartenstein, Würzburg
Drystar Geltdrockner	H. Hölzl GmbH, über Hartenstein, Würzburg
Elektrophorese System	BIO-RAD, München
Elektronenmikroskop Zeiss EM10	Zeiss, Oberkochen
Feinwaage A1 100	Mettler, Gießen
Fluoreszenzmikroskop Axiophot Stereo	Zeiss, Oberkochen
	HB050 mit Quecksilberlampe
Graphit-Blotkammer	LMS, über Hartenstein, Würzburg

---

Heizblock	Liebisch, über Hartenstein, Würzburg
Homogenisator RW20	Janke & Kunkel, über Hartenstein, Würzburg
Kühlzentrifugen	Eppendorf, Hamburg
Minifuge RF	Heraeus-Christ, Osterode
Kippschüttler WS5	Edmund Bühler, Tübingen
Kühlzentrifuge RC5B	Sorvall, Du Pont, Bad Homburg
Kryostat-Mikrotom 2800 Frigocut	Reichert-Jung, Nußloch
Mikroschmiede	Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
Mikromanipulator	Brinkmann Instrumentenbau, Mannheim
pH-Meter pH 523	WTW, über Hartenstein, Würzburg
Proteingelkammer Mini V8	Gibco BRL
Spectrophotometer UVIKON 710	Kontron Instruments GmbH, Neufahrn
Stabilisiertes Netzgerät	Fischer, Heidelberg
Sterile Werkbank, Gelaire	Flow, Köln
Sonifier B12	Branson Sonic Power Company, über Gerhard Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Thermocycler TECHNE PROGENE	über Thermo-Dux, Wertheim
Thermostat 5322	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 3k30 kühlbar	Sigma, Deisenhofen
Tischzentrifuge Biofuge A	Heraeus-Christ, Osterode
Ultramikrotom	RMC, Tuson, USA
Umkehrmikroskop IM 35	Zeiss, Oberkochen
UV Stratalinker	Stratagene EUROPE, Amsterdam, Holland
Vertical Elektrophorese System	Gibco-BRL, Eggenstein
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich
Wasseraufbereitung Milli-Q UF plus	Millipore, Heidelberg
Wasserbad	Köttermann, über Hartenstein, Würzburg

## 2.6 Fotomaterial

Zum Fotografieren von Gelen, Nitrozellulosefiltern und Röntgenfilmen wurden Agfa Pan 25 B&W-Filme (Agfa.Gevaert, Leverkusen) benutzt. Die Filme wurden mit Agfa Rodinal Negativentwickler entwickelt und mit Tetenal Schnellfixierbad (Tetenal Fixiersalz, Tetenal Photowerk, Norderstedt) fixiert.

Für Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahmen wurden Ilford HP-5 PLUS Filme mit einer Empfindlichkeit von 1600 ASA belichtet, mit dem Zweikomponentenentwickler Diafine (Fa. Amfine, Chikago, Illinois, USA) entwickelt und mit Tetenal Schnellfixierbad fixiert.

Von den Negativen wurden Positivabzüge mit Hilfe eines Vergrößerungsapparates (Focomat, Durst, Brixen) hergestellt. Dabei wurde Fotopapier der Härte 1-5 (Brovira Speed, Agfa, Leverkusen) benutzt. Die Abzüge wurden mit Neutol Positiventwickler (Agfa) entwickelt und in Tetenal Fixierbad (Tetenal Fixiersalz, Tetenal Photowerk, Norderstedt) fixiert.

Fotos wurden mit Hilfe eines Flachbett-Scanners von Hewlett Packard (Scan Jet 4c), Negative mit einem Dia-Scanner von Polaroid (SprintScan 35/LE) aufgenommen, ggf. mit der Fotobearbeitungssoftware Adobe Photoshop 6 (Adobe Systems Inc., Kanada) bearbeitet, zusammengestellt und in die Arbeit integriert.

### 3. Methoden

#### 3.1 Mikroinjektion in *Xenopus laevis* Oocyten

##### 3.1.1 Präparation der Oocyten

###### Lösungen:

MS 222 (3-Aminobenzoesäure-ethylester-methansulfonat):

0,2% in Leitungswasser

Barth-Medium:

90mM NaCl

1mM KCl

0,8mM MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O

0,3mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O

0,4mM CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O

2mM NaHCO<sub>3</sub>

10mM Hepes

pH 7,6 eingestellt mit NaOH (als pH-Indikator wurde

Phenolrot zugegeben)

Weibliche *Xenopus laevis* Frösche wurden in MS 222 betäubt und auf Eis gelegt. Mit einem kleinen Schnitt wurde die Bauchhöhle geöffnet. Durch diese Öffnung wurden Ovarstückchen entnommen und in Barth-Medium gelagert. Die Wunde wurde wieder genäht und die Frösche konnten, nach dem Aufwachen, zurück in ein Zuchtbecken gegeben werden. Die Oocyten wurden, bis zur weiteren Verwendung, für maximal 2 Tage, in Barth-Medium gelagert.

In einigen Fällen wurden Oocyten aus Fröschen verwendet, die vorher zum Ablachen gebracht wurden. Dazu wurden weibliche *Xenopus laevis* 4 Tage vor Versuchsbeginn mit 100 U Choriongonadotropin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) gespritzt. Nach zwei Tagen wurde den Fröschen 1000 U Choriongonadotropin injiziert und diese wurden dann in ein Bassin, das mit 0,1 M NaCl in Leitungswasser gefüllt war, zum Ablachen gesetzt. 24h nach dem Ablachen wurde diesen Fröschen dann, wie oben beschrieben, Ovar entnommen.

### 3.1.2 Mikroinjektion in den Kern von *Xenopus* Oocyten

<u>Injiziertes Material</u>	<u>Konzentration</u>
<b>• Proteine:</b>	
GST-Rev-NES	0,1mg/ml
GST-PKI-NES	0,1mg/ml
GST-eIF-5A	0,5mg/ml
GST-eIF-5A-M14	0,5mg/ml
eIF-5A-GFP-His	1,3mg/ml
eIF-5A-wt	1mg/ml
GST-NS2-NES-GFP	0,5mg/ml
GST-Rex-NES-GFP	0,5mg/ml
GST-Rev-NES-GFP	0,5mg/ml
GST-E1B-NES-GFP	0,5mg/ml
GST-p53-NES-GFP	0,5mg/ml
GST-HuR	1,3mg/ml
GST-APRIL	1mg/ml
GST-pp32	1mg/ml
GST-TFIIIA-NES	0,5mg/ml
Latrunculin B	3mM
Swinholide A	3mM
BSA	1mg/ml
GST	1,3mg/ml
IgM	1mg/ml
IgG	0,5mg/ml
<b>• RNA:</b>	
RRE-RNA- <sup>32</sup> P	0,6μM, 0,8-1,0 x 10 <sup>6</sup> cpm
U6 RNA- <sup>32</sup> P	0,6μM, 0,8-1,0 x 10 <sup>6</sup> cpm
RRE Δ SLII RNA- <sup>32</sup> P	0,6μM, 0,8-1,0 x 10 <sup>6</sup> cpm
CTE RNA- <sup>32</sup> P	0,6μM, 0,8-1,0 x 10 <sup>6</sup> cpm
CTE M2/M11 RNA- <sup>32</sup> P	0,6μM, 0,8-1,0 x 10 <sup>6</sup> cpm

CTE RNA-Digoxigenin	1mg/ml
CTE RNA	1mg/ml
HRE RNA	1mg/ml
HRE RNA-Digoxigenin	1mg/ml
5S rRNA-Digoxigenin	1mg/ml

• **Antikörper:**

anti-eIF-5A	0,5mg/ml
anti-Aktin mAB 2G2	1mg/ml
anti-TGase	1mg/ml

Im Falle einer Bindung exogener Substrate an die jeweiligen Exportfaktoren, fand vor der Mikroinjektion eine Inkubation für 1h auf Eis statt. Dabei wurde der Exportfaktor immer mit einer 10fachen Menge an Substrat inkubiert, das binden sollte.

Bei der Mikroinjektion von Antikörpern wurde, in den parallelen Kontrollversuchen, das jeweils entsprechende unspezifische IgG bzw. IgM in der gleichen Konzentration injiziert.

BSA ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 68kDa. Da es weder ein Kernimport- noch ein Kernexportsignal besitzt, diffundiert es, aufgrund seiner Größe, nur extrem langsam aus dem Kern (5% in 24h) (Bonner, 1978). Grundsätzlich wurde bei allen Mikroinjektionen BSA, mit einer Konzentration von 1mg/ml, coinjiziert. Dies diente zur Kontrolle, ob das jeweilige Kompartiment, in das injiziert wurde, auch getroffen wurde.

Bei einigen RNA Injektionen wurde als interne Kontrolle der Kerninjektion auch <sup>32</sup>P-markierte U6 RNA injiziert, mit einer Konzentration von 0,6µM, 0,8-1,0 x 10<sup>6</sup> cpm.

Vor der Injektion wurden die Oocyten mit Hilfe von Uhrmacherpinzetten defollikuliert und anschließend 20-40min bei 600xg, 16°C und mit Bremse 2 zentrifugiert. Die Oocyten wurden, mit dem animalen Pol nach oben zeigend, in dafür vorgesehene Plastikschrälchen mit Gittereinsatz plziert. Durch die Zentrifugalkraft wurden die schweren Bestandteile des Cytoplasmas nach unten gedrückt und der Zellkern, der in Oocyten schon in der Nähe des

animalen Pols liegt, wurde ganz nach oben verschoben, so daß er auf dem animalen Pol als dunkler Kreis sichtbar wurde.

Injektionsnadeln wurden mit einer Mikroschmiede selbst gezogen und so geeicht und markiert, daß man eine Menge von ~25nl in den Kern injizieren konnte. Die Eichung ist besonders wichtig, da bei einem größeren Volumen der Kern platzt.

Die Mikroinjektion wurde unter einem Stereomikroskop mit einem Mikromanipulator durchgeführt. In der Regel wurden jeweils 20-30 Oocyten mit der gleichen Probe injiziert.

Nach der Injektion wurden die Oocyten für 30min - 48h, je nach injiziertem Substrat, bei 16°C in Barth-Medium inkubiert. Anschließend erfolgte eine manuelle Trennung von Kern und Cytoplasma (siehe 3.1.5). In einigen Experimenten erfolgte eine zweite Injektion in den Kern oder in das Cytoplasma. Nach einer zweiten Injektion wurde erneut für 30min-2h inkubiert und danach wurden Kerne und Cytoplasma manuell getrennt.

### 3.1.3 Mikroinjektion in das Cytoplasma von *Xenopus* Oocyten

<u>Mikroinjiziertes Material</u>	<u>Konzentration</u>
eIF-5A-wt	0,5mg/ml
eIF-5A-M14	0,5mg/ml
GST-HuR	1,3mg/ml
BSA	1,5mg/ml

Prinzipiell entspricht die Methode der Mikroinjektion in den Kern, jedoch brauchen die Oocyten vor der Injektion nicht zentrifugiert zu werden. Da ins Cytoplasma eine größere Menge injiziert werden kann, wurden die Nadeln vorher so geeicht, daß 50nl pro Oocyte injiziert werden konnten. Auch hier wurde BSA als Injektionskontrolle coinjiziert. Nach der Injektion in das Cytoplasma wurden die Oocyten für 2h in Barth-Medium inkubiert und anschließend manuell in Kerne und Cytoplasma getrennt (siehe 3.1.5).

### 3.1.4 Inkubation der Oocyten mit Leptomycin B bzw. Actinomycin D vor der Mikroinjektion

In einigen Experimenten wurden Oocyten vor der Injektion mit der Droge Leptomycin B (LMB) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) oder mit der Droge Actinomycin D (ActD) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) inkubiert. Dazu wurden die Oocyten für 1h in Barth-Medium mit einer Konzentration von 20nM der jeweiligen Droge gegeben und bei 16°C darin inkubiert. Auch nach der Injektion kamen die Oocyten wieder in dieses Medium und verblieben dort bis zur manuellen Trennung von Kern und Cytoplasma (siehe 3.1.5). In parallelen Kontrollexperimenten wurden die Oocyten in Barth-Medium ohne Zusätze gehalten.

### 3.1.5 Manuelle Trennung von Kern und Cytoplasma

#### Lösungen:

3:1-Medium:                      4mM NaCl  
   12mM KCl  
   3mM Tris-HCl, pH 7,4

Die Oocyten wurden zur Trennung von Kern und Cytoplasma in 3:1-Medium überführt. Mit Uhrmacherpinzetten wurden diese dann vorsichtig aufgerissen und die Kerne freigelegt. Im Falle einer Protein-Analyse wurden die Kerne sofort in kaltes Ethanol p.a. überführt, in dem die Proteine für mindestens 2h bei -20°C gefällt wurden.

Das Cytoplasma wurde in ein Eppendorf-Cap überführt und durch auf- und abpipettieren homogenisiert. Anschließend wurde dieses in einer Tischzentrifuge bei 11000xg für ca. 5min sedimentiert, um unlösliche Bestandteile, wie z.B. Dotterschollen, zu entfernen. Der Überstand, in dem sich die löslichen Proteine befinden, wurde in das 6fache Volumen Aceton p.a. überführt, in dem die Proteine für mindestens 2h bei -20°C gefällt wurden.

Im Falle einer RNA-Analyse wurden Kerne und Cytoplasma in PeqGold Trifast überführt. Dabei wurden je 20 Kerne in 0,5ml Trifast und Cytoplasma aus 20 Oocyten in 5ml Trifast aufgenommen. Anschließend erfolgte die RNA Isolierung und Analyse wie unter 3.6.1 beschrieben.



## 3.2 Proteinbiochemische Methoden

### 3.2.1 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteingemische wurden unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelsystem, in Gegenwart von SDS, eindimensional d.h. nach einem apparenten Molekulargewicht getrennt.

Es wurde das Gel- und Puffersystem nach Thomas und Kornberg (1975), mit einer Acrylamidkonzentration von 18% bzw. 12% verwendet. Die Proteine wurden mit einem Minigel-System oder einem großen Gelsystem getrennt.

#### Lösungen:

- A: 30% Acrylamid-Bis-Lösung für das Trenngel:  
30g Acrylamid + 0,15g Bis (N,N'-methylendiacylamid) auf 100ml dH<sub>2</sub>O
- A': 30% Acrylamid-Bis-Lösung für das Sammelgel (nach Laemmli, 1970):  
30g Acrylamid + 0,8g Bis auf 100ml dH<sub>2</sub>O
- B: Trenngelpuffer:  
3M Tris-HCl, pH 8,8, 0,4% SDS
- C: Sammelgelpuffer:  
0,75M Tris-HCl, pH 6,8, 0,4% SDS
- D: 10% Ammoniumperoxodisulfat-Lösung in dH<sub>2</sub>O (APS)
- E: Elektrophoresepuffer:  
50mM Tris, 0,38M Glycin, 0,1% SDS, pH 8,8
- F: Färbelösung:  
0,1% Serva Blau R 250 (entspricht Coomassie Brilliant Blue), 20% Methanol, 7,5% Essigsäure

G: Entfärbelösung:  
20% Methanol, 7,5% Essigsäure

H: Probenpuffer (nach Laemmli, 1970):  
60mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% Glycerin, 5% SDS, 10%  $\beta$ -Mercaptoethanol

### 3.2.1.1 Herstellung der Gele

#### Minigele:

##### Zusammensetzung des Trenngels

	18%	12%
A	6ml	4ml
B	2,5ml	2,5ml
dH <sub>2</sub> O	1,4ml	3,4ml
TEMED	3,33 $\mu$ l	3,33 $\mu$ l
APS	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l

##### Zusammensetzung des Sammelgels

	18% und 12%
A'	0,65ml
C	1,25ml
dH <sub>2</sub> O	3,1ml
TEMED	5 $\mu$ l
APS	150 $\mu$ l

#### große Gele:

##### Zusammensetzung des Trenngels

	18%	12%
A	24ml	16ml
B	10ml	10ml
dH <sub>2</sub> O	5,7ml	13,7ml
TEMED	13,33 $\mu$ l	13,33 $\mu$ l
APS	400 $\mu$ l	400 $\mu$ l

##### Zusammensetzung des Sammelgels

	18% und 12%
A'	1,3ml
C	2,5ml
dH <sub>2</sub> O	6,2ml
TEMED	10 $\mu$ l
APS	300 $\mu$ l

Die Glasplatten wurden zunächst mit Ethanol gereinigt und zusammengesetzt. Da es für das Minigel-System keine unteren Spacer gibt, wurden die Glasplatten von außen mit Tesafilm

abgeklebt und von innen mit 0,5% Agarose abgedichtet, so daß eine Schicht von etwa 2mm entsteht. Die seitlichen Spacer wurden von außen mit 0,5% Agarose abgedichtet.

Die Trenngellösung wurde gut gemischt und sofort zwischen die Glasplatten bis zu einer Höhe von etwa 5cm gegossen. Anschließend wurde das Trenngel mit dH<sub>2</sub>O überschichtet, um einen gleichmäßigen Abschluß der Polymerisationsgrenze zu erreichen. Nach der Polymerisation des Trenngels, nach ca. 30min, wurde das Wasser entfernt und das Sammelgel darüber gegossen. Sofort nach dem Gießen wurde der Kamm (13 Taschen) luftblasenfrei eingesetzt. Dieser wurde nach vollständiger Polymerisation wieder vorsichtig entfernt.

### 3.2.1.2 Vorbereitung und Auftragen der Proben

Die in Aceton gefällten cytoplasmatischen Proteine und die in Ethanol gefällten Kernproteine wurden für 20min bei 4500xg und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet getrocknet, in 10µl Probenpuffer H für ein Minigel bzw. in 50µl Probenpuffer H für ein großes Gel aufgenommen und 5min bei 95°C erhitzt. Die Proben wurden bei -70°C gelagert, oder sofort auf das Gel aufgetragen. Das maximale Auftragsvolumen betrug 20µl pro Tasche im Minigel-System und 100µl bei einem großen Gel.

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes wurden folgende Referenzproteine parallel zu den Proben aufgetragen (High- und Low-Marker BIO-RAD, München, 1:14 in Probenpuffer):

• <b>High-Marker:</b>	Myosin	MG 200.000
	β-Galactosidase	MG 116.250
	Phosphorylase B	MG 97.400
	BSA	MG 66.200
	Ovalbumin	MG 42.700
• <b>Low-Marker:</b>	Phosphorylase B	MG 97.400
	BSA	MG 66.200
	Ovalbumin	MG 42.700
	Karbonat-Anhydrase	MG 31.000
	Trypsin-Inhibitor	MG 21.500
	Lysozym	MG 14.300

Zur Markierung der Lauffront wurde in leere Taschen Bromphenolblau in Probenpuffer pipettiert.

### **3.2.1.3 Elektrophorese**

Die mit Elektrophoresepuffer (Lösung E) gefüllte Kammer wurde an ein stabilisiertes Netzgerät angeschlossen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 40mA. Beendet wurde sie, wenn die Lauffront etwa 0,5mm vor dem unteren Ende der Glasplatte angekommen war.

Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel an einer Ecke markiert, um das Beladungsschema nachvollziehen zu können.

Anschließend wurde das Trenngel entweder für den Immunblot weiter verwendet (siehe 3.3.4), mit Coomassie gefärbt oder mit Silber (siehe 3.2.6).

### **3.2.1.4 Coomassie-Färbung**

Für eine Anfärbung der Proteine in einem Gel wurde dieses für 2h in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation ÜN, in Coomassie-Entfärbelösung, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren und der Hintergrund des Geles entfärbt war.

### **3.2.2 2-Dimensionale Gelelektrophorese (NEPHGE)**

Die 2-Dimensionale Gelelektrophorese erfolgte im Wesentlichen wie von O'Farrell et al. (1977) beschrieben. Die Proteine werden dabei in der 1. Dimension, ohne vorherige Denaturierung, durch einen pH-Gradienten nach ihrem isoelektrischen Punkt und in der 2. Dimension, unter denaturierenden Bedingungen, nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Nichtgleichgewichts-pH Gradienten Gelelektrophorese in der 1. Dimension (NEPHGE) wird vorwiegend zur Auftrennung sehr basischer Proteine verwendet. Die Proteine wandern von der Anode zur Kathode, ohne jedoch ihren isoelektrischen Punkt zu erreichen. Die Elektrophorese wird vor dem Erreichen des Gleichgewichtszustandes abgebrochen. Als Marker der Lauffront wird das extrem basische Protein Cytochrom c (IEP>11) eingesetzt.

Lösungen:

I1 (Lysispuffer 1):	9,5M Harnstoff 0,5% SDS 5% $\beta$ -Mercaptoethanol 2% Ampholine pH 2-11 (Serva, Heidelberg)
I2 (Lysispuffer 2):	9,5 M Harnstoff 5% (w/w) Nonidet P40 (NP40) 5% $\beta$ -Mercaptoethanol 2% Ampholine pH 2-11 (Serva, Heidelberg)
J (Überschichtungspuffer):	6M Harnstoff 5% (w/w) Nonidet P40 1% Ampholine pH 2-11 (Serva, Heidelberg)
K (30% Acrylamid-Bis-Lsg):	28,38g Acrylamid 1,62g Bis auf 100ml dH <sub>2</sub> O
L (10% Nonidet P40):	10g NP40 auf 100ml dH <sub>2</sub> O
M (Anoden-Elektrophoresepuffer):	10mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
N (Kathoden-Elektrophoresepuffer):	20mM NaOH
O (SDS-Probenpuffer für 2.Dimension):	60mM Tris-HCl, pH 6,8 2% SDS 5% $\beta$ -Mercaptoethanol 10% Glycerin

### Silikonisieren der Glasröhrchen:

Glasröhrchen ( $\varnothing$  innen 2mm) in einem Meßzylinder wurden mit Silikonisierungslösung (Serva) übergossen. Nach dem Verwerfen der Lösung wurde der Meßzylinder mit Alufolie verschlossen und die Röhrchen wurden für 1h bei 80°C getrocknet.

Die Rundgele wurden in silikonisierten Glasröhrchen gegossen, die vor dem Einfüllen mit einigen Lagen Parafilm an einer Seite dicht verschlossen wurden. Die Lösung wurde mit einer langen Pasteurpipette bis zu einer Höhe von ca. 13cm eingefüllt.

Zusammensetzung des Rundgeles (Ausreichend für 12 Gele):

- 5,5g Harnstoff
- 1,33ml Lösung K
- 2ml Lösung L
- 2ml dH<sub>2</sub>O
- 0,5ml Ampholine pH 2-11 (Serva, Heidelberg)
- 15 $\mu$ l 10% APS
- 10 $\mu$ l TEMED

Ampholine, APS und TEMED wurden dazugegeben, nachdem der Harnstoff auf einer Heizplatte vollständig gelöst wurde. Zur gleichmäßigen Polymerisation der Geloberfläche wurden die Gele mit dH<sub>2</sub>O überschichtet. Für die Elektrophorese wurde der Parafilm an einem Ende der Röhrchen durch Gaze ersetzt, um ein Herausgleiten der Gele aus den Röhrchen zu verhindern. Die Röhrchen wurden dann in einer Elektrophoresekammer für Rundgele eingesetzt. Die untere Kammer wurde mit Lösung N und die obere mit Lösung M aufgefüllt.

#### **3.2.2.1 Vorbereitung der Proben**

Die in Probenpuffer H für die 1-D Gelelektrophorese gelösten Proben (siehe 3.2.1) wurden mit 6 Volumina Aceton p.a. für mindestens 3h bei -20°C gefällt. Danach wurden die Proben zentrifugiert, und zweimal mit 90% Aceton p.a. gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in Lysispuffer 1 (I1) aufgenommen und gelöst. Anschließend wurde eine gleiche Menge Lysispuffer 2 (I2) zugegeben, die Probe wurde auf das Gel aufgetragen und mit 20 $\mu$ l Lösung J überschichtet. Mit Lösung M wurde dann das Röhrchen bis zum oberen Rand gefüllt. Auf ein

separates Rundgel, das auch zur Messung der pH Werte diente, wurde Cytochrom c als Farbmarker aufgetragen.

Elektrophoresebedingungen:

- obere Kammer: Anode (+)
- untere Kammer: Kathode (-)
  
- 15min 200V
- 30min 300V
- 45-90min 400V

Die Elektrophorese wurde nach 6-7cm, gemessen vom oberen Gelrand, gestoppt. Mit einer, mit Wasser gefüllten, Spritze wurden die Gele aus dem Röhrchen herausgedrückt und der untere Abschnitt entfernt. Die Gele mit den Proben wurde für 20min in Lösung Q äquilibriert. Nach dem Entfernen der Lösung konnten die Gele bei -20°C eingefroren werden oder für die zweite Dimension weiterverwendet werden.

Das Gel ohne Probe, das zur Messung des pH Gradienten im Rundgel diente, wurde in 0,5cm Stücke geschnitten, die dann über Nacht in 5ml dH<sub>2</sub>O gegeben wurden, so daß die Ampholine aus dem Gel herausdiffundieren konnten. Am nächsten Tag konnte dann der pH Wert jeder Probe gemessen werden.

### **3.2.2.2 Zweite Dimension: SDS-Polyacrylamid-Flachgele**

Die zweite Dimension entspricht im Wesentlichen der unter 3.2.1 beschriebenen eindimensionalen Gelelektrophorese, mit dem Unterschied, daß das Sammelgel bis zum oberen Glasrand gegossen wird. Die Rundgele wurden dann mit Lösung O enthaltender Agarose auf diesem befestigt.

Elektrophorese-Bedingungen:

- 100V bis die Lauffront das Trenngel erreicht hat
- 200V bis zum Ende

Anschließend wurden die Gele für einen Immunblot weiterverwendet (siehe 3.3.4) oder Silber gefärbt (siehe 3.2.6).

### 3.2.3 2-Dimensionale Gelelektrophorese (IEF)

Im Gegensatz zum NEPHGE, bei dem Proteine nur ihren ungefähren pH Wert erreichen, baut sich bei der Isoelektrischen Fokussierung ein ganz genau definierter pH-Gradient auf, in dem sich die Proteine ganz definiert, entsprechend ihres isoelektrischen Punktes, anordnen.

#### Lösungen:

Die Lösungen K, L und O sind die Gleichen, die auch bei NEPHGE verwendet werden (siehe 3.2.2). Ebenso die Lösungen M und N, wobei M hier der Kathodenpuffer ist und N der Anodenpuffer.

Die restlichen Lösungen unterscheiden sich hauptsächlich durch die eingesetzten Ampholine von den Lösungen des NEPHGE.

I' (Lysispuffer):  
9,5M Harnstoff  
2% NP40  
5%  $\beta$ -Mercaptoethanol  
0,8% Ampholine pH 4-6  
0,8% Ampholine pH 5-7  
0,4% Ampholine pH 2-11

J' (Überschichtungspuffer):  
6M Harnstoff  
0,4% Ampholine pH 4-6  
0,4% Ampholine pH 5-7  
0,2% Ampholine pH 2-11

M' (Kathoden-Elektrophoresepuffer): 10mM  $H_3PO_4$

N' (Anoden-Elektrophoresepuffer): 20mM NaOH



Zusammensetzung des Rundgeles (ausreichend für 10 Gele):

- 5,5g Harnstoff
- 1,33ml Lösung K
- 2ml Lösung L
- 2ml dH<sub>2</sub>O
- 0,2ml Ampholine pH 4-6
- 0,2ml Ampholine pH 5-7
- 0,1ml Ampholine pH 2-1
- 25µl 10% APS
- 15µl TEMED

Das Silikonisieren der Glasröhrchen und das Gießen der Rundgele erfolgte wie unter 3.2.2 beschrieben. Die Röhrchen wurden in eine Elektrophoresekammer für Rundgele eingesetzt. Die untere Kammer wurde mit Lösung M' und die obere mit Lösung N' aufgefüllt.

### 3.2.3.1 Vorelektrophorese

Zur Einstellung des pH-Gradienten im Gel wird eine Vorelektrophorese durchgeführt. Dazu werden die Rundgele mit 20µl Lösung I' beladen und mit 20µl Lösung J' überschichtet. Danach werden die Röhrchen, ebenso wie die obere Elektrophoresekammer, bis zum oberen Rand mit Lösung N' aufgefüllt.

Elektrophoresebedingungen:

- obere Kammer: Kathode (-)
- untere Kammer: Anode (+)
  
- 30min 200V
- 30min 300V
- 60min 400V

Nach der Vorelektrophorese wird der Kathodenpuffer abgesaugt, die Lösungen I' und J' von den Rundgelen abgezogen, und die Oberfläche der Rundgele wird mit dH<sub>2</sub>O gespült.

### 3.2.3.2 Vorbereitung der Proben

Die Proben werden, wie unter 3.2.2.1 beschrieben, vorbereitet. Jedoch wird das getrocknete Proteinpellet nach dem Waschen in 30-60µl Lösung I' aufgenommen und auf das Gel aufgetragen. Die Probe wird dann mit 20µl Lösung J' überschichtet und die Röhren werden mit Lösung N' bis zum oberen Rand gefüllt.

Auch hier wird parallel, für die spätere pH-Messung ein Rundgel ohne Proben, nur mit Lösung I' und J' beladen.

#### Elektrophoresebedingungen:

- obere Kammer: Kathode (-)
- untere Kammer: Anode (+)
  
- 16-18h 400V

### 3.2.3.3 Zweite Dimension: SDS-Polyacrylamid-Flachgele

Die zweite Dimension erfolgt Analog zu der, unter 3.2.2.2 beschriebenen, Methode.

### 3.2.4 Silberfärbung von Proteingelen

Die Silberfärbung von Proteinen wurde nach einer modifizierten Methode von Blum et al. (1987) durchgeführt.

#### Lösungen:

Na-Thiosulfat-Lösung: 43g Na-Thiosulfat auf 100ml dH<sub>2</sub>O

AgNO <sub>3</sub> -Lösung:	2g auf 1L dH <sub>2</sub> O
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -Lösung:	60g auf 1L dH <sub>2</sub> O
Fixierlösung:	50% Methanol 12% Eisessig
Lösung 1:	50% Ethanol
Lösung 2:	30% Ethanol
Imprägnierlösung:	300ml dH <sub>2</sub> O 200µl 37% Formalin 150µl Na-Thiosulfat-Lösung
Silberfärbelösung:	300ml AgNO <sub>3</sub> -Lösung 200µl 37% Formalin
Reduktionslösung:	300 ml Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -Lösung 150µl 37% Formalin 3µl Na-Thiosulfat-Lösung

Vor der eigentlichen Silberfärbung wurden die Proteine mit Coomassie angefärbt (siehe 3.2.1.4). Diese Vorfärbung reduziert deutlich die Hintergrundfärbung.

Danach wurde das zu färbende Gel unter Schütteln ÜN in Fixierlösung inkubiert. Wenn nötig, kann die Zeit auch auf 3-4h verkürzt werden, wobei jedoch wiederholtes Wechseln der Fixierlösung nötig ist. Danach erfolgte eine je 20min Inkubation, zuerst in Lösung 1, dann in Lösung 2, wobei der Wassergehalt des Geles langsam erhöht wird. Nach Entfernen des Methanols, wurde das Gel in Imprägnierlösung für genau 1min unter kräftigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde es für 3 x 1min in dH<sub>2</sub>O gewaschen. Durch die darauffolgende Inkubation mit der Silberfärbelösung für 20min-1h wurde das Gel mit den Silberionen getränkt. Überflüssige Silberionen wurden durch anschließendes 2maliges Waschen für je 30sec entfernt. Nach dem Waschen erfolgte der eigentliche Färbeschritt. Dabei mußte das

Waschwasser sorgfältig entfernt werden. Nach Zugabe von 150ml der Reduktionslösung und kräftigem, kurzen Schütteln fällt ein rotbrauner Niederschlag aus, der aus zu Silbercarbonat reduziertem Silber besteht. Nach etwa 30sec wurde diese Lösung durch 150ml frische Reduktionslösung ersetzt. Die Proteine erscheinen nun zunächst als hellbraune Flecken, die langsam dunkelbraun bis schwarz werden. Die Reduktion wurde abgebrochen, als sich der Hintergrund des Geles gelblich zu färben begann. Nach dem Absaugen der Reduktionslösung wurde das Gel 2x in dH<sub>2</sub>O gewaschen und die Silberreduktion endgültig abgebrochen, durch 2x 15min Inkubation in Fixierlösung.

Anschließend konnten die Gele im Durchlicht fotografiert oder direct eingescannt werden.

### 3.2.5 Herstellung Massenisolierter Kerne aus *Xenopus laevis* Oocyten

Die Isolierung von Oocytenkernen in größeren Mengen wurde im Wesentlichen nach der von Scalenghe et al. (1978) beschriebenen Methode, mit einigen Modifikationen (Kleinschmidt & Franke, 1982) durchgeführt.

#### Lösungen:

Collagenase-Lösung:	0,2% Collagenase (Typ I, Sigma-Aldrich) in OR 2
Pronase-Lösung:	2,5mg Pronase (65000 PUK/g; Boehringer, Mannheim) pro ml MBSH
OR 2 ohne Ca <sup>++</sup> :	87mM NaCl 2,5mM KCl 1mM MgCl <sub>2</sub> 1mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O 5mM HEPES 1,2 x 10 <sup>-2</sup> mM Polyvinylpyrolidon (PVP40: Sigma-Aldrich) pH 7,8 eingestellt mit 1N NaOH
Eagles-Lysis-Medium:	1,94g Eagles Minimum Medium (Flow, Meckenheim)

	1ml 1M Tris-HCl, pH 7,4
	0,4ml NP40
	0,336g NaHCO <sub>3</sub>
	in 200ml ddH <sub>2</sub> O
BSA-Lösung:	16g BSA in 800ml MBSH
MBSH:	88mM NaCl
(modifiziertes Barth's Medium, Colman,1974)	1mM KCl
	2,4 mM NaHCO <sub>3</sub>
	0,8mM MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
	0,4 CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
	10mM HEPES
	0,33mM Ca(NO <sub>2</sub> ) x 4 H <sub>2</sub> O
	pH 7,4 eingestellt mit 1N NaOH
"5:1" -Kernisolutionsmedium:	83mM KCl
	17mM NaCl
	10mM Tris-HCl, pH 7,4
	2mM MgCl <sub>2</sub>
	0,5mM PMSF
Zuckerlösung:	0,1M Saccharose
	2,5mM DTT
	in "5:1" -Kernisolutionsmedium

Die optimale Ausgangsmenge für eine Isolation waren 60-90ml Ovar. Dies wurde *Xenopus laevis* Fröschen, wie unter 3.1 beschrieben, entnommen. Jedoch wurde das Ovar hier direkt in MBSH gegeben und mehrmals darin gewaschen. Die Ovarien wurden mit einer Schere in kleine Stücke von ca. 30 Oocyten geschnitten und anschließend in OR 2-Lösung gewaschen. Nach Bestimmung des Volumens wurden die Ovarstücke gleichmäßig auf 3 1L-Erlenmeyerkolben mit großer Grundfläche verteilt. Pro ml Ovar wurden 5ml Collagenase-

Lösung zugesetzt und die Ovarstückchen wurden im Schüttelwasserbad bei 28°C für 2-3h inkubiert. Der Verdau wurde beendet, als alle Oocyten vereinzelt waren. Die Collagenase-Lösung, die wiederholt verwendet werden kann, wurde dekantiert und bei -20°C eingefroren. Die vereinzelt Oocyten wurden mehrmals in MBSH-Lösung gewaschen, um Bindegewebsstücke sowie junge Oocyten zu entfernen. Anschließend wurde erneut das Volumen der Stadium IV-VI Oocyten bestimmt, das in der Regel um 20-30% gegenüber dem Ausgangsvolumen reduziert war. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die gewaschenen Oocyten wurden zu gleichen Teilen auf 3 Plastikröhrchen (50ml Volumen) verteilt, und pro ml Oocyten wurde 1ml Pronase Lösung zugegeben. Die Inkubation erfolgte auf Eis, wobei die Röhrchen wiederholt vorsichtig gedreht wurden. Nach etwa 25-40min, nachdem die Oocyten abgeflacht waren und sich Schlieren am Rand gebildet hatten, wurde der Verdau beendet. Die Pronase-Lösung wurde abgesaugt und die Oocyten 8x mit je 100ml BSA-Lösung gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die BSA-Lösung vollständig abgesaugt. Ausgehend vom Volumen des Pronase Verdaus wurden pro ml Oocyten 2,5ml Eagles-Lysis-Medium zugegeben und die Oocyten wurden gleichmäßig auf zwei Spritzen verteilt.

Die Spritzen wurden, auf Eis liegend, vorsichtig gedreht, bis die Oocyten lysiert waren und die Kerne an die Flüssigkeitsoberfläche stiegen. Die Spritzen wurden senkrecht gestellt und die Suspension mit den Kernen wurde vorsichtig zur Öffnung der Spritze hin gedrückt. Nachdem die Kerne an die Oberfläche aufgestiegen waren, wurden sie vorsichtig mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze abgezogen. Je 500µl der abgesammelten Kernsuspension wurde auf Saccharosekissen gegeben, von denen 50-70 Stück vorher folgendermaßen vorbereitet worden waren: In 30ml Glasröhrchen wurden 25ml Zuckerlösung eingefüllt und mit 3ml "5:1"-Medium mit einer Peristaltikpumpe überschichtet.

Kurze Zeit nach dem Austragen sanken die Oocytenkerne durch das Zuckerkissen und der im Auftrag verbliebene Dotter wurde vorsichtig abgesaugt. Sobald die Kerne zum Boden der Röhrchen gesunken waren, wurde die Zuckerlösung bis auf ca. 1ml abgesaugt und die Oocytenkerne wurden in möglichst kleinem Volumen gesammelt. Die Oocytenkerne wurden entweder sofort verwendet oder in absoluten Alkohol überführt und bei -20°C aufbewahrt.

### 3.2.6. Manuelle Isolierung von Kernhüllen

Die Methode zur manuellen Isolierung von Oocytenkernhüllen wurde von Krohne und Franke (1983) beschrieben.

#### Lösungen:

3:1 Medium mit MgCl <sub>2</sub>	4mM NaCl
	12mM KCl
	3mM Tris-HCl, pH 7,4
	7mM MgCl <sub>2</sub>

Weiblichen *Xenopus laevis* Fröschen wurde, wie unter 3.1.1 beschrieben, Ovar entnommen. Dies wurde in Barth-Medium gelagert. Vor Gebrauch wurden Oocyten defollikuliert und in 3:1 Medium mit MgCl<sub>2</sub> überführt. Mit Uhrmacherpinzetten konnten diese dann vorsichtig aufgerissen und der Kern dadurch freigelegt werden. Durch auf- und abpipettieren mittels einer speziellen, selbst hergestellten Pipette, deren Durchmesser an der Saugöffnung kleiner als ein Kern ist, konnten die Kerne aufgebrochen und Kerninhalt und Kernhülle getrennt werden.

### 3.2.7 Pull down

Bei Pull down Experimenten handelt es sich um Bindungsstudien in Lösung. Hierbei wird ein Protein an eine Matrix gebunden und mit anderen Proteinen inkubiert. Die gebundenen Proteine können dann durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunblot analysiert werden. Die Methode wurde im Wesentlichen, wie bei Yang et al. (1998) beschrieben, durchgeführt. Pull downs wurden mit Glutathion-Sepharose 4B (Pharmacia Biotech) als Matrix durchgeführt, an die dann GST-gekoppelte Proteine gebunden wurden.

#### Lösungen:

EP (Extraktionspuffer):	20mM HEPES
	0,25M Sucrose
	0,1M NaCl
	2,5mM MgCl <sub>2</sub>
	pH 7,2

PBS:                                140mM NaCl  
   2,6mM KCl  
   6,4mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O  
   1,4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
   pH 7,4

Oocytenextrakt:                Je 50 Oocyten pro Ansatz wurden in 100µl EP homogenisiert. Anschließend wurden diese für 10min bei 9000xg zentrifugiert. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde für den Pull down verwendet, das Pellet wurde verworfen.

Kernextrakt:                    Je 150 handisolierte Kerne (siehe 3.1.5) pro Ansatz wurden in 100µl EP homogenisiert und bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

H (Probenpuffer):              siehe 3.2.1

Pro Ansatz wurden 16,6µl Glutathion-Sepharose 4B in ein Eppendorf-Cap gegeben. Diese wurde dann durch Zugabe von 200µl PBS, vorsichtigem Durchmischen und anschließender Zentrifugation für 5min bei 500xg gewaschen. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt. Anschließend wurde die Sepharose durch Zugabe von 200µl EP, vorsichtigem Mischen und erneuter Zentrifugation für 5min bei 500xg äquilibriert. Der Überstand wurde erneut verworfen. Dann erfolgte die Bindung des GST-gekoppelten Proteins an die Matrix. Dazu wurden 20µl EP zu der Sepharose gegeben, sowie das zu bindende Protein. Die gebundenen Proteine und deren Konzentration sind unten angegeben. Nach einer Inkubation von 1h, während der die Lösung mehrmals vorsichtig durchmischt wurde, wurde die Lösung erneut zentrifugiert für 3min bei 500xg. Im Pellet befindet sich dann die Sepharose mit gebundenen Proteinen. Anschließend wurde die Sepharose 3 mal, mit je 100µl EP, durch Zentrifugation für 3min bei 500xg, gewaschen. Daraufhin erfolgte eine Absättigung der noch vorhandenen Bindungsstellen an der Sepharose durch Inkubation mit 3%BSA (100µl) für 30min. Nach erneutem 3 maligem Waschen der Sepharose mit EP, wurde diese mit Oocytenextrakt, Kernextrakt oder verschiedenen rekombinanten Proteinen inkubiert. Das, für jedes gebundene Protein entsprechende Inkubationsmaterial ist unten angegeben. Im Fall von Oocytenextrakt



oder Kernextrakt erfolgte eine Inkubation von 1h, im Falle einer Inkubation mit rekombinanten Proteinen erfolgte eine Inkubation von 2h bei 4°C. Auch hier wurde die Lösung, während der Inkubation, mehrmals vorsichtig durchmischt.

In einigen Experimenten wurde das, an die Sepharose gebundene Protein, vor der Inkubation mit Oocytenextrakt oder Kernextrakt mit der 10fachen Menge an rekombinatem eIF-5A-wt bzw. eIF-5A-M14 für 1h inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Sepharose für 5min bei 500xg zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die ungebundenen Proteine befinden, wurde mit 6 Volumina Aceton gefällt. Anschließend wurde die Sepharose 5x mit je 100µl EP gewaschen. Nach dem Waschen wurde das Sepharose Pellet mit den gebundenen Proteinen in Probenpuffer aufgenommen, resuspendiert und 5min bei 95°C denaturiert. Die gebundenen und ungebundenen Proteine wurden anschließend über Gelelektrophorese (siehe 3.2.1-3.2.3) aufgetrennt, und durch Immunblot (siehe 3.3.4) oder Silberfärbung analysiert (siehe 3.2.6).

Soweit nicht gesondert vermerkt, wurde der Versuch bei RT durchgeführt.

#### gebundenes Material

#### Inkubationsmaterial

- |                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| • <b>GST-eIF-5A-wt</b> (1µg/µl):  | Oocytenextrakt / Kernextrakt  |
| • <b>GST-eIF-5A-M14</b> (1µg/µl): | Oocytenextrakt  |
| • <b>GST-Rev-NES</b> (1µg/µl):    | Oocytenextrakt / eIF-5A-wt (5µg/µl) / eIF-5A-M14 (5µg/µl) / His-CRM1 (0,5µg/µl), RanGTP (1µg/µl)                |
| • <b>GST-TFIIIA</b> (1µg/µl):     | Oocytenextrakt  |
| • <b>GST-TFIIIA-NES</b> (1µg/µl): | Oocytenextrakt / eIF-5A-wt (5µg/µl) / eIF-5A-M14 (5µg/µl) / His-CRM1 (0,5µg/µl) / RanGTP (1µg/µl)               |
| • <b>GST-HuR</b> (1µg/µl):        | Oocytenextrakt / His-CRM1 (0,5µg/µl) / RanGTP (1µg/µl) / eIF-5A-wt (5µg/µl)                                     |
| • <b>GST-APRIL</b> (1µg/µl):      | Oocytenextrakt/ eIF-5A-wt (5µg/µl) / RanGTP (1µg/µl)  |
| • <b>GST-pp32</b> (1µg/µl):       | Oocytenextrakt/ eIF-5A-wt (5µg/µl) / RanGTP (1µg/µl)  |
| • <b>GST-PKI-NES</b> (1µg/µl):    | Oocytenextrakt  |
| • <b>GST</b> (1µg/µl):            | Oocytenextrakt / Kernextrakt / eIF-5A-wt (5µg/µl) / eIF-5A-M14 (5µg/µl) / His-CRM1 (0,5µg/µl) / RanGTP (1µg/µl) |

### 3.2.8 Overlay Blot Assay

Dieser Bindungsassay wurde in Anlehnung an Lounsbury et al. (1994) durchgeführt. Hierbei wurden zunächst Proteine der Kernhülle durch Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Anschließend folgte eine Inkubation dieser Kernhüllenproteine mit einem Fusionsprotein, um Bindungspartner dieses Proteins zu identifizieren.

#### Lösungen:

Renaturierungspuffer:        20mM MOPS  
                                      100mM Na-Acetat  
                                      5mM Mg-Acetat  
                                      0,25% Tween-20  
                                      10% (w/v) Magermilchpulver  
                                      5mM DTT  
                                      pH 7,1

Bindungspuffer:                20mM MOPS  
                                      100mM K-Acetat  
                                      5mM Mg-Acetat  
                                      1% Tween-20  
                                      5mM DTT

Handisolierte Kernhüllenproteine (siehe 3.2.5) wurden über Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 3.2.1-3.2.3) und durch einen Immunblot auf Nitrocellulose transferiert (siehe 3.3.4). Anschließend wurde die Nitrocellulose ÜN bei 4°C in Renaturierungspuffer inkubiert. Dadurch sollten die Proteine eine möglichst native Form annehmen. Um den Renaturierungspuffer zu entfernen wurde die Nitrocellulose 2x für 15min in Bindungspuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Bindung von GST-gekoppelten Proteinen an die Proteine der Kernhülle, durch Inkubation der Nitrocellulose mit den unten angegebenen Proteinen in Bindungspuffer mit 100µM GTP für 1h. Nach fünfmaligem Waschen in

Bindungspuffer und 2 maligem Waschen in TBST wurde die Nitrocellulose mit verschiedenen Antikörpern inkubiert (siehe 3.3.4).

Verwendete Fusionsproteine:

- GST-eIF-5A (2mg/ml)
- GST-PKI-NES (2mg/ml)
- GST (2mg/ml)

### 3.2.9 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

In Bakterien exprimierte GST-Fusionsproteine (siehe 3.5.6) wurden über den GST-Anteil des Proteins aufgereinigt, durch Kopplung an Glutathion-Sepharose Beads.

#### Lösungen:

PBS: siehe 3.2.7

Resuspendierungs-Puffer: 1µg/ml Leupeptin  
1µg/ml Pepstatin  
1µg/ml Aprotinin  
1µg/ml DNaseI  
1mM PMSF  
in PBS

MnCl: (1M)

MgCl<sub>2</sub>: (1M)

Elutionspuffer: 50mM Tris-Base  
150mM NaCl  
15mM Glutathion

Waschpuffer 1: PBS  
1% (v/v) Triton X-100  
1mM PMSF

Waschpuffer 2:                    PBS  
  1mM PMSF

#### Herstellung der Sepharose-Matrix:

Für die Vorbereitung der Matrix wurde die Sepharose in ein Eppendorf-Cap gegeben und durch Zentrifugation für 5 min bei 500xg und RT pelettiert. Das Pellet wurde anschließend 2x mit PBS gewaschen, wobei nach jedem Waschschrift eine Zentrifugation erfolgte.

Für einen 1L Proteinansatz benötigt man 500µl Sepharose.

Die folgenden Mengenangaben beziehen sich auf einen 1L Kulturansatz.

Das Bakterienpellet wurde in 10ml Resuspendierungspuffer aufgenommen. Nach Zugabe von 26µl MnCl<sub>2</sub> (1M) und 260µl MgCl<sub>2</sub> (1M) sowie einer Spatelspitze Lysozym wurde das Pellet sorgfältig resuspendiert. Nach einer Inkubation von 15min auf Eis erfolgte der Aufschluß der Bakterien durch Sonifizierung. Sonifiziert wurde auf Eis für 3x je 10sec. Danach wurden, ausgehend vom Suspensionsvolumen 0,5M NaCl und 1% (v/v) Triton™ X-100 zugesetzt und für weitere 10min auf Eis inkubiert. Die Bakterienreste wurden durch Zentrifugation für 20min bei 13000xg und 4°C pelettiert. Die Überstand mit den löslichen Proteinen wurde zu der bereits vorbereiteten Sepharose (siehe oben) gegeben und auf dem Drehrad für 1h bei 4°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 5min bei 500xg und 4°C wurde die Sepharose mit dem nun gebundenen GST-Fusionsprotein 3x mit je 10ml Waschpuffer 1 und danach 3x mit je 10ml Waschpuffer 2 gewaschen, wobei nach jedem Waschschrift eine Zentrifugation von 3min bei 500xg und 4°C erfolgt. Nach der letzten Zentrifugation wurden 500µl Elutionspuffer zu dem Sepharose-Pellet gegeben und das GST-Fusionsprotein wurde durch Inkubation unter Schütteln für 10min von der Sepharose eluiert. Nach der anschließenden Zentrifugation von 5min bei 500xg und 4°C wurde der Überstand, in dem sich das eluierte GST-Fusionsprotein befindet, in einen Dialyseschlauch gefüllt und bei 4°C ÜN gegen PBS dialysiert.

Aliquots der Probe können nun über SDS-PAGE kontrolliert werden (siehe 3.2.1)

### 3.2.10 Bestimmung der Proteinkonzentration

Über die  $E_{280}$ : Die Konzentration des Fusionsproteins kann annäherungsweise über  $E_{280}$ , die Extinktion der Lösung bei 280nm, bestimmt werden. Für GST alleine wurde ermittelt, daß eine  $E_{280}$  von 1 einer Konzentration von 0,5mg/ml entspricht.

Über BSA-Konzentrationsreihe: Zur Bestimmung der Konzentration kann auch eine BSA-Konzentrationsreihe erstellt werden, die dann mit der Probe über SDS-PAGE aufgetrennt wird. Nach der Coomassie-Färbung des Geles kann man dann aufgrund des Bandenvergleiches die Konzentration ermitteln.

## 3.3 Immunologische Methoden

### 3.3.1 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie auf Gefrierschnitten von *Xenopus laevis* Oocyten

Mit der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie können intrazelluläre Antigene in Geweben oder Kulturzellen von spezifischen Antikörpern im Lichtmikroskop lokalisiert werden.

Lösungen:

PBS: siehe 3.2.7

MS 222: siehe 3.1.1

Methylbutan

#### 3.3.1.1 Präparation des Ovars

Weibliche *Xenopus laevis* wurden, wie unter 3.1.1 beschrieben, operiert. Kleine Ovarstückchen wurden abgetrennt, abgetupft und sofort in Methylbutan, das durch flüssigen Stickstoff auf  $-120^{\circ}\text{C}$  gekühlt war, eingefroren und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.3.1.2 Anfertigung von Gefrierschnitten

Für Immunfluoreszenzen auf Ovar wurden Gefrierschnitte in einem Kryostat-Mikrotom bei einer Kühltemperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  hergestellt. Die eingefrorenen Gewebestückchen wurden mit einem Tropfen Einbettmedium (Leica Instruments, Nussloch) auf einem Objektisch aufgeblickt. Gefrierschnitte von  $4\text{-}6\mu\text{m}$  Dicke wurden hergestellt und direkt auf Objektträger überführt, die zuvor mit Petroleumbenzin gereinigt wurden. Die Qualität der Schnitte konnte im Umkehrmikroskop überprüft werden.

### 3.3.1.3 Fixierung der Schnitte und Inkubation mit Antikörpern

Die Ovar-Gefrierschnitte wurden auf dem Objektträger luftgetrocknet, 10min in Aceton bei  $-20^{\circ}\text{C}$  fixiert und anschließend bei RT luftgetrocknet.

Die Präparate auf den Objektträgern wurden dann mit Antikörpern inkubiert.

Verdünnung der Antikörper (in PBS):

anti-TGase (Maus)	1:200
Sekundärantikörper (anti-Maus, Texas-Red-gekoppelt)	1:200

Um das Austrocknen der Schnitte zu verhindern, wurden die folgenden Schritte bei RT in einer feuchten Kammer durchgeführt. Auf die Schnitte wurden je  $30\mu\text{l}$  Primärantikörperlösung aufgetragen und für 30min inkubiert. Nichtgebundene Antikörper wurden beim anschließenden Waschen (2x5min in PBS) entfernt. Darauf folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (anti-Maus, Texas-Red-gekoppelt) für 30min. In den letzten 10min wurde das Fluorochrom Hoechst 33258 ( $5\mu\text{l}/\text{ml}$  PBS) zur Markierung der DNA dazugegeben. Anschließend wurde erneut 2x5min in PBS gewaschen, 1min in 100% Ethanol dehydriert und bei RT luftgetrocknet. Die Präparate wurden in Mowiol 4-88 (Hoechst, Frankfurt) eingebettet.

### 3.3.1.4 Mikroskopie

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurde ein Photomikroskop mit Epifluoreszenzoptik und Selektivfiltern für Texas-Red- und Hoechst-DNA-Fluorochrom eingesetzt. Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen wurden mit Neofluarobjektiven untersucht und fotografiert.

### 3.3.2 Immungoldlokalisation auf manuell isolierten *Xenopus leavis* Kernen

#### Lösungen:

Cacodylatpuffer: 0,05M Cacodylsäure Na-Salz Trihydrat

2,5% Glutaraldehyd mit Ionen: 5ml 25% Glutaraldehyd  
2,5ml 1M KCl  
1,25ml 0,1M MgCl<sub>2</sub>  
41,25ml 0,05M Cacodylatpuffer  
pH 7,2

Osmiumtetroxid: 2% OsO<sub>4</sub> in dH<sub>2</sub>O (w/v)

Epon-Lösung A: (1ml = 1,077g)  
50ml DDSA  
31ml Epon 812 (Serva, Heidelberg)

Epon-Lösung B: (1ml = 1,212g)  
44,5ml MNA  
50ml Epon 812

Epon-Gemisch: (4:3 w/w)  
24,6g Lösung A  
20,8g Lösung B

0,8ml DMP-30

Weiblichen *Xenopus laevis* Fröschen wurde, wie unter 3.1.1 beschrieben, Ovar entnommen. Die Oocyten wurden in Barth-Medium defollikuliert und in 3:1 Medium überführt. Mit Uhrmacherpinzetten konnten diese dann vorsichtig aufgerissen und der Kern freigelegt werden, wie unter 3.1.5 beschrieben.

### 3.3.2.1 Fixierung der Proben

Zur Vorbereitung wurden auf Chromosomenkammern (25x35mm, Loch  $\varnothing$  7mm) Deckgläschen ( $\varnothing$  18mm) mit Paraffin befestigt. Die Kammern wurden mit je 5 handisolierten Kernen bestückt, mit einem Deckglas verschlossen und zentrifugiert (5min, 9000xg, Bremse und Beschleunigung 4, 4°C). Anschließend wurde das obere Deckglas wieder entfernt und in die Öffnung etwa 30 $\mu$ l der Primärantikörperlösung gegeben (anti-TGase (Maus), 1:200 in PBS). Nach 60min Inkubation bei RT wurde sehr vorsichtig 2x3min in PBS gewaschen. Anschließend wurde der Zweitantikörper (anti-Maus gekoppelt mit 12nm kolloidalem Gold, 1:10 in PBS) zugegeben und 60min bei RT inkubiert. Nach dem Waschen (2x3min in PBS) erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper (anti-eIF-5A (rabbit) 1:200 in PBS). Nach 60 min wurde erneut gewaschen und der Zweitantikörper (anti-rabbit gekoppelt mit 6nm kolloidalem Gold) wurde für 60 min zugegeben. Anschließend erfolgte die Fixierung mit 2,5% Glutaraldehyd mit Ionen für 15min. Nach kurzem Waschen in Cacodylatpuffer wurde mit 2% Osmiumtetroxid für 15min postfixiert.

### 3.3.2.2 Entwässerung und Einbettung der Proben in Epon

Die Präparate wurden über eine aufsteigende Alkoholreihe, bestehend aus 50%, 70%, 90% und 96% Ethanol, je 2x5min bei 4°C dehydriert. Anschließend wurden die Proben zur vollständigen Entwässerung 2x5min in 100% Ethanol bei RT inkubiert. Der Alkohol wurde mittels Epon verdrängt und die Proben für 48h in den 60°C-Wärmeschrank gestellt. Anschließend konnte eine, mit Epon gefüllte, Gelatine kapsel auf die Öffnung gestellt werden. Die Probe kam erneut für 48h zum Aushärten in den Wärmeschrank. Nachdem die Probe



zurechtgesägt, das Deckgläschen mittels Luftdruck entfernt und die Schnittfläche angetrimmt war, konnte diese im Ultramikrotom geschnitten werden.

### 3.3.2.3 Anfertigung und Auswertung der Ultradünnschnitte

#### Lösungen:

Uranylacetat: 2% Uranylacetat in dH<sub>2</sub>O

Bleicitrat nach Reynolds (1963): 1,33g Bleinitrat  
1,76g Natriumcitrat  
8ml 1N NaOH  
ad 50ml abgekochtes dH<sub>2</sub>O

Die Ultradünnschnitte wurden am Ultramikrotom hergestellt. Die Schnittdicke betrug 60-80 nm. Aus dem, hinter dem Messer angebrachten Wassertrog wurden die Schnitte mit einem, vorher mit Pioloform F (Wacker-Chemie GmbH, München) beschichteten, EM-Kupfernetzchen (Typ 75, Ø 3mm, VECO Industrieprodukte GmbH, Solingen-Höhscheid) abgefischt und eine halbe Stunde luftgetrocknet.

Um Membranstrukturen sichtbar zu machen, wurden die Ultradünnschnitte kontrastiert. Dafür wurde das dazu benötigte Wasser abgekocht, damit das darin gelöste CO<sub>2</sub> entweicht, um Bleicitratniederschläge zu vermeiden. Die Proben wurden ca. 20min bei RT in Uranylacetat kontrastiert und anschließend gut mit destilliertem Wasser abgewaschen. Dann wurden sie in der Bleicitratlösung nach Reynolds inkubiert. Nach etwa 8min wurde die Lösung mit destilliertem Wasser gut abgewaschen und die Probe eine halbe Stunde luftgetrocknet. Die Präparate wurden mit einem Zeiss EM10-Elektronenmikroskop bei 80kV ausgewertet.

### 3.3.3 Immunpräzipitation mit aktivierter CNBr-Sepharose

Bei dieser Methode wird ein Antikörper oder ein gereinigtes Protein an eine Matrix gebunden, in diesem Fall an aktivierte CNBr-Sepharose 4B (Amersham Pharmacia) und anschließend

mit einem Proteingemisch inkubiert. Dabei soll eine spezifische Bindung der Proteine erfolgen, die dann präzipitiert werden.

Lösungen:

Bindungspuffer:	0,5M NaCl 0,25M NaHCO <sub>3</sub> pH 8,8 eingestellt mit Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
Quellpuffer:	10µl 1M HCl auf 10ml dH <sub>2</sub> O
Absättigungspuffer:	0,2M Glycin in Bindungspuffer
Waschpuffer 1:	0,1M Na-Acetat 0,5M NaCl pH 4 eingestellt mit Essigsäure
Waschpuffer 2:	0,5% Triton in PBS
Waschpuffer 3:	20% Waschpuffer 2 in PBS
Waschpuffer 4:	0,5M NaCl in PBS
Trennpuffer:	3M KSCN in 10mM Phosphatpuffer
Phosphatpuffer:	10mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4
PBS	siehe 3.2.7

30mg aktivierte CNBr-Sepharose 4B wurde für 10min bei RT in 1,5ml Quellpuffer zum Quellen gebracht. Danach wurde sie für 5min bei 500xg und 4°C abzentrifugiert. Alle

folgenden Zentrifugationsschritte erfolgten unter den gleichen Bedingungen. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer ausgezogenen Glaspipette abgezogen und die Sepharose wurde für 10min bei RT mit 1,5ml Bindungspuffer äquilibriert. Nach der folgenden Zentrifugation wurde der Überstand verworfen. Die Sepharose wurde dann für 2h bei RT mit dem zu bindenden Substrat (anti-Aktin 2G2: 100ng bzw. Fluorescein-markierte Aktin-Monomere: 100ng ) in 1ml Bindungspuffer auf dem Drehtisch inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Sepharose durch Zentrifugation pelletiert. Der Überstand, in dem sich nicht gebundenes Substrat befindet, wurde verworfen. Zusätzliche Bindungsstellen der Sepharose wurden durch Zugabe von 1,5ml Absättigungspuffer und Inkubation auf dem Drehtisch für 2h bei RT, abgesättigt. Nach der Absättigung wurden folgende Waschschrte durchgeführt, wobei nach jedem Schritt eine Zentrifugation erfolgte:

- 3x abwechselnd mit je 1ml Bindungspuffer und Waschpuffer 1
- 1x Waschpuffer 2, 1ml
- 1x Waschpuffer 2, 1ml
- 1x Waschpuffer 3, 1ml
- 1x Waschpuffer 4, 1ml
- 1x Trennpuffer, 1ml
- 3x PBS, 1ml

Anschließend wurde die Sepharose mit 1ml eines Proteingemisches für 2h bei RT auf dem Drehtisch inkubiert. Bei dem Proteingemisch handelte es sich entweder um je 1000 handisolierte Kerne (siehe 3.1.5) oder um je 1000 Kerne aus einer Massenisolierung (siehe 3.2.4), die in je 1ml PBS resuspendiert wurden. In einigen Experimenten wurden die Kerne 1h vor der Zugabe zur Sepharose mit den Aktin-bindenden Proteinen Latrunculin B oder Swinholide A, in einer Konzentration von je 3mM, auf Eis inkubiert.

Nach der Inkubation der Sepharose, wurde diese durch Zentrifugation pelletiert. Der Überstand, in dem sich die nicht gebundenen Proteine befinden, wurde in 6 Volumina Aceton p.a. gefällt. Die Sepharose wurde durch die folgenden Waschschrte gewaschen:

- 1x PBS, 1ml
- 1x Waschpuffer 2, 1ml
- 1x Waschpuffer 3, 1ml
- 1x Waschpuffer 4, 1ml
- 1x PBS, 1ml

Durch Zugabe von 0,5ml Trennpuffer wurden die spezifisch gebundenen Proteine von dem gebundenen Substrat getrennt. Nach der Zentrifugation wurden diese gebundenen Proteine entweder sofort in Probenpuffer H (siehe 3.2.1) aufgenommen, oder zuvor gegen PBS in einem Dialyseschlauch für 2h, bei 4 °C dialysiert und danach in Probenpuffer H aufgenommen. Die nicht gebundenen, in Aceton-gefällten Proteine wurden wie unter 3.2.1.2 beschrieben, weiterbehandelt.

Anschließend wurden die Proteine über Gelelektrophorese, wie unter 3.2.1-3.2.3 beschrieben, aufgetrennt. Die Gele wurden dann entweder für eine Silberfärbung weiterverwendet, oder für einem Immunblot (3.2.6 und 3.3.4).

### 3.3.4 Immunblot

Um einzelne Proteine in einem Proteingemisch zu identifizieren, wurden Immunblots durchgeführt. Hierbei werden zunächst Proteingemische durch Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 3.2.1-3.2.3). Der Transfer der Polypeptide auf Nitrocellulose wurde elektrophoretisch im semy-dry-Verfahren nach Kyhse-Anderson (1984), basierend auf einer Methode von Towbin et al. (1979), durchgeführt. Spezifische Antikörper erkennen dabei immobilisierte Proteine auf Nitrocellulose. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgt dann durch Enzymgekoppelte Sekundärantikörper, die in der Lage sind, die Primärantikörper zu erkennen und zu binden.

#### Lösungen:

PBS:	siehe 3.2.7
TBS:	140mM NaCl 10mM Tris-HCl, pH 7,4
TBST:	TBS 0,05% Tween-20 (Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen)
TBST++:	560mM NaCl 10mM Tris-HCl, pH 8,0

	0,1% Triton X-100
	0,05% Tween-20 (Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen)
Puffer 1:	25mM Tris
	20% Methanol
	pH 10,4
Puffer 2:	300mM Tris
	20% Methanol
	pH 10,4
Puffer 3:	25mM Tris
	40mM DL-Norleucin (Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen)
	20% Methanol
	pH 9,4
Ponceau S	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

#### 3.3.4.1 Transfer der Proteine vom Gel auf die Nitrocellulose

Die Proteine wurden, wie unter 3.2.1-3.2.3 beschrieben, elektrophoretisch aufgetrennt. Das Trenngel wurde anschließend für 15min in Puffer 3 äquilibriert. In der Zwischenzeit wurden 18 Blatt Filterpapier (Whatman-Filterpapier, Schleicher & Schuell, Dassel) und ein Nitrocellulosefilter (Schleicher & Schuell, Dassel) auf die Größe des Geles zugeschnitten. Die Filterpapiere und die Nitrocellulose wurden, wie aus der schematischen Abbildung 3.1 ersichtlich, mit den unterschiedlichen Puffern getränkt und mit dem Gel möglichst luftblasenfrei und exakt in eine Graphitblot-Apparatur geschichtet. Der Proteintransfer wurde 1,5h bei einer konstanten Stromstärke von 0,8mA/cm<sup>2</sup> bei RT durchgeführt. Die Proteine wandern dabei von der Kathode (Gel) zur Anode (Nitrocellulose). Die Nitrocellulose wurde nach Beendigung des Transfers so markiert, daß das ursprüngliche Beladungsschema nachvollziehbar war.

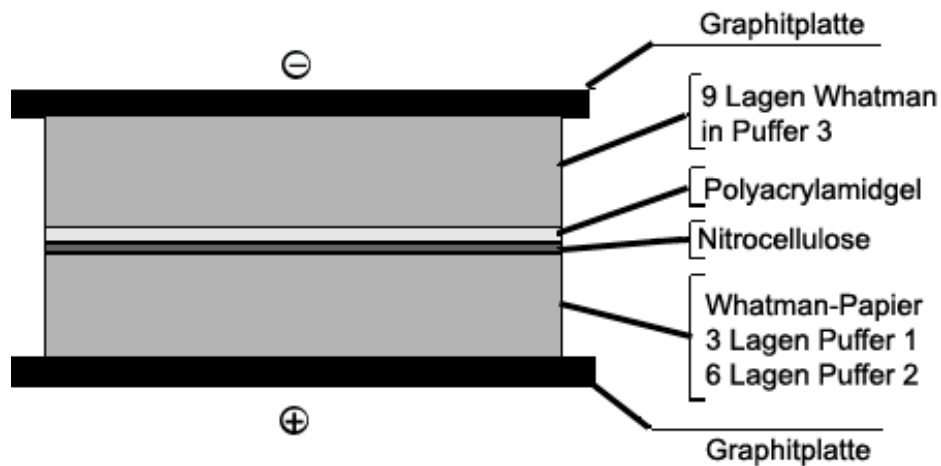


Abb3.1: Aufbau eines Western Blots

### 3.3.4.2 Anfärbung der transferierten Proteine

Um die Transferqualität zu überprüfen, wurde die Nitrocellulose einige Minuten in Ponceau S gefärbt. Überschüssige Farbe wurde mit  $\text{dH}_2\text{O}$  entfernt, bis die Proteinbanden sichtbar waren. Die Spuren mit den Referenzproteinen wurden abgetrennt und getrocknet. Zur vollständigen Entfernung des Ponceau S wurden die Filter mehrmals in TBST gewaschen.

### 3.3.4.3 Immunreaktion

Zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen wurde die Nitrocellulose, wie für die jeweiligen Antikörper beschrieben (siehe Tab.3.1), abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper. Dafür wurde die Nitrocellulose mit der Antikörperlösung, möglichst luftblasenfrei, in Haushaltsfolie eingeschweißt und auf dem Drehtisch befestigt. Die Primärantikörper wurden dabei, wie für die jeweiligen Antikörper beschrieben (siehe Tab.3.1), verdünnt. Nach der Inkubation wurde die Nitrocellulose gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurden die spezifisch gebundenen Antikörper mit Hilfe von Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern nachgewiesen (anti-Kaninchen bzw. anti-Maus, 1:10.000 in 10% Magermilchpulver in TBST). Hier erfolgte die Inkubation 60min bei RT. Nach dem Waschen (3 x 10min in TBST) wurden die gebundenen Sekundärantikörper mit dem „enhanced chemical luminescence-Detektionssystem“ (ECL, Amersham Buchler, Braunschweig) nach Angaben des Herstellers detektiert.

Antikörper und WGA	Absättigung der Nitrocellulose	Verdünnung des AKs	Inkubationszeit	Waschen
anti-GST (mouse)	2h, RT; 10% Milch (TBST)	1:500 (TBST)	1h, RT	3x10min (TBST)
anti-BSA (rabbit)	2h, RT; 10% Milch (TBST)	1:1000 (TBST)	1h, RT	3x10min (TBST)
anti-His (mouse)	1h, RT; 3% BSA (TBS)	1: 1000 (3%BSA in TBS)	1h, RT	2x10min (TBST++) 1x10min (TBS)
anti-eIF-5A (rabbit)	2h, RT; 10% Milch (TBST)	1:500 (TBST)	1h, RT	3x10min (TBST)
anti-CRM1 (rabbit)	1h, RT; 10% Milch (TBST)	1:500 (TBST)	2h, RT	3x10min (TBST)
mAB 414 (mouse)	2h, RT; 10% Milch (TBST)	1:1000 (TBST)	1h, RT	3x10min (TBST)
mAB 2G2 (mouse)	2h, RT; 10% Milch (TBST)	1:500 (TBST)	1h, RT	3x10min (TBST)
anti-TFIIIA (mouse) (lyophilisiert)	1h, RT; 5% Milch (TBS)	1mg/ml (PBS)	ÜN, 4°C	3x10min (TBS)
anti-TFIIIAW9 (mouse)	1h, RT, 5% Milch (TBS)	unverdünn	ÜN 4°C	3x10min (TBS)
anti-HuR (rabbit)	2h, RT; 10% Milch (TBST)	1:1000 (TBST)	1h, RT	3x10min (TBST)
anti-TGase (mouse)	2h, RT; 10% Milch (TBST)	1:200 (TBS)	1h, RT	3x10min (TBST)
WGA	ÜN, 4°C, 2% PVP40 (PBS)	1:500 (2%PVP 40, PBS)	1h, RT	

**Tab.3.1:** Immunblot Protokolle der spezifischen Antikörper bzw. WGA





### 3.4.1 Immunisierung der Maus

Einer 4-6 Wochen alten Maus (siehe 2.1.1) wurden 10-100 $\mu$ g Antigen pro Immunisierungsschritt in beide Hinterbeine gespritzt (subkutan auf Fußrücken).

#### Immunisierungsschema:

Tag 0: Gesamtvolumen 100 $\mu$ l, 50% Adjuvans complete

Tag 4: Gesamtvolumen 100 $\mu$ l; ohne Adjuvans

Tag 6/7: wie Tag 4

Tag 7/8: Fusion beider Kniekehlen-Lymphknoten (siehe 3.4.2)

### 3.4.2 Fusion

#### Lösungen :

Medium zum Ausplattieren: RPMI komplett (Life Technologies, Eggenstein)  
10% FCS  
1x HAT (Life Technologies, Eggenstein)  
24 $\mu$ M Mercaptoethanol

Die Maus wurde durch Genickbruch getötet und in 70% EtOH desinfiziert. Daraufhin erfolgte eine sterile Entnahme der Lymphknoten aus den Kniekehlen, mit sterilem Besteck.

Die Knoten wurden in eine Schale mit RPMI (pur) überführt, von Fettresten befreit und anschließend mit einem sterilen Spritzenkolben im Medium zerrieben.

Myelomzellen (SP 2/0: siehe 2.1.1) aus zwei konfluenten großen Flaschen wurden abgespült und ebenso wie die Lymphzellen zentrifugiert (150xg, RT, 10min). Die beiden Zellarten wurden dann 2x mit RPMI (pur) gewaschen und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden die Myelom-Zellen (SP 2/0 Zellen) und die

Lymphzellen im Verhältnis 2:1 gemischt und zentrifugiert (150xg, RT, 10min). Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und das Pellet durch Klopfen gelockert.

In 1min wurden 1,5ml PEG zugetropft und die Zellsuspension dabei mit einer Pipettenspitze langsam gerührt. Nach der PEG-Zugabe wurde noch für 1min langsam weitergerührt. Anschließend wurde RPMI (pur) wie folgt zugegeben:

in 1min 1ml

in 1min 3ml

in 2min 16ml

Während der Zugabe wurde die Suspension vorsichtig geschwänkt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (150xg, RT, 10min). Nach einer Inkubation von 5min wurde der Überstand sorgfältig entfernt. Das Pellet wurde in Ausplattiermedium resuspendiert mit einer Konzentration von  $3 \times 10^5$ /ml Medium. Ausplattiert wurde auf eine 96well Platte mit 200µl/well.

Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 4-7 Tagen wurde der Überstand abgenommen und auf einem Immunblot überprüft (siehe 3.3.4)

### 3.4.3 Bestimmung der Antikörper-Subklasse

#### Lösungen:

PBS: siehe 3.2.7

Agaroselösung: 1% Agarose in PBS

Coomassie-Färbelösung: siehe 3.2.1.4

Entfärbelösung: siehe 3.2.1.4

Subklassen-spezifische Antikörper: Kaninchen-anti-Maus IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgM  
(Miles-Yeda, Frankfurt) 1:4 in PBS

Die Subklasse monoklonaler Antikörper wurde nach Ouchterlony und Nilsson (1978) durch doppelte Immundiffusion bestimmt. Auf mit Aceton gereinigten Objektträgern wurden jeweils 2ml heiße Agaroselösung pipettiert. Nach dem Erkalten der Agarose wurde eine Rosette gestanzt. In das zentrale Loch wurden 20µl des Zellüberstandes der Hybridom-Zellen pipettiert. In die äußeren Löcher wurden je 20µl der subklassen spezifischen Antikörper gegeben. Nicht beladene Löcher wurden mit PBS gefüllt. Nach 30min wurden nochmals 20µl der entsprechenden Antikörper zugegeben. Der Ansatz wurde ÜN in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Nach 48-stündigem Spülen mit PBS (ohne schütteln) wurden die Agarose-Streifen in 1:5 verdünnter Coomassie-Blau Färbelösung gefärbt und anschließend wieder entfärbt. Der zu bestimmende Antikörper befindet sich dann an der Diffusionsgrenze zu dem Subklassen-spezifischen Antikörper, zu dessen Subklasse er gehört.

### 3.5 Mikrobiologische Methoden

#### 3.5.1 Flüssigkultur von Bakterien

##### Lösungen:

LB-Medium (Luria Bertami) 1L:     10g Bacto Trypton (Gibco)  
  5g Hefeextrakt (Gibco)  
  5g NaCl  
  pH 7, 4 mit NaOH eingestellt  
  ⇒ autoklavieren

Ampicillin-Stammlösung:         50mg/ml dH<sub>2</sub>O

Für eine Übernachtskultur (ÜNK) wurde ca. 10ml LB-Medium in einem sterilen Röhrchen vorgelegt. Zur Selektion wurde ein Antibiotikum zugesetzt in einer Endkonzentration von 50µg/ml. Zum Animpfen wurde etwas Bakterienmaterial aus einer Glycerinkultur oder von einer Bakterienkolonie mit einer sterilen Pipettenspitze in das Medium überführt. Die Kultur wurde dann ÜN bei 37°C geschüttelt. Für Flüssigkulturen mit größeren Volumina z.B. für die Proteinexpression wurde zunächst eine ÜNK wie beschrieben angesetzt. Mit 0,5-5ml dieser ÜNK wurde dann am nächsten Tag die Kultur für die Proteinexpression angeimpft.

### 3.5.2 Glycerinkulturen

Um Bakterien längere Zeit aufzubewahren, wurden Glycerinkulturen angesetzt. Zur Herstellung wurden 100-200µl steriles Glycerin mit 900µl einer Flüssigkultur sorgfältig durch vortexen, gemischt. Anschließend erfolgte eine Lagerung bei -70°C.

Um aus einer Glycerinkultur eine Flüssigkultur zu machen, wurde mit einer sterilen Pipettenspitze über die Glycerinkultur gestrichen und die anhaftenden Bakterien wurden in ein Röhrchen mit Medium überführt.

### 3.5.3 Bakterienkultur auf Agarplatten

Für die Herstellung von Agarplatten wurden 1,5% Agar (Select Agar, Gibco) in LB-Medium eingewogen und anschließend autoklaviert. Nachdem sich die Lösung nach dem Autoklavieren auf etwa 50°C abgekühlt hatte, wurde für die Selektionsplatten Ampicillin in einer Endkonzentration von 50µg/ml zugegeben. Der flüssige Agar wurde dann in sterile Petrischalen gegossen, so daß der Boden gerade bedeckt war. Nach Erstarren des Agars wurden die Platten auf den Kopf gestellt, um ein Auftropfen von Kondenswasser auf den Nährboden zu verhindern. So wurden die Platten ÜN bei RT zum Trocknen aufbewahrt. Die Lagerung erfolgt bei 4°C. Um aus einer Flüssigkultur eine Plattenkultur herzustellen wurden 100-200µl der Flüssigkultur auf eine Platte gegeben und mit einem sterilen Drygalski-Spatel verstrichen. Eine andere Möglichkeit ist, Bakterien mit einer sterilen Impföse auf die Platte zu überführen und dort auszustreichen.

### 3.5.4 Herstellung kompetenter Bakterien

Um Bakterien mit Vektoren transformieren zu können, benötigt man kompetente Bakterien, d.h. Bakterien, die DNA aus ihrer Umgebung in sich aufnehmen können. Es gibt zahlreiche Bakterienarten, die eine natürliche Kompetenz besitzen, aber man kann auch andere Arten durch die Modifikation der Lipiddoppelschicht, die sie umgibt, chemisch kompetent machen (Chung et al., 1989).

Lösungen:

LB-Medium:	siehe 3.5.1
TSS:	LB-Medium
(Transformation	10% (w/v) PEG 3350 oder 8000
and Storage Solution)	5% (v/v) DMSO
	20-50mM Mg <sup>2+</sup> (MgSO <sub>4</sub> oder MgCl <sub>2</sub> )
	pH 6,5
	⇒ sterilfiltern und bei -20°C lagern

Zunächst wurde eine ÜNK mit einer Einzelkolonie des Bakterienstammes BL21Codon<sup>+</sup> angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 100ml LB-Medium mit 1ml der ÜNK angeimpft. Diese Ansatz wurde bei 37°C, unter Schütteln, bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3-0,4 inkubiert, was nach ca. 2h der Fall war. Dann wurde die Kultur auf 2 50ml Röhren verteilt und für 10min bei 1000xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2,5ml TSS aufgenommen und resuspendiert. Die Suspension wurde in Aliquots zu 100µl auf vorgekühlte Eppendorf-Caps verteilt und dann in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -70°C.

**3.5.5 Transformation von Vektor-DNA in Bakterien**Lösungen:

LB-Medium	siehe 3.5.1
-----------	-------------

Ein Aliquot (100µl) kompetenter Bakterien wurde mit 50-150ng Plasmid-DNA vermischt. Der Ansatz wurde für 45-60min auf Eis inkubiert, dann für 30sec einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt, nachdem der Ansatz sofort wieder auf Eis gestellt wurde. Anschließend wurden 900µl LB-Medium zugegeben und der Ansatz wurde für 2h bei 37°C geschüttelt. Danach wurden zwei Verdünnungen auf entsprechenden Selektionsplatten ausgestrichen. Dabei wurden zunächst 100µl entnommen und ausgestrichen. Der Rest wurde für 5min bei 1000xg

abzentrifugiert und der Überstand wurde bis auf 100µl abgenommen. Das Bakterienpellet wurde in diesen 100µl resuspendiert und auf die Platte ausgestrichen.

### 3.5.6 Expression von GST-Fusionsproteinen in Bakterien

Für die Expression wurden Bakterien vom Stamm *E. coli* BL21-Codon<sup>+</sup>(DE3)-RIL verwendet.

#### Lösungen:

LB-Medium: siehe 3.5.1

IPTG (Isopropyl b-D-Thiogalactosid, Applichem): 1M in dH<sub>2</sub>O

Es wurde wie unter 3.5.1 beschrieben, eine Flüssigkultur aus *E. coli* BL21 Bakterien (siehe 3.6.10 und 3.5.5) hergestellt, in die der Expressionsvektor mit der zu exprimierenden Proteinsequenz transformiert wurde. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 wurde die Expression des Proteins, durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1mM, induziert. Diese induzierte Kultur wurde für 3-4 Stunden unter schütteln weiter bei 37°C inkubiert und danach für 20min auf Eis gestellt. Durch Zentrifugation von 15min bei 3000xg und 4°C wurden die Bakterien pelletiert. Das exprimierte GST-Fusionsprotein wurde dann, wie unter 3.2.9 beschrieben, aufgereinigt.

## 3.6 Molekularbiologische Methoden

### 3.6.1 RNA Isolierung mit peqGOLD Trifast aus *Xenopus leavis* Oocyten

Die RNA Isolierung aus Kernen und Cytoplasma von *Xenopus* Oocyten wurde mit Modifikationen nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt (Peqlab, Erlangen).

Dazu wurden die Kerne aus 20 Oocyten in 0,5ml Trifast und das Cytoplasma von 4 Oocyten in 1ml Trifast aufgenommen. Das Material wurde homogenisiert und 5min bei RT stehen

gelassen, zur Dissoziation der Nukleotide. Nach Zugabe von 0,2ml Chloroform und kräftigem Schütteln für 20sec, wurde für weitere 10min bei RT inkubiert. Eine anschließende Zentrifugation für 5min bei 12000xg und 4°C führte zur Trennung der Probe in 3 Phasen. Eine untere gelbe Phenol-Chloroform-Phase, eine obere farblose wässrige Phase und eine dazwischenliegende Interphase. Die RNA befindet sich ausschließlich in der oberen wässrigen Phase, während Proteine und DNA in der Phenol-Chloroform-Phase und in der Interphase vorliegen. Die wässrige Phase wurde in ein frisches Eppendorf-Cap überführt. Durch Zugabe von 0,5ml Isopropanol, durchmischen der Probe und Inkubation für 5-15min bei RT wurde die RNA gefällt. Im Anschluß wurde die Probe für 10min bei 12000xg und 4°C zentrifugiert, um die RNA zu pelletieren. Das Pellet wurde dann 2x mit 1ml 75% Ethanol p.a. durch Vortexen und anschließender Zentrifugation für 5min bei 7500xg und 4°C gewaschen. Nach kurzem Trocknen an der Luft wurde die RNA in sterilem dH<sub>2</sub>O oder in Probenpuffer für ein RNA Agarosegel (siehe 3.6.2.1) aufgenommen und sofort auf ein Gel aufgetragen. Um eine Degradation zu vermeiden wurde noch 1µl RNase Inhibitor (MBI) zugegeben und die RNA wurde anschließend bei -70°C gelagert.

### 3.6.2 RNA-Gelelektrophorese

RNAs wurden alternativ über ein RNA-Agarosegel oder ein RNA-Acrylamidgel aufgetrennt. Der Vorteil des RNA-Agarosegels liegt in einer besseren Verwendung für den Northern Blot aufgrund seiner Stabilität. Schärfere RNA-Banden erhält man jedoch durch eine Auftrennung der RNA über ein Acrylamidgel.

#### 3.6.2.1 Auftrennung von RNA über ein RNA-Agarosegel

##### Lösungen:

10x RNA-Elektrophorese-Puffer: 0,2M MOPS  
0,05M Na-Acetat  
0,01M EDTA  
pH 7,0

RNA-Probenpuffer:	120µl Formamid 90µl 1x RNA-Elektrophorese-Puffer 40µl Formaldehyd
10x Beladungspuffer:	50% Glycerin 0,4% Bromphenolblau 0,4% Xylencyanol 1mM EDTA pH 8,0
Laufpuffer:	1x RNA-Elektrophorese-Puffer

RNA-Agarosegele wurden ausschließlich verwendet, um die isolierte Gesamt RNA (siehe 3.6.1) aus den Oocytenkernen bzw. dem Oocytenzytoplasma aufzutrennen und durch anschließenden Northern Blot, die in die Oocyten injizierte Digoxigenin-markierte RNA zu detektieren.

Für ein 1%iges RNA-Agarosegel wurden 0,4g Agarose (Appllichem) in 33,2ml 1x RNA-Elektrophoresepuffer aufgeköcht. Nachdem die Lösung auf etwa 50°C abgekühlt war, wurden 6,8ml Formaldehyd zugegeben, das Ganze gründlich durchmischt und in einen mit Tesafilm abgedichteten Gelschlitten mit eingestecktem Kamm gegossen. Nach 30min war das Gel ausgehärtet und konnte verwendet werden. Das Gel wurde mit dem Gelschlitten in eine, mit Laufpuffer gefüllte, Elektrophoresekammer gesetzt und mit Laufpuffer überschichtet. Die aus den Oocyten isolierte Gesamt-RNA wurde in 20µl RNA-Probenpuffer gelöst, mit 1µl Beladungspuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100V und wurde beendet, als das Bromphenolblau aus dem RNA-Beladungspuffer knapp  $\frac{2}{3}$  des Geles durchlaufen hatte. Das Gel wurde anschließend für einen Northern Blot verwendet (siehe 3.5.4).



### 3.6.2.2 Auftrennung von RNA über ein RNA-Acrylamidgel

#### Lösungen:

10x TBE:                      890mM Tris-HCl, pH 8,2  
                                    890mM Borsäure  
                                    20mM EDTA

Gel-Lösung:                  8M Harnstoff  
                                    6% Acrylamid  
                                    10% 10x TBE

RNA-Beladungspuffer:      10% 10x TBE  
                                    10% Glycerol  
                                    8M Harnstoff

Laufpuffer:                  1x TBE

Zusammensetzung eines RNA-Acrylamidgeles (6%):

- 20ml Gel-Lösung
- 77 $\mu$ l 10% APS
- 20 $\mu$ l TEMED

Die Glasplatten für RNA-Minigele wurden, wie für ein Protein-Minigel (siehe 3.2.1) beschrieben, zusammgebaut. Anschließend wurde das Acrylamidgel bis zum oberen Ende der Glasplatten gegossen und der Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Nach der vollständigen Polymerisation des Geles wurde der Kamm entfernt und die Taschen mit 1xTBE ausgespült, um den abgesetzten Harnstoff zu entfernen.

Das Auftragsvolumen betrug 20 $\mu$ l pro Tasche. Vor dem Auftragen wurde der RNA je 1 $\mu$ l RNA-Beladungspuffer zugesetzt. In freie Spuren wurden 2 $\mu$ l 10x Beladungspuffer gegeben, als Marker der Lauffront. Als Laufpuffer wurde hier 1x TBE verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke von 40mA und wurde beendet, als das Xylencyanol des

Beladungspuffers (grün-türkis: läuft bei etwa 100 Basen) etwa 70% der Gelstrecke zurückgelegt hatte.

RNA-Acrylamidgele wurden anschließend entweder für Autoradiographie (3.6.3) oder für Northern Blots (3.6.4) verwendet.

### 3.6.3 Detektion von $^{32}\text{P}$ -RNA durch Autoradiographie

RNA-Acrylamidgele, mit denen  $^{32}\text{P}$ -markierte RNA aufgetrennt wurde, wurden nach der Gelelektrophorese getrocknet. Anschließend wurden sie in einer lichtundurchlässigen Röntgenfilmkammer auf einen Röntgenfilm gelegt. Aufgrund der radioaktiven Strahlung des  $^{32}\text{P}$  wird der Röntgenfilm an der Stelle, an dem sich die radioaktiv-markierte RNA befindet, belichtet. Nach der Entwicklung und Fixierung des Röntgenfilmes zeichnet sich diese Stelle als ein schwarzer Fleck auf durchsichtigem Hintergrund ab.

### 3.6.4 Northern Blot

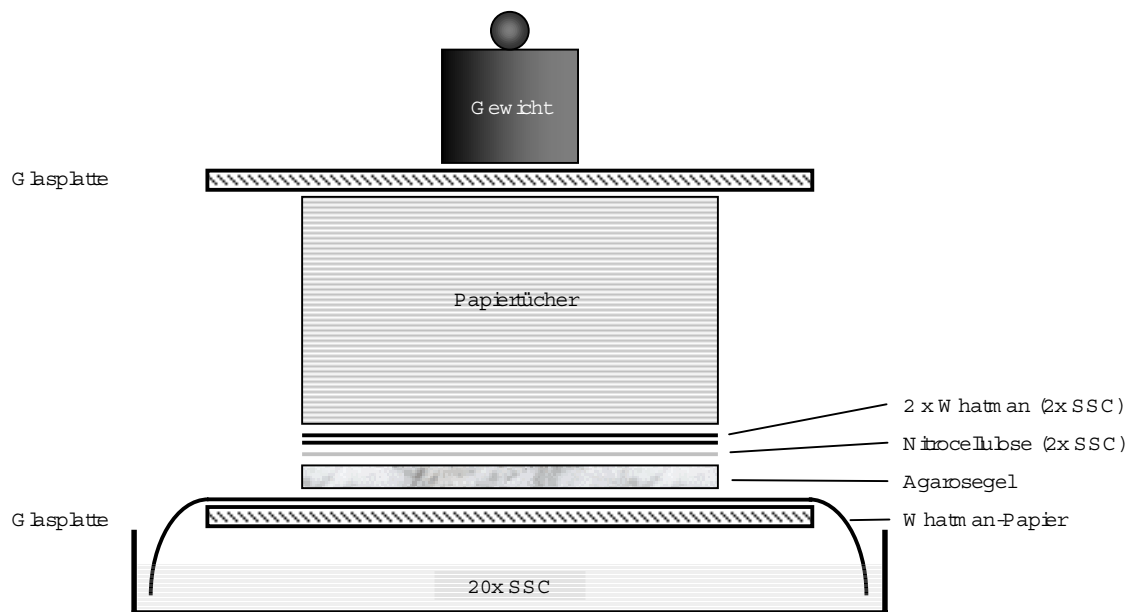
Bei einem Northern Blot wird RNA aus einem Gel über Kapillarkräfte auf eine Nylonmembran transferiert, auf der sie dann fixiert wird.

#### Lösungen:

20x SSC:	2M NaCl 0,3M Na-Citrat pH 7,0
Puffer 1:	100mM Tris 150mM NaCl pH 7,4
Puffer 2:	1% Blocking Reagenz in Puffer 1

Puffer 3:  
100mM Tris  
100mM NaCl  
50mM MgCl<sub>2</sub>  
pH 9,5

Vor dem Transfer der RNA auf eine Nylonmembran (Qiagen, Hilden) wurde das RNA-Agarosegel bzw. das RNA-Acrylamidgel für 20min in 20x SSC äquilibriert. Der Blotaufbau erfolgte wie in Abb.3.2 gezeigt. Der Transfer erfolgte für mindestens 2h, meist jedoch ÜN. Anschließend wurde die Nylonmembran in 2x SSC gewaschen. Die RNA wurde dann kovalent durch UV-cross linking ( StandardEinstellung "AUTO CROSS LINKING": 1200 yJoule x 100) an die Nylonmembran gebunden. Der Blot kann nun, in Alufolie eingewickelt, mehrere Wochen gelagert werden.



**Abb.3.2:** Aufbau eines Northern Blots

### 3.6.5 Detektion Digoxigenin-markierter RNA

#### 3.6.5.1 Detektion über alkalische Phosphatase und NBT/BCIP

##### Lösungen:

NBT: 50mg/ml in 70% Dimethylformamid  
(p-Nitrotetrazoliumblau,  
Roth; 50mg/ml)

BCIP: 50mg/ml in 100% Dimethylformamid  
(5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat,  
Roth; 50mg/ml)

Färbelösung: 10ml Puffer 3  
33µl BCIP  
66µl NBT

Zur Detektion der Digoxigenin-markierten RNA wurde die Nylonmembran, mit der kovalent gebundenen RNA, zunächst kurz in 2x SSC gewaschen. Anschließend erfolgte eine Absättigung der Membran für 30min in Puffer 2. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Antikörper (anti-Digoxigenin (AP): 1:5000 in Puffer 1) für 30min. Der Blot wurde nach der Antikörperinkubation 3x für 5min in Puffer 1 gewaschen und schließlich mit der Färbelösung überschichtet. Durch die alkalische Phosphatase entsteht ein braun-violetter Niederschlag an der Stelle auf der Membran, an der sich die markierte RNA befindet. Die Entwicklung erfolgte unter Lichtausschluß und dauerte je nach RNA Menge zwischen 5 min und mehreren Stunden. Zum Abstoppen der Reaktion wurde die Membran gründlich mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Um das Ergebnis zu protokollieren, wurde der feuchte Blot entweder fotografiert oder eingescannt, da die Färbung nach dem Trocknen schnell verblaßt.

### 3.6.5.2 Detektion über Peroxidase mit ECL

Zur Detektion der Digoxigenin-markierten RNA, wurde die Nylonmembran mit der kovalent gebundenen RNA zunächst kurz in 2x SSC gewaschen. Anschließend erfolgte eine Absättigung der Membran für 30min in Puffer 2. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Antikörper (anti-Digoxigenin (POD): 1:3000 in Puffer 1) für 30min. Der Blot wurde nach der Antikörperinkubation 3x für 5min in Puffer 1 gewaschen. Anschließend erfolgte die Detektion der markierten RNA mittels des „enhanced chemical luminescence-Detektionssystem“ (ECL, Amersham Buchler, Braunschweig) nach Angaben des Herstellers.

### 3.6.5.3 Strippen eines Northern Blots

#### Lösungen:

Strip-Puffer (Probe Away):            50mM Tris-HCL pH 8,0  
    50% Formamid  
    1% (w/v) SDS

Zum entfernen der gebundenen Antikörper, wurde die Membran gründlich in dH<sub>2</sub>O gewaschen und dann für 1h bei 68°C in Strip-Puffer inkubiert. Anschließend wurde erneut gründlich mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Vor der Inkubation mit einem neuen Antikörper, wurde die Membran für 2min in Puffer 1 äquilibriert und mit Puffer 2 für 30min abgesättigt. Danach konnte erneut mit einem Antikörper inkubiert werden.

### 3.6.6 DNA-Gelelektrophorese

#### Lösungen:

10x TBE:                                    siehe 3.5.2.2

10x DNA-Probenpuffer:                    50% (v/v) Glycerin  
    0,4% (w/v) Bromphenolblau  
    0,4% (w/v) Xylencyanol  
    in 10x TBE

Ethidiumbromid-Stammlösung (50mg/ml)

Für ein 1%iges DNA-Agarosegel wurden 0,4g Agarose (low EEO, Applichem) in 40ml 1x TBE aufgekocht. Nachdem die Lösung auf etwa 50°C abgekühlt war, wurde 1µl der Ethidiumbromid-Stammlösung zugegeben. Die Lösung wurde gut gemischt und in einen, mit Tesafilm abgedichteten Gelschlitten mit eingestecktem Kamm gegossen. Nach 30min war das Gel polymerisiert und konnte verwendet werden. Das Ethidiumbromid wurde zugegeben um die DNA-Banden sichtbar zu machen. Es interkaliert in die DNA und erzeugt bei Anregung durch UV-Licht eine orange Fluoreszenz.

Das Gel wurde mit dem Gelschlitten in eine mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt und mit Laufpuffer überschichtet. Anschließend wurden je 10µl der PCR-Probe mit 1µl 10x Probenpuffer versetzt und in die Geltasche pipettiert. Um die Größe der aufgetragenen DNA-Fragmente zu bestimmen, wurden Marker aufgetragen, die aus einem Gemisch von Fragmenten definierter Größe bestehen. Als Marker wurde hier 1µg pUC19 DNA verwendet die mit MspI geschnitten wurde (MBI).

Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 100V durchgeführt und beendet, wenn das Bromphenolblau aus dem Probenpuffer etwa  $\frac{2}{3}$  des Geles durchlaufen hatte. Die durch das Ethidiumbromid gefärbten DNA-Banden wurden mit einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und über eine Videokamera mit angeschlossenem Printer dokumentiert.

### 3.6.6.1 Gelextraktion von DNA-Fragmenten (Qiagen)

Die durch die PCR amplifizierte DNA-Sequenz der 5S rRNA wurde mit einer Skalpellklinge aus dem Gel geschnitten und mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* der Firma Qiagen aus dem Gel eluiert. Vorgegangen wurde dabei nach Herstellerprotokoll. Die finale Elution der DNA erfolgte mit 30µl dH<sub>2</sub>O.

### 3.6.7 Gewinnung von Vektor-DNA durch Qiagen Plasmid Mini-Präp

Zunächst wurde der Vektor in den Bakterien vermehrt. Dazu wurde vom betreffenden Klon eine 10ml ÜNK in LB<sub>Amp</sub>-Medium hergestellt. Am nächsten Morgen wurden 900µl dieser ÜNK abgenommen und für eine Glycerinkultur verwendet. Die restlichen 9,1ml wurden für die Vektor-Isolierung durch Qiagen Plasmid Mini-Präp verwendet.

Bei dieser Methode handelt es sich um eine Kombination aus alkalischer Lyse und Adsorption der DNA an ein Silika-Gel unter Hochsalz Bedingungen. Die DNA wird dabei nicht gefällt sondern an das Gel gebunden und anschließend mit einem Niedrigsalz-Puffer (z.B. dH<sub>2</sub>O) bei pH 7,0-8,5 eluiert. Die durch diese Methode gewonnene DNA ist von großer Reinheit und somit auch für empfindliche Reaktionen wie etwa Sequenzierung geeignet.

Durchgeführt wurde die Qiagen Plasmid Mini-Präp nach Protokoll des Herstellers, ausgehend von einer 10ml ÜNK. Eluiert wurde mit 30µl dH<sub>2</sub>O, was normalerweise zu Konzentrationen zwischen 250-400ng/µl führte.

### 3.6.8 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen wurden nach der von Sanger und Coulson (1977) entwickelten Kettenabbruch-Methode durchgeführt. Die Methode beruht darauf, daß eine PCR abbricht, wenn ein modifiziertes Nukleotid eingebaut wird. Als modifiziertes Nukleotid kommt dabei Dideoxy-Nukleosid-Triphosphate (ddNTP) zum Einsatz, an die eine DNA-Polymerase wegen der fehlenden OH-Gruppe am Zuckeranteil des Nukleotids kein weiteres mehr anfügen kann. Auf diese Weise bekommt man DNA-Fragmente verschiedenster Längen, die alle an ihren Enden ein ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP oder ddGTP) tragen. Hierbei werden Fluoreszenzmarkierte ddNTP verwendet, wobei jedes Nukleotid mit einem anderen Farbstoff markiert ist (A: R6G, grün; T: ROX, rot; C: TAMRA, gelb; G: R110, blau). In diesem System wird die zu sequenzierende DNA mit einem entsprechenden Primer und einem Premix (*ABI PRISM<sup>®</sup> BigDye<sup>™</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*), der dNTPs, markierte ddNTPs, Taq-DNA-Polymerase, MgCl<sub>2</sub> und den Puffer enthält gemischt und in einer PCR amplifiziert. Die entstandenen Fragmente werden in einem Gelsystem der Größe nach aufgetrennt und mit einem Laser angeregt. Je nach Farbstoff wird ein Licht spezifischer Wellenlänge emittiert, das von einem Photoelement registriert und an einen Computer weitergeleitet wird. Der Computer

setzt die einzelnen Meßdaten über eine geeignete Software schließlich zu einer Sequenz zusammen.

Standardansatz einer Sequenzierreaktion (10µl):

- 500ng DNA
- 10pmol Primer
- auf 8µl auffüllen mit dH<sub>2</sub>O
- 2µl Premix (BigDye™, PE Applied Biosystems)

Dieser Ansatz wurde gut gemischt und anschließend in einem Thermocycler mit folgendem Programm inkubiert:

1 Zyklus:	• initiale Denaturierung:	1min, 96°C
je 25 Zyklen:	• Denaturierung:	30sec, 96°C
	• Primer Annealing:	15sec 48°C
	• Elongation:	4min, 60°C
	• Kühlung:	4°C

Nach der Reaktion wurde dem Ansatz  $\frac{1}{10}$  Volumen 3M Na-Acetat (pH 5,2) zugegeben sowie 2,5 Volumina 100% Ethanol p.a. wodurch die DNA gefällt wurde. Der Ansatz wurde gemischt und anschließend für 20min bei 12000xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde 2x mit 70% Ethanol p.a. gewaschen. Nach jedem Waschschrift erfolgte eine Zentrifugation für 10min bei 12000xg und 4°C.

Anschließend wurde das Pellet 5-10min luftgetrocknet und danach in 25µl TSR (Template Supression Reagent, PE Applied Biosystems) aufgenommen und resuspendiert. Nach einer Inkubation für 2min bei 90°C wurde der Ansatz kurz zentrifugiert und anschließend in ein Sequenzier-Cap mit aufgesetztem Septum überführt. Die erhaltene Sequenz wurde mit Hilfe von Internet-Datenbanken analysiert.



### 3.6.9 Herstellung Digoxigenin-markierter Oocyten-Typ 5S rRNA aus *Xenopus laevis* Gesamt-RNA

Digoxigenin-markierte 5S rRNA aus *Xenopus laevis* Oocyten wurde hergestellt, indem die Gesamt-RNA aus *Xenopus* Oocyten gewonnen wurde, in cDNA umgeschrieben und die Sequenz der 5S rRNA aus dieser cDNA amplifiziert wurde. Diese wurde dann in einen Vektor kloniert, aus dem durch *in vitro* Transkription 5S rRNA in großen Mengen gewonnen werden konnte.

Zunächst wurde dazu Gesamt-RNA, wie unter 3.6.1 beschrieben, aus Stadium I-III Oocyten gewonnen, da in diesen Stadien die Oocyten-Typ 5S rRNA vorliegt.

Die Gesamt-RNA wurde dann durch RT-PCR in cDNA umgeschrieben.

#### 3.6.9.1 RT-PCR

Bei der RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) wird RNA durch Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in DNA übersetzt. Die entstandene DNA wird, als cDNA bezeichnet, wobei das c für "complementary" steht, da sich die entstandene DNA aufgrund der fehlenden Introns von der genomischen DNA unterscheidet. Man benutzt diese Technik zum Klonieren von cDNA Sequenzen, indem man die RNA zunächst in cDNA umschreibt und dann mit spezifischen Primern die gesuchte DNA-Sequenz amplifiziert.

Die RT-PCR wurde mit dem *Smart<sup>TM</sup> cDNA Library Construction Kit* der Firma Clontech (Heidelberg) weitestgehend nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

Pipettierschema einer RT-PCR (10 $\mu$ l-Ansatz):

- 1 $\mu$ g RNA (max. 3 $\mu$ l)
- 1 $\mu$ l SMART III<sup>TM</sup> Oligonucleotid (10pmol/ $\mu$ l)
- 1 $\mu$ l CDS III/3' PCR Primer (10pmol/ $\mu$ l)
- auf 5 $\mu$ l mit dH<sub>2</sub>O auffüllen

Dieser Ansatz wurde gemischt, kurz zentrifugiert und dann 2min bei 72°C denaturiert. Anschließend wurde erneut kurz zentrifugiert und der Ansatz wie folgt komplettiert:

- 2µl 5x First-Strand Buffer (Clontech, Heidelberg)
- 1µl DTT
- 1µl dNTPs (Mix, je Nucleotid 10mM, MBI, St.Leon Rot)
- 1µl Superscript II (200U/µl, Gibco, Eggenstein)

Der Ansatz wurde durch auf- und abpipettieren gut gemischt und dann 1h bei 42°C im Thermocycler inkubiert. Im Anschluß daran wurde der Ansatz auf 4°C abgekühlt und konnte so einige Tage aufbewahrt werden.

### 3.6.9.2 PCR

Die Polymerase Kettenreaktion ist eine Technik, mit der man selektiv DNA-Sequenzen vervielfältigen kann. Sie basiert auf der Grundlage, daß ein DNA-Doppelstrang bei Erhitzung "schmilzt", d.h. sich in zwei Einzelstränge teilt. Mit Hilfe einer DNA-Polymerase lassen sich die entstandenen Einzelstränge verdoppeln. Hierzu benötigt die Polymerase Primer, die die Zielsequenz umrahmen.

Bei den hier verwendeten Primern handelte es sich um den 5SGen-5' Primer und den 5SGen-3' Primer (siehe auch 2.2.3).

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Tfl-Polymerase (Promega, Mannheim) verwendet. Diese Polymerase hat die Eigenschaft, daß sie einen Überhang aus A-Nukleotiden am 3' Ende des Produktes anhängt. Außerdem besitzt sie eine Fehlerkorrektur.

Pipettierschema einer PCR (50µl-Ansatz):

- 20-100ng DNA
- 3µl MgSO<sub>4</sub> (25mM, Promega, Mannheim)
- 5µl Tfl DNA Polymerase 10x Reaction Buffer (Promega, Mannheim)
- 1µl dNTPs (10mM je Nucleotid, Promega, Mannheim)
- 1µl 5' Primer

- 1µl 3' Primer
- 1µl Tfl Polymerase (5U/µl)
- auf 50µl mit dH<sub>2</sub>O auffüllen

Der Ansatz wurde in ein 0,5ml PCR-Cap pipettiert, gut vermischt und im Thermocycler mit folgendem Programm inkubiert:

1 Zyklus:	• initiale Denaturierung:	1min, 96°C
je 30 Zyklen:	• Denaturierung:	30sec, 96°C
	• Primer Annealing:	30sec 65°C
	• Elongation:	1min, 72°C
1 Zyklus:	• final Elongation:	10min, 72°C
1Zyklus:	• Kühlung:	4°C

Die Analyse der PCR-Reaktion erfolgte im 1%igen DNA-Agarosegel (siehe 3.6.6).

### 3.6.9.3 Klonierung von PCR-Fragmenten in den pCR<sup>®</sup>2.1-Vektor

#### Lösungen:

LB<sub>Amp</sub>-Platten: siehe 3.5.1

Die Klonierung wurde mit dem *TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit* von Invitrogen (Karlsruhe) durchgeführt. Diese Klonierungsmethode macht sich die Tatsache zu Nutze, daß die Tfl-Polymerase durch ihre terminale Transferase-Aktivität einen 3' Überhang aus Deoxyadenosinen an das PCR-Produkt anfügt. Der Vektor liegt in einem linearisiertem Zustand vor und besitzt einen 3' Überhang aus Thyminiden. Außerdem ist das Enzym Topoisomerase I kovalent an die offenen 3'-Enden des Vektors gebunden. Durch die Ligationsaktivität der Topoisomerase I wird ein PCR-Produkt mit einem 3'-A-Überhang schnell in den Vektor integriert, wobei das Enzym dissoziiert.

Nach der Ligation des PCR-Fragmentes in den Vektor wurde der Ansatz in chemisch kompetente *E. coli* TOPO10 (Invitrogen, Karlsruhe) transformiert. Die Transformation wurde dann in zwei Verdünnungen auf LB<sub>Amp</sub>-Platten ausgestrichen.

Pipettierschema für die Ligation (6µl-Ansatz):

- 0,5-4µl PCR-Produkt
- 1µl Salt Solution (Invitrogen, Karlsruhe)
- 1µl TOPO<sup>®</sup>-Vektor (Invitrogen, Karlsruhe)
- auf 6µl auffüllen mit dH<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und für 5min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation, indem der Ansatz zu einem Aliquot chemisch kompetenter *E. coli* TOPO10 gegeben wurde, und dieser dann vorsichtig vermischt wurde. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 5-30min mit einem anschließenden Hitzeschock für 30sec bei 42°C. Direkt danach wurde die Zellen sofort wieder auf Eis gestellt. Dann wurden 250µl SOC-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) zugegeben und für 1h unter vertikalem schütteln bei 37°C inkubiert. Das Medium mit den Bakterien wurde dann in zwei Verdünnungsschritten (1x 40µl und 1x 200µl) auf LB<sub>Amp</sub>-Platte ausplattiert, die dann ÜN bei 37°C inkubiert wurde.

Der Vektor besitzt unter anderem eine Ampicillinresistenz die jedoch nur zum Tragen kommt, wenn sich ein Insert im Vektor befindet. Kolonien die auf den LB<sub>Amp</sub>-Platten gewachsen sind, besitzen also einen Vektor mit einem Insert. Der Vektor wurde aus den Bakterien isoliert (siehe 3.5.7) und das Insert wurde durch Sequenzierung (siehe 3.5.8) mit den Sequenzierungsprimern für den pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO-Vektor (M13 forward und M13 reverse, siehe 2.2.3) auf seine Richtigkeit überprüft.

### 3.6.9.4 Restriktionsverdau

Restriktionsverdau wurden durchgeführt, um das Insert wieder aus dem Vektor zu schneiden. Bei der in der Molekularbiologie verwendeten Restriktionsenzymen handelt es sich fast ausschließlich um Endonukleasen, die jeweils eine spezifische Nukleotidsequenz erkennen und schneiden. Dabei können, je nach verwendeter Restriktionsendonuklease glatte (blunt) oder kohäsive (sticky) Enden entstehen.

Pipettierschema für einen Restriktionsverdau (10 $\mu$ l-Ansatz):

- 1 $\mu$ g Plasmid-DNA
- 1 $\mu$ l 10x Puffer (passend zum jeweiligen Enzym, MBI, St.Leon Rot)
- auf 9 $\mu$ l auffüllen mit dH<sub>2</sub>O
- 1 $\mu$ l Restriktionsenzym (MBI, St.Leon Rot)

Der Ansatz wurde gemischt und 1-2h bei der, für das jeweilige Restriktionsenzym angegebenen Temperatur inkubiert. Anschließend wurde 1 $\mu$ l 10x DNA-Probenpuffer zugegeben und der Verdau wurde im 1%igen DNA-Agarosegel analysiert (siehe 3.6.6).

Im Falle der 5S rRNA wurde mit den Primern bereits eine Schnittstelle für HindIII am 3'-Ende des Fragmentes eingeführt. Der Vektor besitzt ebenfalls eine HindIII Schnittstelle, so daß mit diesem Enzym das Insert aus dem Vektor geschnitten werden kann.

Pipettierschema für einen Restriktionsverdau mit HindIII (10 $\mu$ l-Ansatz):

- 1 $\mu$ g Plasmid-DNA
- 1 $\mu$ l 10x Puffer (Puffer O, MBI, St.Leon Rot)
- auf 9 $\mu$ l auffüllen mit dH<sub>2</sub>O
- 1 $\mu$ l HindIII (MBI, St.Leon Rot)

Der Verdau wurde für 1h bei 37°C durchgeführt.

Dieser Restriktionsverdau wurde auf ein 1%iges DNA-Agarosegel aufgetragen und das, aus dem TOPO<sup>®</sup>-Vektor pCR2.1 herausgeschnittene Insert wurde über das *QIAquick Gel Extraction Kit* (siehe 4.14.4) gereinigt.

### 3.6.9.5 *in vitro*-Transkription und Digoxigenin-Markierung der RNA

Digoxigenin-markierte RNA wird synthetisiert durch *in vitro*-Transkription von DNA die downstream eines T7-Promotors liegt. Die T7-RNA-Polymerase verwendet dabei Digoxigenin-markiertes Uridintriphosphat als Substrat. Das UTP ist dabei über einen Spacer mit dem Steroid-Hapten Digoxigenin verbunden, daß durch Antikörper gegen Digoxigenin erkannt werden kann. Im Falle der 5S rRNA wurde in den 5'-Primer, mit der die 5S rRNA-Sequenz durch PCR amplifiziert wurde, neben verschiedenen Schnittstellen auch die Promotor-Sequenz für die T7-RNA-Polymerase eingebaut (siehe 2.2.3.). Mittels eines Restriktionsverdau (siehe 4.14.7.1) wurde das in den pCR<sup>®</sup>2.1-Vektor eingesetzte Insert wieder herausgeschnitten und für die *in vitro* Transkription verwendet.

Pipettierschema für eine *in vitro* Transkription (20µl-Ansatz):

- 1,5µg DNA
- 2µl 10x Reaktionspuffer für T7 RNA-Polymerase (Roche)
- 1µl RNase Inhibitor (40U/µl, MBI)
- 2µl DIG RNA Labeling Mix (10x konzentriert, Roche)
- 2µl T7 RNA-Polymerase (20U/µl, Roche)

Dieser Ansatz wurde gemischt und 2h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 2µl EDTA-Lösung gestoppt. Durch Zugabe von 2,4µl LiCl und 75µl Ethanol p.a. sowie einer anschließenden Inkubation von mind. 30 min bei -70°C wurde die RNA gefällt. Nach dem Fällen wurde die RNA für 15 min bei 11000xg und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde 2x mit 70% Ethanol p.a. gewaschen, wobei nach jedem Waschschrift eine Zentrifugation von 5min bei 9000xg und 4°C erfolgte. Anschließend wurde das Pellet in 20µl sterilem dH<sub>2</sub>O resuspendiert. Um eine Degradation der RNA zu vermeiden, wurden dem Ansatz noch 2µl RNase Inhibitor zugesetzt.

In der Regel erhält man so pro Ansatz etwa 10µg markierte RNA. Diese RNA sowie die Markierung wurde dann durch einen Northern Blot mit Antikörpern gegen Digoxigenin auf ihre Qualität geprüft (siehe 3.6.4).

### 3.6.10 Herstellung des GST-TFIIIA-NES

Um ein gewünschtes Protein als GST-Protein exprimieren lassen zu können, mußte zunächst die gewünschte DNA-Sequenz gewonnen und in den Vektor pGEX-5X-1 (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg) einkloniert werden. Bei Expression dieses Konstruktes in Bakterien hat man ein Fusionsprotein erhalten, das aus der Glutathion-S-Transferase, einem Enzym, das ursprünglich aus *Schistosoma japonicum* stammt und ein Molekulargewicht von 26kDa besitzt, und dem spezifischen Protein besteht. Über den GST-Anteil ist eine Aufreinigung des Proteins möglich. Vor der Expression des Konstruktes, wurde durch Sequenzierung überprüft, ob die einklonierte DNA-Sequenz im richtigen Leseraster inseriert ist.

Nach der beschriebenen Sequenz für das NES des TFIIIA (Fridell et al., 1996) wurden von Invitrogen (Karlsruhe) zwei komplementäre DNA-Primer synthetisiert (siehe 2.2.3). Dabei wurde an das 5'-Ende des forward Primers eine Hälfte der einer EcoRI-Schnittstelle angehängt und an das 5'-Ende des reverse Primers eine Hälfte einer BamHI-Schnittstelle, um ein gerichtetes Klonieren in einen Vektor zu gewährleisten. Des weiteren wurde noch eine vollständige EcoRV Schnittstelle eingesetzt, um die Ligation zu überprüfen. Als Vektor wurde hier der GST-Expressionsvektor pGEX1 verwendet, wobei die Sequenz hinter die GST-Sequenz kloniert wurde, so daß ein GST-NES Fusionsprotein exprimiert werden konnte. Zwischen GST und NES wurde dabei noch ein Linker aus zwei Glycin-Resten gesetzt, was die freie Beweglichkeit des NES garantiert.

#### 3.6.10.1 Hybridisierung der Primer

Zunächst wurden die beiden komplementären Primer langsam hybridisiert, um ein doppelsträngiges DNA-Fragment zu erhalten. Dazu wurden je 10pmol der Primer in ein PCR-Cap gegeben und im Thermocycler unter folgenden Bedingungen hybridisiert:

1 Zyklus:	• initiale Denaturierung:	5min, 96°C
30 Zyklen:	• Hybridisierung	30sec 90°C und pro Zyklus -0,5°C
	• Kühlung:	4°C

### 3.6.10.2 Phosphorylierung der Schnittenden

Um die DNA-Fragmente in den Vektor klonieren zu können, mußten noch die Enden der Schnittstellen durch eine Kinase phosphoryliert werden.

Pipettierschema für die Phosphorylierung von Schnittenden (25µl-Ansatz):

- 5pmol dephosphoryliertes DNA Fragment
- 5µl Forward Reaction Buffer (Life Technologies, Hamburg)
- 1µl T4 Polynucleotide Kinase (10U/µl, Life Technologies, Hamburg)
- 1mM ATP (MBI, StLeon Rot)
- auf 25µl auffüllen mit dH<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde sorgfältig gemischt und für 10min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde abgestoppt und die Kinase deaktiviert durch eine Inkubation von 10min bei 65°C.

### 3.6.10.3 Ligation und Transformation

Dieses, nach der Hybridisierung entstandene doppelsträngige, phosphorylierte DNA-Fragment kann nun in einen Vektor ligiert werden, der ebenfalls mit den Enzymen EcoRI und BamHI geschnitten wurde, so daß sich die jeweiligen Schnittstellen des Inserts und des Primers während der Ligation zusammenlagern können und durch die DNA Ligase verbunden werden.

Als Vektor wurde hier der pGEX1 verwendet (siehe Abb.2.1). Das Pipettierschema für den Restriktionsverdau des pGEX1 mit den beiden Enzymen EcoRI und BamHI entspricht im Wesentlichen dem Pipettierschema für einen Restriktionsverdau (siehe 3.6.9.4).

Pipettierschema für Restriktionsverdau mit EcoRI und BamHI (20µl-Ansatz):



- 1µg pGEX1-Vektor
- 4µl 10x Puffer (Puffer Y<sup>+</sup>/Tango, MBI, St.Leon Rot)
- auf 18µl auffüllen mit dH<sub>2</sub>O
- 1µl EcoRI (MBI, St.Leon Rot)
- 1µl BamHI (MBI, St.Leon Rot)

Der Verdau wurde für 1h bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurden die Enzyme durch eine Inkubation von 10min bei 85°C deaktiviert.

Pipettierschema für einen Standard-Ligationsansatz (20µl):

- 100ng Vektor
- 300ng Insert (ca. 3fache Menge des Vektors)
- 1,5µl 10x T4 DNA-Ligase Puffer (MBI, St.Leon Rot)
- auf 19µl auffüllen mit dH<sub>2</sub>O
- 1µl T4 DNA-Ligase (5U/µl, MBI, St.Leon Rot)

Der Ansatz wurde vermischt und 1h bei RT inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ligationsansatz für eine Transforamtion in kompetente *E. coli* Bakterien vom Stamm BL21 verwendet (siehe 2.1.5). Dabei wurde der Ligationsansatz mit einem Aliquot (100µl) kompetenter Bakterien vermischt und auf Eis für 1h inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 30 sec bei 42°C, nachdem die Bakterien sofort wieder auf Eis gestellt wurden. Dann wurden 900µl LB-Medium zugegeben. Nach einer Inkubation von 1h bei 37°C unter Schütteln wurden die Bakterien auf LB<sub>Amp</sub>-Platten ausplattiert, da auch dieser Vektor eine Ampicillin Resistenz besitzt.

Die gewachsenen Klone wurden über Restriktionsverdau (siehe 3.6.9.4) mit EcoRV auf eine erfolgreiche Ligation hin überprüft.

War die Ligation erfolgreich, wurde das inserierte Fragment auf seine Richtigkeit durch Sequenzierung überprüft (siehe 3.6.8), wobei hier die beiden Primer pGEX 5'-Sequencing Primer und pGEX 3'-Sequencing Primer verwendet wurden (siehe 2.2.3).

## 4. Ergebnisse

### 4.1 eIF-5A ist ein essentieller Cofaktor im Rev-vermittelten RNA Export

Das Rev Protein von HIV-1 ist der zur Zeit am Besten untersuchte, spezifische mRNA Exportfaktor (reviewed in: Pollard & Malim, 1998; Hauber, 2001). Rev ist ein nucleocytoplasmatisches Shuttleprotein, das direkt an seine RRE (*rev response element*) RNA Zielsequenz bindet, die in allen ungespleißten oder teilweise gespleißten viralen mRNAs vorhanden ist. Durch die Interaktion mit zellulären Cofaktoren vermittelt Rev die Translokation dieser RNA über den Kernporenkomplex ins Cytoplasma. Der Bereich von Rev, welcher mit diesen Cofaktoren interagiert, wird als Aktivierungs- oder Effektordomäne bezeichnet und enthält ein kurzes Stück von hydrophoben Aminosäuren, hauptsächlich Leucin, die ein prototypisches Kernexportsignal bilden (Fischer et al., 1995; Wen et al., 1995). Es hat sich gezeigt, daß das primäre Ziel aller Rev-ähnlichen, Leucin-reichen Kernexportsignale der zelluläre Exportrezeptor CRM1/exportin1 ist. Studien mit der Droge Leptomycin B, einem spezifischen Inhibitor von CRM1/exportin1, der eine stabile NES-CRM1/exportin1 Komplexbildung verhindert, haben gezeigt, daß CRM1/exportin1 in der Tat die Translokation aller Exportsubstrate über den NPC vermittelt, die ein Rev-ähnliches NES enthalten (Fornerod et al., 1997a).

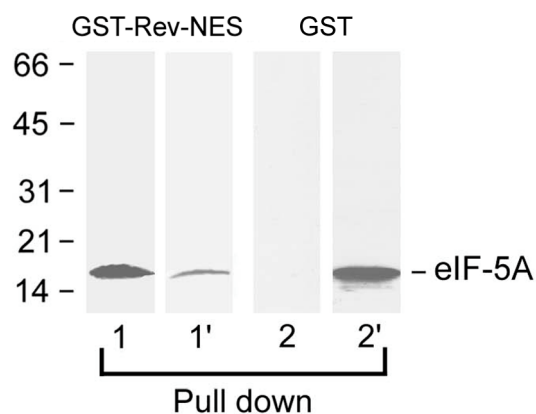
Untersuchungen der HIV-1 Rev Funktion haben jedoch auch zu der Identifikation eines weiteren zellulären Proteins geführt, dem eukaryotischen Initiationsfaktor 5A (eIF-5A) (siehe auch Kap.1.3.1.1) (Ruhl et al., 1993). Es wurden verschiedene eIF-5A Mutanten beschrieben, die die Rev Aktivität und daher HIV-1 Replikation in menschlichen T-Zellen *in trans* blockieren (Bevec et al., 1996; Junker et al., 1996). Des weiteren haben Mikroinjektionsexperimente in somatischen Zellen gezeigt, daß eIF-5A ein essentieller Cofaktor ist, welcher speziell für den Kernexport des HIV-1 Rev Proteins benötigt wird (Elfgang et al., 1999). Unklar ist jedoch, welche genaue Funktion eIF-5A bei diesem Exportprozess hat und an welcher Stelle die eIF-5A Mutanten den Export inhibieren.

Kürzlich wurde gezeigt, daß eIF-5A in *Xenopus* Oocyten an den, mit dem NPC assoziierten, nucleoplasmatischen Fibrillen angereichert ist, mit dem Exportrezeptor CRM1/exportin1 interagiert und selbst CRM1/exportin1 abhängig exportiert wird (Rosorius et al., 1999b).

Basierend auf diesen Ergebnissen, wurde die Rolle von eIF-5A beim Rev-vermittelten Kernexport in *Xenopus laevis* Oocyten im Detail untersucht.

#### 4.1.1 Rev-NES interagiert mit *Xenopus* Oocyten eIF-5A

Es wurde bereits gezeigt, daß Rev-NES sowohl mit eIF-5A aus HeLa-Zellextrakt als auch mit rekombinantem eIF-5A interagiert (Ruhl et al., 1993; Bevec et al., 1996). Um zu untersuchen, ob Rev-NES auch mit *Xenopus* Oocyten eIF-5A interagiert, wurden Bindungsstudien in Lösung durchgeführt (Pull down) (Abb.4.1). Dazu wurde gereinigtes GST-gekoppeltes Rev-NES an Glutathion-Sepharose Beads immobilisiert (siehe 3.2.7) und mit Gesamt-Proteinextrakt aus *Xenopus* Oocyten inkubiert. Das gebundene und ungebundene Material wurde dann, wie unter 3.3.4 beschrieben, durch Immunblot mit einem Antikörper gegen eIF-5A (Elf gang et al., 1999) analysiert. Um zu zeigen, daß die Bindung von eIF-5A spezifisch an das GST-Rev-NES erfolgte, wurde als Kontrolle GST Protein alleine an Glutathion-Sepharose Beads gebunden und mit Gesamt-Proteinextrakt inkubiert.



**Abb.4.1.** Bindung von *Xenopus* Oocyten eIF-5A an GST-Rev-NES, gezeigt im Pull down Experiment.

GST-Rev-NES (Spuren 1 und 1') oder GST (Spuren 2 und 2') wurden an Glutathion-Sepharose Beads gebunden und mit *Xenopus* Oocyten Gesamt-Proteinextrakt inkubiert. Die gebundenen (Spuren 1 und 2) und ungebundenen (Spuren 1' und 2') Fraktionen wurden anschließend pelletiert und für den Immunblot präpariert. Gebundenes und ungebundenes eIF-5A wurde mit Antikörpern, die gegen eIF-5A gerichtet waren, nachgewiesen. *Xenopus* Oocyten eIF-5A bindet spezifisch an GST-Rev-NES (Vergleich Spur 1 mit 2). Die Molekulargewicht-Marker in kDa sind links gezeigt.

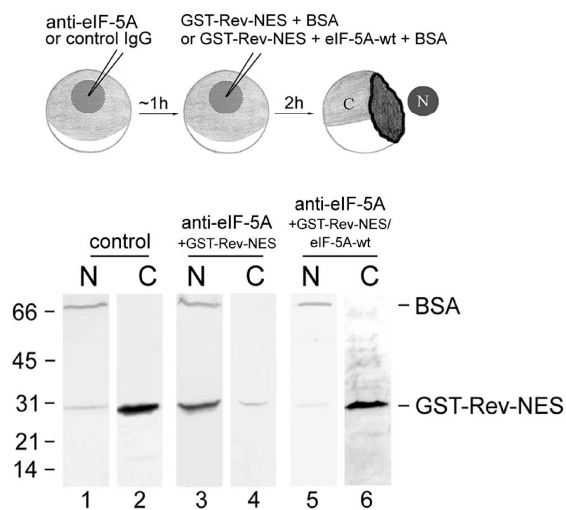
Wie das Pull down Experiment in Abb.4.1 zeigt, bindet auch *Xenopus* Oocyten eIF-5A an das Rev-NES (Spur 1). Diese Bindung ist spezifisch, da es keine Interaktionen von eIF-5A mit dem GST-Protein bzw. mit der Glutathion-Sepharose gibt (vergleiche Spuren 2 und 2').

#### 4.1.2 Antikörper gegen eIF-5A hemmen den Export des Rev-NES in *Xenopus* Oocyten

Es konnte bereits gezeigt werden, daß Antikörper die gegen eIF-5A gerichtet sind, den Kernexport des Rev-NES in *Xenopus* Oocyten inhibieren (Hofmann, W. Diplomarbeit 1999). Dabei wurden eIF-5A Antikörper, wie unter 3.1 beschrieben, in den Kern von *Xenopus* Oocyten injiziert (Abb.4.2: Spuren 1-4). Um zu zeigen, daß der aufgetretene Effekt auf einer

spezifischen Reaktion des Antikörpers beruht, wurde in einem Kontrollexperiment unspezifisches Kaninchen IgG statt des eIF-5A (Kaninchen-) Antikörpers injiziert. Nach einer einstündigen Inkubation, während der der Antikörper an das endogene eIF-5A binden sollte, wurde das GST-Rev-NES als Exportsubstrat in die Kerne injiziert. Um sicherzugehen, daß der Kern bei der Mikroinjektion getroffen wurde, wurde BSA mit dem Exportsubstrat coinjiziert (siehe 3.1.2). In einem parallelen Versuch wurde die Spezifität des verwendeten Antikörpers für eIF-5A nachgewiesen (Abb.4.2: Suren 5 und 6). Nach der Antikörperinjektion wurde GST-Rev-NES zusammen mit rekombinantem eIF-5A-wt (wt: wild type) coinjiziert. Dieses Experiment wurde durchgeführt um zu zeigen, daß exogenes eIF-5A den Effekt, der durch die Blockierung des endogenen eIF-5A durch den Antikörper auftritt, wieder aufheben kann. Nach erneuter zweistündiger Inkubation wurden die Oocyten manuell in Kerne und Cytoplasma getrennt, die Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert (siehe 3.2.1). Anschließend wurde die Lokalisation des Exportsubstrates mit einem GST-Antikörper und das coinjizierte BSA mit einem BSA-Antikörper (siehe 3.3.4) bestimmt.

**Abb.4.2:** Antikörper gegen eIF-5A inhibieren den Kernexport von GST-Rev-NES.



Das Oocyten Injektionsschema ist in der oberen Hälfte gezeigt. Nach Injektion und Inkubation wurden die Oocyten manuell in Kern (N) und Cytoplasma (C) getrennt. Die Proteine wurden durch 18% SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Anschließend wurden die Blots mit Antikörpern gegen eIF-5A und BSA inkubiert. In Anwesenheit des Kontroll-IgG migrierte das meiste GST-Rev-NES vom Kern ins Cytoplasma (Spuren 1 und 2), während Antikörper gegen eIF-5A den Kernexport des GST-Rev-NES deutlich inhibierten (Spuren 3 und 4). Coinjektion von GST-Rev-NES und eIF-5A-wt führt dagegen wieder zu einem Export des GST-Rev-NES (Spuren 5 und 6). Um die Kerninjektion zu kontrollieren, wurde BSA zusammen mit den Exportsubstraten coinjiziert. Die ausschließliche Präsenz von BSA in den Kernen bestätigt daher die Spezifität der Kerninjektion (Spuren 1, 3 und 5).

Die Molekulargewicht-Marker in kDa sind links gezeigt.

Wie erwartet, wurde die BSA Injektionskontrolle ausschließlich im Kern gefunden (Abb.4.2: Spuren 1, 3 und 5). In Übereinstimmung mit früheren Daten (Fornerod et al., 1997a; Ullman et al., 1999) wird, in den Kern injiziertes GST-Rev-NES in *Xenopus* Oocyten schnell aus dem Kern ins Cytoplasma exportiert (Abb.4.2: Spuren 1 und 2). Im Gegensatz dazu wird dieser Kernexport deutlich durch Antikörper, die gegen eIF-5A gerichtet sind, inhibiert (Spuren 3 und 4). Die spezifische Inhibition durch eIF-5A Antikörper konnte nach Comikroinjektion des Exportsubstrates mit rekombinantem eIF-5A-wt gezeigt werden. Die Zugabe des exogenen eIF-5A führte dazu, daß der Export des GST-Rev-NES wieder stattfinden konnte (Spuren 5 und 6).

#### **4.1.3 Antikörper gegen eIF-5A hemmen den Rev-vermittelten RNA Export in *Xenopus* Oocyten**

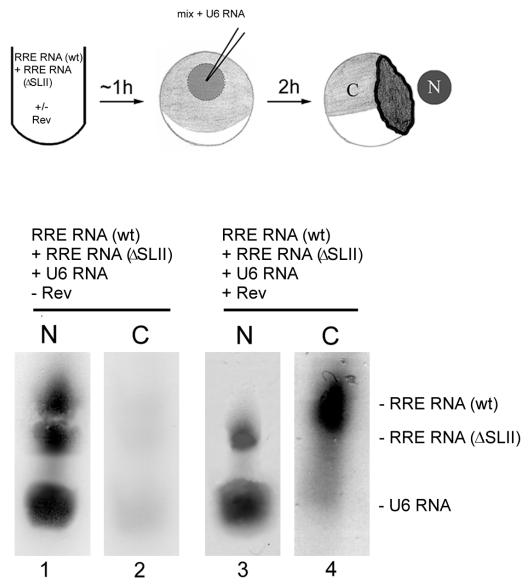
Als nächstes wurde mit dem gleichen experimentellen Versuchsansatz der Rev-vermittelte Kernexport von RNA, die von HIV-1 stammt, untersucht (Abb.4.3). Dazu wurde die RRE Zielsequenz radioaktiv durch *in vitro* Transkription markiert und in Kerne von *Xenopus* Oocyten injiziert (siehe 2.2.5 und 3.1).

Zunächst wurde untersucht, ob der Export dieser *in vitro* transkribierten RRE RNA durch Rev vermittelt wird. Die RRE RNA wurde entweder mit GST Protein oder mit GST-Rev in den Kern coinjiziert (Abb.4.3: Spuren 1 und 3). Als Kontrolle für eine akkurate Kerninjektion diente hier exportdefiziente U6 RNA, die zusammen mit den Exportsubstraten coinjiziert wurde. Zusätzlich wurde eine RRE Mutante (RRE  $\Delta$ SLII) coinjiziert, bei der die Stem Loop II-Sequenz entfernt wurde, um das Exportverhalten dieser Mutante zu analysieren (Abb.4.3: Spuren 3 und 4).

Nach der Mikroinjektion und einer Inkubation von 2h wurden Kerne und Cytoplasma getrennt. Anschließend wurden Gesamt-RNA aus Kern und Cytoplasma isoliert (siehe 3.5.1). Die verschiedenen RNAs wurden dann mittels Gelelektrophorese und Autoradiographie, wie unter 3.5.2 und 3.5.3 beschrieben, lokalisiert.

Wie vermutet, verbleibt die RRE RNA Zielsequenz ohne Rev Protein im Kern (Abb.4.3: Spuren 1 und 2), während sie nach Zugabe von Rev effizient aus dem Kern exportiert wird (Abb. 4.3: Spuren 3 und 4). Die ausschließliche Präsenz der exportdefizienten U6 RNA im Kern, zeigt auch hier die Genauigkeit der Kerninjektion (Abb.4.3: Spuren 1 und 3).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, daß die Stem Loop II-Sequenz essentiell für den Export der RNA ist, da die Mutante RRE  $\Delta$ SLII auch nach Zugabe von Rev im Kern verbleibt (Abb.4.3: Spuren 1 und 3).



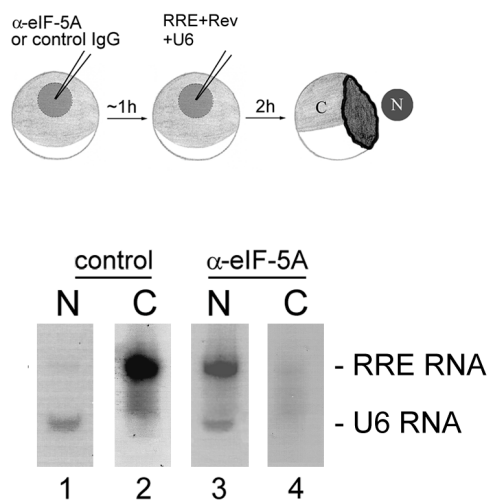
**Abb.4.3:** RRE RNA wird nur nach Zugabe von Rev effizient aus dem Kern exportiert.

Das Oocyten Injektionsschema ist in der oberen Hälfte gezeigt. Nach Injektion und Inkubation wurden die Oocyten manuell in Kern (N) und Cytoplasma (C) getrennt. Nach Isolierung der Gesamt-RNA wurde diese über ein 6% RNA-Acrylamidgel aufgetrennt und die injizierte RNA wurde mittels Autoradiographie lokalisiert. RRE RNA, die zusammen mit GST injiziert wurde, verbleibt im Kern (Spuren 1 und 2), während RRE RNA, die zusammen mit GST-Rev injiziert wurde, effizient exportiert wird (Spuren 3 und 4). Die RRE Mutante  $\Delta$ SLII verbleibt auch nach der Zugabe von Rev im Kern (Spuren 1 und 3). Die ausschließliche Präsenz der coinjizierten, exportdefizienten U6 RNA bestätigt die Genauigkeit der Kerninjektion (Spuren 1 und 3).

Um den Effekt von eIF-5A auf den Rev-vermittelten RNA Kernexport zu untersuchen, wurden Antikörper gegen eIF-5A, oder in einem parallelen Kontrollexperiment, unspezifisches IgG in den Kern von *Xenopus* Oocyten injiziert (Abb.4.4). Nach 1h wurde die radioaktiv markierte RRE RNA zusammen mit GST-Rev und exportdefizienter U6 RNA als Injektionskontrolle injiziert. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 2h wurden Kern und Cytoplasma manuell getrennt und aus beiden Fraktionen Gesamt-RNA isoliert, die dann über ein 6%iges RNA-Acrylamidgel aufgetrennt wurde. Durch anschließende Autoradiographie konnten die injizierten RNAs dann lokalisiert werden.

In Übereinstimmung mit den oben bereits erwähnten Daten wird die RRE RNA durch GST-Rev, in Anwesenheit von unspezifischem IgG, effizient aus dem Kern ins Cytoplasma transportiert (Abb.4.4: Spuren 1 und 2). Antikörper gegen eIF-5A dagegen, inhibieren auch den Rev-vermittelten RNA Export (Abb.4.4: Spuren 3 und 4), wie sie auch den Export des Rev-NES inhibiert haben (Abb.4.2).

eIF-5A ist also in der Tat ein Faktor der essentiell für den Export des Rev und für den Rev-vermittelten RNA Export von HIV-1 in *Xenopus* Oocyten ist.



**Abb.4.4:** Antikörper gegen eIF-5A inhibieren den Rev-vermittelten RRE RNA Export.

Das Oocyten Injektionsschema ist in der oberen Hälfte gezeigt. Nach Injektion und Inkubation wurden die Oocyten manuell in Kern (N) und Cytoplasma (C) getrennt. Nach Isolierung der Gesamt-RNA wurde diese über ein 6% RNA-Acrylamidgel aufgetrennt und die injizierte RNA wurde mittels Autoradiographie lokalisiert. In Anwesenheit von unspezifischem IgG wird die injizierte RRE RNA mittels Rev exportiert (Spuren 1 und 2). Antikörper gegen eIF-5A dagegen, inhibieren den Rev-vermittelten RRE RNA Export (Spuren 3 und 4). Die ausschließliche Präsenz der coinjizierten, exportdefizienten U6 RNA bestätigt die Genauigkeit der Kerninjektion (Spuren 1 und 3).

#### 4.1.4 eIF-5A ist nicht am CTE-vermittelten RNA Export beteiligt

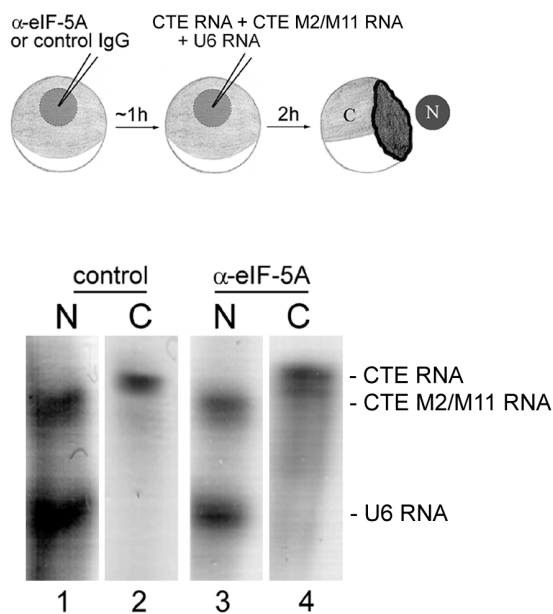
Alle Retroviren müssen Intron-enthaltende, ungespleißte mRNA aus dem Kern exportieren. Einfache Retroviren, wie das Typ D Retrovirus MPMV (Mason-Pfizer Monkey Virus), codieren jedoch nicht für einen viralen Trans-Aktivator wie Rev. Im RNA-Genom dieser Viren befindet sich eine *cis*-aktive Struktur, das sogenannte CTE (constitutive transport element), die den effizienten Export ihrer ungespleißten RNAs vermittelt (Bray et al., 1994; Ernst et al., 1997b; Pasquinelli et al., 1997; Saavedra et al., 1997). Im Gegensatz zum Rev-vermittelten RNA Export, hängt der CTE-vermittelte Export ausschließlich von zellulären Faktoren, wie dem Protein TAP ab (siehe auch Kap.1.3.1). Von großer Bedeutung ist hierbei, daß sich der CTE-TAP-vermittelte RNA Export anscheinend vom Rev-vermittelten RNA Exportweg des HIV-1 unterscheidet (Bogerd et al., 1998; Kang & Cullen, 1999).

Daher sollte eine Inhibition des Rev Exportes die Translokation der CTE-enthaltenden RNA über die Kernpore nicht negativ beeinflussen. Um dies zu untersuchen, wurde der Effekt von eIF-5A Antikörpern auf den Kernexport des prototypischen MPMV-CTE (Ernst et al., 1997b) analysiert (Abb.4.5).

Antikörper gegen eIF-5A bzw. unspezifisches IgG als Kontrolle wurden in den Kern injiziert, 1h vor Injektion radioaktiv-markierter MPMV-CTE RNA.. Auch hier diente als Injektionskontrolle exportdefiziente U6 RNA. Zusätzlich wurde noch das Exportverhalten

einer CTE-Mutante (M2/M11; Pasquinelli et al., 1997) untersucht, bei der zwei Repeat-Strukturen entfernt wurden, die essentiell für die Bindung zellulärer Faktoren sind.

Nach 2h Inkubation wurden Kern und Cytoplasma getrennt, Gesamt-RNA aus den einzelnen Fraktionen isoliert und diese über ein 6%iges RNA-Acrylamidgel aufgetrennt (siehe 3.6.1 und 3.6.2). Anschließende Autoradiographie (siehe 3.6.3) zeigte, in welcher Fraktion sich die injizierten RNAs befand.



**Abb.4.5:** Antikörper gegen eIF-5A inhibieren nicht den CTE-vermittelten RNA Export.

Das Oocyten Injektionsschema ist in der oberen Hälfte gezeigt. Nach Injektion und Inkubation wurden die Oocyten manuell in Kern (N) und Cytoplasma (C) getrennt. Nach Isolierung der Gesamt-RNA wurde diese über ein 6% RNA-Acrylamidgel aufgetrennt und die injizierte RNA wurde mittels Autoradiographie lokalisiert. CTE RNA Export findet sowohl in Anwesenheit von unspezifischem IgG (Spuren 1 und 2), als auch in Anwesenheit von Antikörpern, die gegen eIF-5A gerichtet sind (Spuren 3 und 4), statt. Dies deutet darauf hin, daß eIF-5A keine Rolle im CTE-vermittelten RNA Export spielt. Die CTE-Mutante (M2/M11) ist exportdefizient und verbleibt nach der Injektion im Kern (Spuren 1 und 3). Die Kernlokalisation der U6 RNA bestätigt die korrekte Kerninjektion (Spuren 1 und 3).

Wie in Abb.4.5 gezeigt, wurde die CTE RNA in Anwesenheit von unspezifischem IgG gut aus dem Kern in das Cytoplasma exportiert (Spuren 1 und 2). Bei der CTE-Deletionsmutante M2/M11 dagegen, handelt es sich um eine exportdefiziente Mutante, da sie nur im Kern detektierbar ist und nicht exportiert wurde (Spuren 1 und 3). Im Gegensatz zum Rev-vermittelten RNA Export findet hier keine Inhibition des CTE-vermittelten RNA Exportes in Anwesenheit von Antikörpern, die gegen eIF-5A gerichtet sind, statt (vergleiche Abb.4.4: Spuren 3 und 4 mit Abb.4.5: Spuren 3 und 4).

Dieses Ergebnis zeigt, daß eIF-5A, im Gegensatz zum Rev-vermittelten RNA Export, keine Rolle im CTE-vermittelten RNA Export spielt.



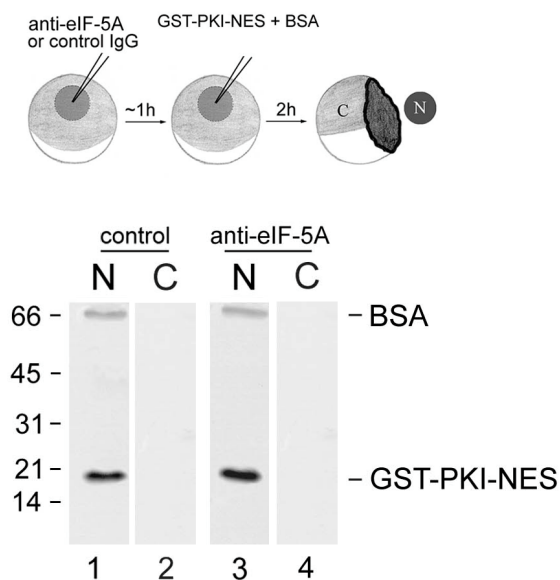
#### 4.1.5 eIF-5A ist nicht am Export des PKI-NES beteiligt

In somatischen Zellen wurde gezeigt, daß eIF-5A für den Kernexport des Rev-NES aber nicht für den Kernexport des PKI-NES erforderlich ist (Elfgang et al., 1999). Daher wurde nun die Rolle von eIF-5A beim Export des PKI-NES in *Xenopus* Oocyten untersucht.

Antikörper gegen eIF-5A oder Kontroll IgG wurden in den Kern von *Xenopus* Oocyten injiziert. Nach 1h wurde GST-PKI-NES zusammen mit BSA coinjiziert (Abb.4.6). Nach einer weiteren Inkubationszeit von 2h wurden Kern und Cytoplasma getrennt, die Proteine über 18% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit Antikörpern gegen GST und BSA inkubiert (siehe 3.1-3.3).

Überraschenderweise verblieb das PKI-NES auch in Anwesenheit des unspezifischen IgG im Kern (Abb.4.6: Spuren 1 und 3). Auch nach längeren Inkubationszeiten von bis zu 24h (Daten nicht gezeigt), ließ sich kein Export des PKI-NES nachweisen (siehe auch Kap.4.6: Kernexport anderer NES-enhaltender Proteine).

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, daß es trotz aller Ähnlichkeiten und Vorteilen des *Xenopus* Modellsystems, doch entscheidende Unterschiede zwischen den zellulären Vorgängen in *Xenopus* Oocyten und somatischen Zellen gibt.



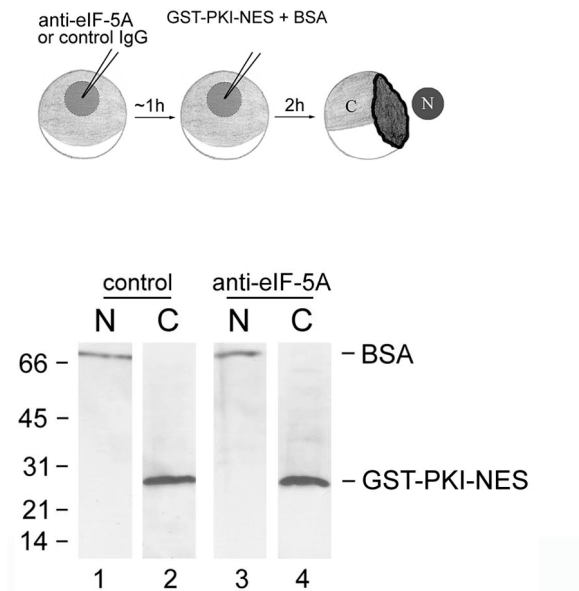
**Abb.4.6:** GST-PKI-NES wird in *Xenopus* Oocyten nicht exportiert.

Das Oocyt Injektionsschema ist in der oberen Hälfte gezeigt. Nach Injektion und Inkubation wurden die Oocyten manuell in Kern (N) und Cytoplasma (C) getrennt. Die Proteine wurden durch 18% SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Anschließend wurden die Blots mit Antikörpern gegen GST und BSA inkubiert. GST-PKI-NES verbleibt sowohl in Anwesenheit des unspezifischen IgG (Spuren 1 und 2) als auch in Anwesenheit des eIF-5A-Antikörpers im Kern (Spuren 3 und 4).

Die Molekulargewicht-Marker in kDa sind links gezeigt.

Dieses Mikroinjektionsexperiment wurde dann mit *Xenopus* Oocyten wiederholt, die aus Gonadotropin-Hormon induzierten Tieren stammten (Abb.4.7). Durch die Gabe von Gonadotropin wurden die Frösche zum Ablaihen gebracht (siehe 3.1). 24h nach dem

Ablaichen wurde Ovar entnommen. Die relativ wenigen, nach dem Ablaichen übrig gebliebenen Stadium VI Oocyten wurden dann für die Mikroinjektion verwendet.



**Abb.4.7:** eIF-5A ist nicht in den Export des PKI-NES in *Xenopus* Oocyten aus Hormon-induzierten Fröschen involviert.

Das Oocyten Injektionsschema ist in der oberen Hälfte gezeigt. Nach Injektion und Inkubation der Oocyten, wurden diese manuell in Kern (N) und Cytoplasma (C) getrennt. Die Proteine wurden durch 18% SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Anschließend wurden die Blots mit Antikörpern gegen GST und BSA inkubiert. GST-PKI-NES wird sowohl in Anwesenheit des unspezifischen IgG (Spuren 1 und 2) als auch in Anwesenheit des eIF-5A Antikörpers effizient aus dem Kern exportiert (Spuren 3 und 4). Die Molekulargewicht-Marker in kDa sind links gezeigt.

Erstaunlicherweise erfolgte ein Export des GST-PKI-NES in diesen Oocyten, die aus Hormon-behandelten Tieren stammen. Eine Export erfolgte dabei sowohl in Gegenwart des unspezifischen IgG (Abb.4.7: Spuren 1 und 2), als auch in Gegenwart von Antikörpern, die gegen eIF-5A gerichtet sind (Spuren 3 und 4). Diese Ergebnisse zeigen, daß eIF-5A in *Xenopus* Oocyten keine Rolle beim Export des PKI-NES spielt, wie es auch in somatischen Zellen beschrieben wurde (Elfgang et al., 1999).

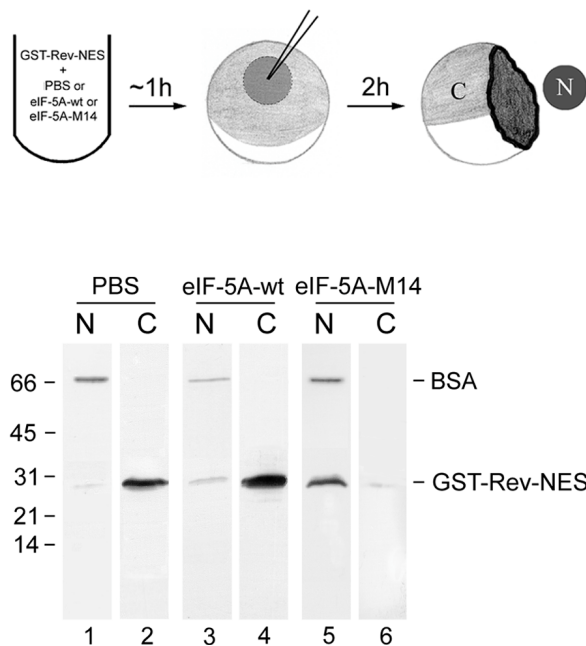
#### 4.1.6 Die eIF-5A Mutante M14 inhibiert den Kernexport des Rev-NES und den Rev-vermittelten RNA Export in *Xenopus* Oocyten

Kürzlich wurde gezeigt, daß konstitutive Expression eines eIF-5A Mutantengens (eIF-5A-M14) in menschlichen T-Zellen, die HIV-1 Replikation in diesen Zellen inhibiert (Bevec et al., 1996; Junker et al., 1996). Mikroinjektionsexperimente in somatischen Zellen haben gezeigt, daß eIF-5A-M14 zwar an Rev bindet, jedoch aus einem noch unbekanntem Grund den Export des Rev Proteins inhibiert, was den inhibitorischen Phänotyp bezüglich der HIV-1 Replikation erklärt (Elfgang et al., 1999).

Um diesen Effekt in *Xenopus* Oocyten zu analysieren, wurde GST-Rev-NES zunächst vor der Injektion für 1h auf Eis mit rekombinantem eIF-5A-wt oder eIF-5A-M14 bzw. PBS inkubiert. Während dieser Inkubationszeit kann das exogene eIF-5A an das Rev-NES binden. Durch den hohen Überschuss an exogenem eIF-5A sollten alle Bindungsstellen am Rev-NES abgesättigt werden, so daß das endogene eIF-5A in den Oocyten nicht mehr binden kann.

Anschließend wurden diese Mischungen zusammen mit BSA als Injektionskontrolle in den Kern injiziert (Abb.4.8). Nach 2h Inkubation wurden Kern und Cytoplasma manuell getrennt, die Proteine über 18% SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert, die dann mit GST- bzw. BSA-Antikörpern inkubiert wurde (siehe 3.1-3.3).

Wie die Abb.4.8 zeigt, wurde durch die Inkubation des Rev-NES mit eIF-5A-M14 der Export des Rev-NES eindeutig inhibiert (Spuren 5 und 6). Dagegen wurde GST-Rev-NES in Anwesenheit von PBS (Spuren 1 und 2) oder eIF-5A-wt (Spuren 3 und 4) effizient aus dem Kern exportiert.

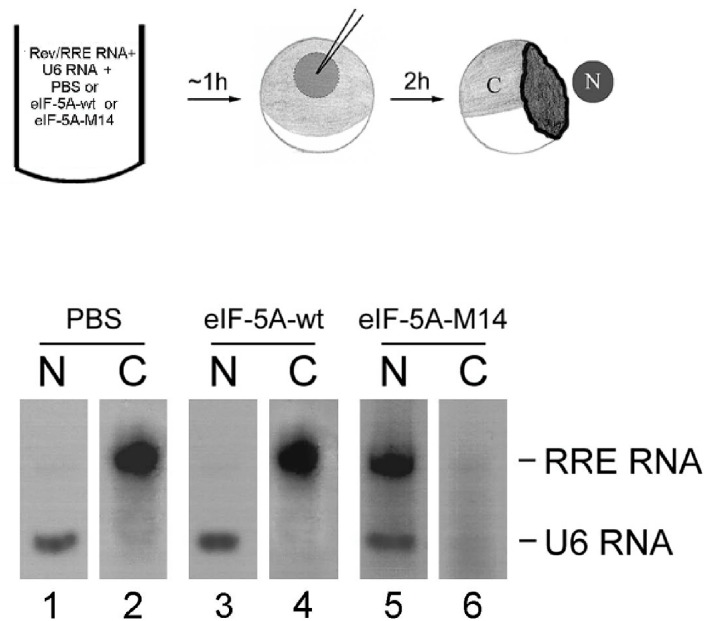


**Abb.4.8:** Inhibition des Kernexportes von GST-Rev-NES durch die eIF-5A-M14 Mutante.

Das Oocyten Injektionsschema ist in der oberen Hälfte gezeigt. Vor der Kerninjektion wurde das Exportsubstrat GST-Rev-NES für 1h auf Eis mit rekombinantem eIF-5A-wt, eIF-5A-M14 oder PBS inkubiert. Nach Injektion und Inkubation wurden die Kern-(N) bzw. Cytoplasma-(C) Proteine über 18% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und diese dann mit Antikörpern gegen GST bzw. BSA inkubiert. In Anwesenheit von PBS und eIF-5A-wt wird GST-Rev-NES effizient aus dem Kern ins Cytoplasma exportiert (Spuren 2 und 4). Im Gegensatz dazu wird der Export deutlich durch die eIF-5A Mutante M14 inhibiert (Spuren 5 und 6). Die ausschließliche Präsenz des coinjizierten, exportdefizienten BSA in den Kernen, bestätigt die korrekte Kerninjektion (Spuren 1, 3 und 5). Die Molekulargewicht-Marker in kDa sind links gezeigt.

Wie erwartet, wurde auch der Rev-vermittelte RRE RNA Export durch die eIF-5A Mutante M14 inhibiert, wie die Abb.4.9 deutlich zeigt. Hier wurde radioaktiv markierte RRE RNA mit Rev Protein für 1h auf Eis mit eIF-5A-wt, eIF-5A-M14 oder PBS inkubiert und anschließend zusammen mit exportdefizienter U6 RNA in *Xenopus* Oocytenkerne injiziert. Nach einer Inkubation von 2h wurden Kerne und Cytoplasma getrennt, die Gesamt-RNA isoliert und über ein 6%iges RNA-Acrylamidgel aufgetrennt. Die injizierten RNAs wurden anschließend durch

Autoradiographie lokalisiert. Während eine Inkubation des Rev/RRE RNA Komplexes mit eIF-5A-wt und PBS keinen Einfluß auf den RRE RNA Export hatte (Spuren 2 und 4), wurde durch die eIF-5A Mutante M14 der Rev-vermittelte RRE RNA Export eindeutig inhibiert (Spuren 5 und 6).



**Abb.4.9:** Rev-vermittelter RNA Export wird durch die eIF-5A Mutante M14 inhibiert.

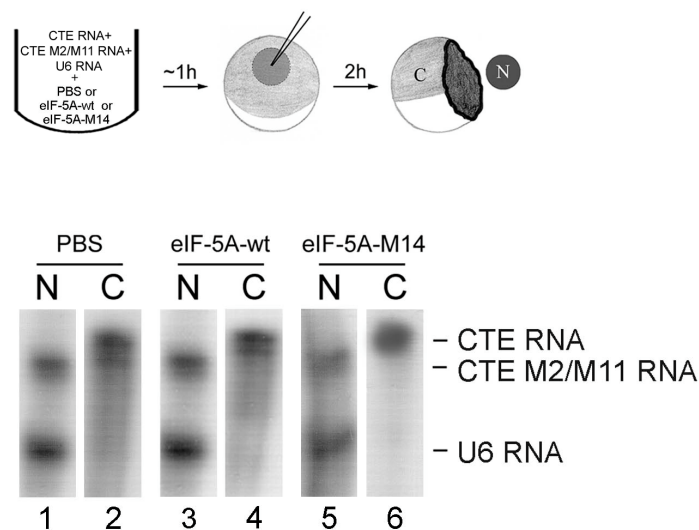
Das Oocyten Injektionsschema ist in der oberen Hälfte gezeigt. Vor der Kerninjektion wurde der Rev/RRE RNA-Komplex für 1h auf Eis mit rekombinantem eIF-5A-wt, eIF-5A-M14 oder PBS inkubiert. Nach Injektion und Inkubation wurden die Oocyten manuell in Kern (N) und Cytoplasma (C) getrennt. Nach Isolierung der Gesamt-RNA wurde diese über ein 6% RNA-Acrylamidgel aufgetrennt und die injizierte RNA wurde mittels Autoradiographie lokalisiert. In Anwesenheit von PBS oder eIF-5A-wt wird die RRE RNA effizient aus dem Kern ins Cytoplasma exportiert (Spuren 2 und 4). Im Gegensatz dazu, wird der Export durch die eIF-5A Mutante M14 inhibiert (Spuren 5 und 6). Die ausschließliche Präsenz der coinjizierten, exportdefizienten U6 RNA bestätigt die Genauigkeit der Kerninjektion (Spuren 1, 3 und 5).

#### 4.1.7 Die eIF-5A Mutante M14 hat keinen Einfluß auf den CTE-vermittelten RNA Export

Wie bereits unter 4.1.4 gezeigt, haben Antikörper die gegen eIF-5A gerichtet sind keinen Einfluß auf den CTE-TAP-vermittelten RNA Export. Aufgrund dessen kann man davon ausgehen, daß eIF-5A keine Rolle bei diesem Exportweg spielt. Daher sollte auch die eIF-5A Mutante M14 keinen inhibitorischen Effekt auf den Export der CTE-RNA haben. Um dies zu untersuchen, wurde CTE RNA bzw. die CTE Mutante M2/M11 vor der Injektion mit rekombinantem eIF-5A-wt bzw. M14 Protein oder PBS als Kontrolle für 1h auf Eis inkubiert. Nach der Coinjektion dieser Mischung, zusammen mit exportdefizienter U6 RNA und

anschließender Inkubation für 2h, wurden Kerne und Cytoplasma manuell isoliert, Gesamt-RNA isoliert und diese über ein 6%iges RNA-Acrylamidgel, wie unter 3.6.1-3.6.3 beschrieben, aufgetrennt, gefolgt von Autoradiographie (Abb.4.10).

Wie erwartet, wird die CTE RNA sowohl in Anwesenheit von eIF-5A-wt und PBS, als auch in Anwesenheit der eIF-5A-M14 Mutante aus dem Kern exportiert (siehe Abb.4.7, Spuren 2, 4 und 6). Dieses Ergebnis zeigt erneut, daß eIF-5A nicht im CTE-vermittelten RNA Export involviert ist.



**Abb.4.10:** CTE-vermittelter RNA Export wird nicht durch eIF-5A-M14 inhibiert.

Das Oocyten Injektionsschema ist in der oberen Hälfte gezeigt. Vor der Kerninjektion wurde die CTE RNA für 1h auf Eis mit rekombinantem eIF-5A-wt, eIF-5A-M14 oder PBS inkubiert. Nach Injektion und Inkubation wurden die Oocyten manuell in Kern (N) und Cytoplasma (C) getrennt. Nach Isolierung der Gesamt-RNA wurde diese über ein 6% RNA-Acrylamidgel aufgetrennt und die injizierte RNA wurde mittels Autoradiographie lokalisiert. Kernexport der CTE RNA wird weder durch PBS (Spur 2), eIF-5A-wt (Spur 4) noch durch die eIF-5A Mutante M14 (Spur 6) inhibiert. Die CTE-Mutante (M2/M11) ist exportdefizient und verbleibt nach der Injektion im Kern (Spuren 1, 3 und 5).

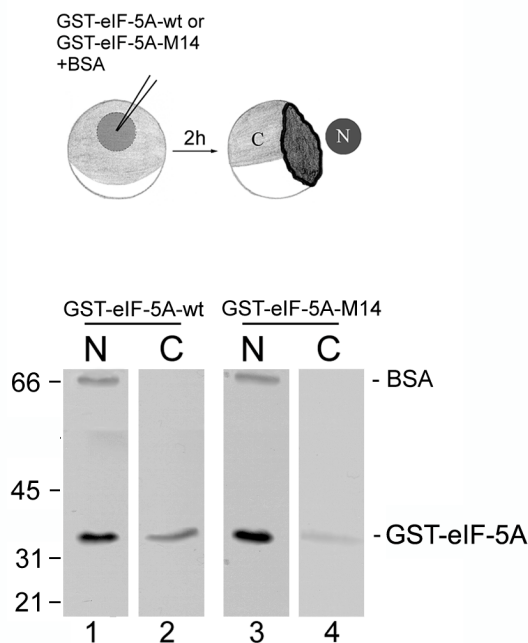
Die Kernlokalisierung der U6 RNA bestätigt die Genauigkeit der Kerninjektion (Spuren 1, 3 und 5).

Zusammenfassend zeigen diese Injektionsexperimente mit Antikörpern gegen eIF-5A und der eIF-5A Mutante M14, daß eIF-5A in der Tat eine essentielle Rolle beim Kernexport des Rev-NES und beim Rev-vermittelten RNA Export in *Xenopus* Oocyten spielt. Des weiteren zeigen sie, daß eIF-5A anscheinend ein Exportfaktor ist, der spezifisch für diesen Rev-vermittelten Exportweg ist, da er nicht in den CTE-TAP-vermittelten Kernexport und auch nicht in den Kernexport des PKI-NES involviert ist.

Die bisherigen Ergebnisse erklären jedoch nicht die genaue Funktion von eIF-5A in diesem Exportweg und warum die eIF-5A Mutante M14 den Export inhibiert. Um dies zu klären wurden die folgenden Experimente durchgeführt.

#### 4.1.8 Die eIF-5A Mutante M14 wird nicht aus dem Kern exportiert

Da bereits gezeigt werden konnte, daß rekombinantes eIF-5A nach Mikroinjektion in den Kern somatischer Zellen aus diesem exportiert wird (Rosorius et al., 1999b), wurde zunächst untersucht, ob die eIF-5A Mutante M14 auch noch aus dem Kern ins Cytoplasma gelangt. Dazu wurde rekombinantes GST-eIF-5A-wt bzw. GST-eIF-5A-M14 zusammen mit der Injektionskontrolle BSA in den Kern von *Xenopus* Oocyten injiziert (Abb.4.11). Nach 2h Inkubation wurden Kerne und Cytoplasma getrennt und die Lokalisation der injizierten Proteine wurde mit GST- bzw. BSA-Antikörpern nachgewiesen.



**Abb.4.11:** eIF-5A-M14 wird nicht exportiert.

Das Oocyten Injektionsschema ist in der oberen Hälfte gezeigt. 2 Stunden nach der Injektion von GST-eIF-5A-wt bzw. eIF-5A-M14 in den Kern von *Xenopus* Oocyten wurden Kerne (N) und Cytoplasma (C) manuell isoliert. Die Proteine wurden über 18% SDS-PAGE getrennt und die Blots anschließend mit Antikörpern gegen GST bzw. BSA inkubiert. Eine wesentliche Menge an injiziertem GST-eIF-5A-wt wurde ins Cytoplasma exportiert (Spuren 1 und 2). Im Gegensatz dazu verbleibt das meiste des injizierten eIF-5A-M14 im Kern (Spuren 3 und 4). Die ausschließliche Präsenz von BSA im Kern bestätigt die Genauigkeit der Kerninjektion (Spuren 1 und 3). Die Molekulargewicht-Marker in kDa sind links gezeigt.

In Übereinstimmung mit früheren Daten aus somatischen Zellen (Rosorius et al., 1999b), wurde eine wesentliche Menge des, in den Kern injizierten GST-eIF-5A-wt in das Cytoplasma exportiert (siehe Abb.4.11: Spuren 1 und 2). Im Gegensatz dazu verblieb GST-eIF-5A-M14 in den injizierten Kernen (Spuren 3 und 4), was bedeutet, daß die eIF-5A-Mutante M14 selbst nicht mehr exportiert wird.



#### 4.1.9 Die eIF-5A Mutante M14 bindet nicht an CRM1/exportin1

Mit Hilfe von Overlay Blot Assays und Bindungsstudien in Lösung konnte bereits gezeigt werden, daß eIF-5A mit dem generellen Exportrezeptor CRM1/exportin1 interagiert und in Abhängigkeit von diesem exportiert wird (Rosorius et al., 1999b).

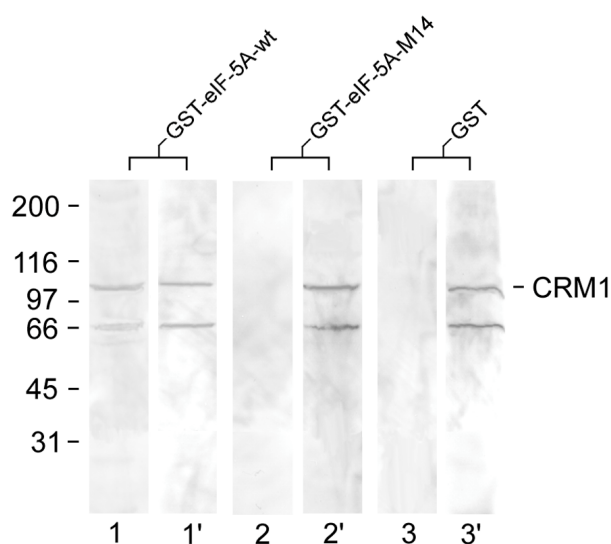
Da die eIF-5A Mutante M14 nicht mehr aus dem Kern exportiert wird, wurde als nächstes mit Hilfe eines Pull down Assays untersucht, ob sie noch an den Exportrezeptor CRM1/exportin1 bindet (Abb.4.12). Dazu wurde GST gekoppeltes eIF-5A-wt bzw. eIF-5A-M14 verwendet, sowie Gesamtprotein Extrakt aus Stadium VI Oocyten. Dieser Gesamt-Proteinextrakt hat den Vorteil, daß auch für die Interaktion zwischen eIF-5A und CRM1/exportin1 eventuell benötigte Cofaktoren vorhanden sind.

GST-eIF-5A-wt, GST-eIF-5A-M14 oder GST alleine wurde an Glutathion-Sepharose Beads immobilisiert und mit dem Gesamt-Proteinextrakt inkubiert (siehe 3.2.7). Die Beads wurden durch Zentrifugation pelletiert und das gebundene und ungebundene Material wurde mittels Immunblot, unter Verwendung eines CRM1-spezifischen Antiserums (Kudo et al., 1997) analysiert.

Wie in Abb.4.12 gezeigt, hat exogenes CRM1/exportin1 in Übereinstimmung mit früheren Daten an eIF-5A-wt gebunden (Spur 1). Interessanterweise war die eIF-5A-M14 Mutante nicht mehr in der Lage an CRM1/exportin1 zu binden (Spur 2).

Aufgrund dieser Unfähigkeit von eIF-5A-M14 mit dem Exportrezeptor CRM1/exportin1 zu interagieren, erklärt sich natürlich auch die Exportunfähigkeit dieser Mutante.

Bei der kreuzreagierenden Proteinbande von ca. 66kDa scheint es sich im Übrigen um ein spezifisches CRM1/exportin1 Abbauprodukt zu handeln (Rosorius et al., 1999b).



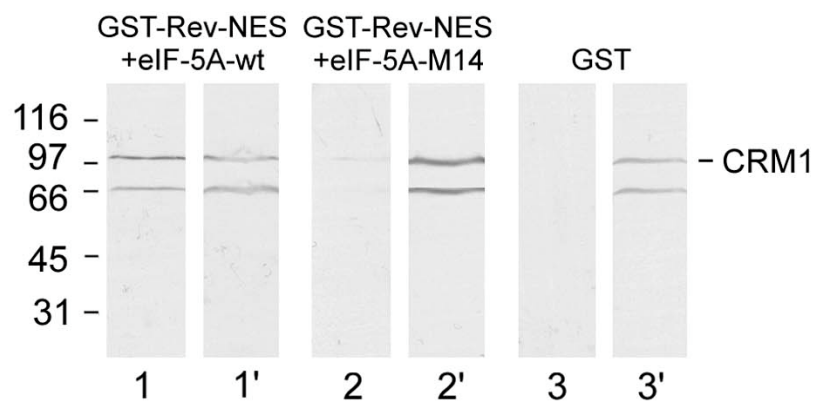
**Abb.4.12:** eIF-5A-M14 interagiert nicht mit dem Exportrezeptor CRM1/exportin1.

Glutathion-Sepharose Beads an die die GST-Fusionsproteine eIF-5A-wt, eIF-5A-M14 bzw. GST gekoppelt waren, wurden mit Gesamt-Proteinextrakt aus *Xenopus* Oocyten inkubiert. Gebundene und ungebundene Proteine wurden über 12% SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunblot mit einem CRM1/exportin1 Antiserum analysiert. Die gebundenen Fraktionen sind in den Spuren 1, 2 und 3 gezeigt und die ungebundenen Fraktionen in den Spuren 1', 2' und 3'. CRM1/exportin1 bindet an eIF-5A-wt (Spur 1) aber nicht an eIF-5A-M14 (Spur 2) und nicht an GST alleine (Spur 3).

Die Molekulargewicht-Marker in kDa sind links gezeigt.

#### 4.1.10 eIF-5A ist ein Adapter, der die Bindung des Exportrezeptors CRM1/exportin1 an Rev-NES vermittelt

Um den inhibitorischen Phänotyp der eIF-5A Mutante M14 beim Kernexport des Rev-NES und beim Rev-vermittelten RNA Export aufzuklären wurde untersucht, ob eIF-5A vielleicht ein Rev-CRM1/exportin1 Bindungsadapter ist. Dazu wurde in einem Pull down Assay GST-Rev-NES Fusionsprotein oder GST alleine an Glutathion-Sepharose Beads immobilisiert und dann mit einem 10fachen Überschuß an rekombinantem eIF-5A-wt bzw. eIF-5A-M14 inkubiert, um eine Absättigung der Rev-NES Bindungsstellen zu erreichen (Abb.4.13). Danach wurde Gesamt-Proteinextrakt aus Oocyten dazugegeben und die relative Menge an gebundenem und ungebundenem CRM1/exportin1, wie unter 3.2.7 beschrieben, bestimmt. Wie in Abb.4.13 gezeigt, hat CRM1/exportin1 effizient an das Rev-NES in Anwesenheit von rekombinantem eIF-5A-wt gebunden (Spur 1). Im Gegensatz dazu fand keine Bindung des Exportrezeptors an Rev-NES statt, welches vorher mit der eIF-5A Mutante M14 inkubiert wurde (Spur 2) und auch keine Bindung an GST (Spur 3).



**Abb.4.13:** eIF-5A-M14 verhindert eine Bindung von CRM1/exportin1 an Rev-NES.

GST-Rev-NES oder GST als Kontrolle, immobilisiert an Glutathion-Sepharose Beads, wurde mit eIF-5A-wt bzw. eIF-5A-M14 inkubiert, bevor Gesamt-Proteinextrakt aus Oocyten dazugegeben wurde. Gebundene (Spuren 1, 2 und 3) und ungebundene (Spuren 1', 2' und 3') Proteine wurden über 12% SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunblot mit einem CRM1/exportin1 Antiserum analysiert. CRM1/exportin1 bindet nur in Anwesenheit von eIF-5A-wt an Rev-NES (Spur 1) und nicht nach Inkubation des Rev-NES mit eIF-5A-M14 (Spur 2) und nicht an GST alleine (Spur 3).

Die Molekulargewicht-Marker in kDa sind links gezeigt.



Um die Reihenfolge der Interaktion zwischen Rev, CRM1/exportin1 und eIF-5A zu bestimmen, wurde der Oocyten Extrakt durch rekombinantes His-gekoppeltes CRM1/exportin1 und Energie in Form von RanGTP ersetzt.

Wie in Abb.4.14 gezeigt, wurde das GST-Rev-NES in mehreren parallelen Versuchen mit und ohne eIF-5A-wt bzw. eIF-5A-M14, sowie mit und ohne Energie in Form von RanGTP inkubiert, ehe His-gekoppeltes CRM1 zugegeben wurde. Gebundenes His-CRM1 wurde dann mit Hilfe eines Antikörpers gegen His nachgewiesen (siehe 3.3.4).

Wie die Abb.4.14 zeigt, hat tatsächlich eine Bindung von Rev-NES an CRM1/exportin1 nur in Anwesenheit von eIF-5A-wt stattgefunden (Spur 1). Keine Bindung erfolgte dagegen in Anwesenheit von eIF-5A-M14 (Spur 2) oder in Abwesenheit von eIF-5A-wt (Spur 3) bzw. Energie (Spur 5). Wie erwartet hat CRM1/exportin1 auch nicht an GST alleine gebunden (Spur 4).

Bei den Banden in Höhe von ca. 66kDa und ca. 46kDa scheint es sich wieder um spezifische CRM1/exportin1 Abbauprodukte zu handeln, da diese auch auftreten, wenn das His-gekoppelte CRM1/exportin1 mit einem CRM1-spezifischen Antiserum nachgewiesen wird.

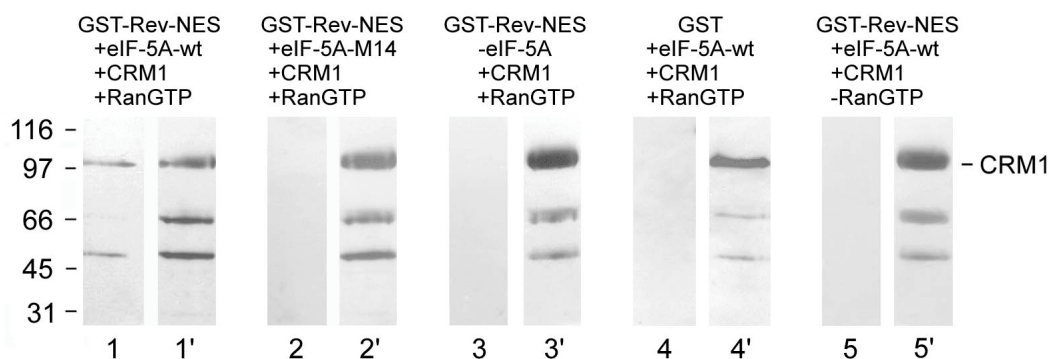


Abb.4.14: eIF-5A-wt vermittelt Bindung von rekombinantischem CRM1 an GST-Rev-NES.

GST-Rev-NES oder GST alleine, das an Glutathion-Sepharose Beads gebunden war, wurde in verschiedenen Kombinationen mit RanGTP, eIF-5A-wt oder eIF-5A-M14 inkubiert, ehe rekombinantisches His-gekoppeltes CRM1 zugegeben wurde. Gebundenes (Spuren 1-5) und ungebundenes (Spuren 1'-5') CRM1 wurde durch His-spezifische Antikörper nachgewiesen. CRM1 Fusionsprotein bindet nur in Anwesenheit von eIF-5A-wt und RanGTP an das Rev-NES (vergleiche Spur 1 mit den Spuren 3 und 5), nicht jedoch in Anwesenheit von eIF-5A-M14 (Spur 2) und nicht an GST (Spur 4). Bei den 66 und 46 kDa Banden handelt es sich vermutlich um CRM1 Abbauprodukte.

Molekulargewicht-Marker in kDa sind links gezeigt.

Zusammengefaßt zeigen diese Ergebnisse, daß eIF-5A spezifisch in den Rev-vermittelten RNA Export von HIV-1 involviert ist, nicht jedoch in den CTE-vermittelten viralen RNA Export.

Aufgrund der Mikroinjektionsexperimente und Bindungsstudien in Lösung läßt sich folgendes Modell, bezüglich der Funktion von eIF-5A beim Rev-vermittelten viralen RNA Export aufstellen (Abb.4.15). Demnach wirkt eIF-5A in diesem Exportweg als ein Adapter, der die effiziente Bindung des zellulären Exportrezeptors CRM1/exportin1 an den viralen Rev/RNA Komplex vermittelt, wodurch ein effizienter Export dieses Komplexes stattfindet. Des weiteren zeigen diese Daten, daß die eIF-5A Mutante M14 nicht mehr an den Exportrezeptor CRM1/exportin1 bindet und dadurch auch eine effiziente Interaktion zwischen Rev-NES und CRM1/exportin1 verhindert. Dieser Bindungsdefekt erklärt auch die schon früher beobachtete Fähigkeit der Mutante, den Export von Rev und dadurch die HIV-1 Replikation *in trans* zu inhibieren.

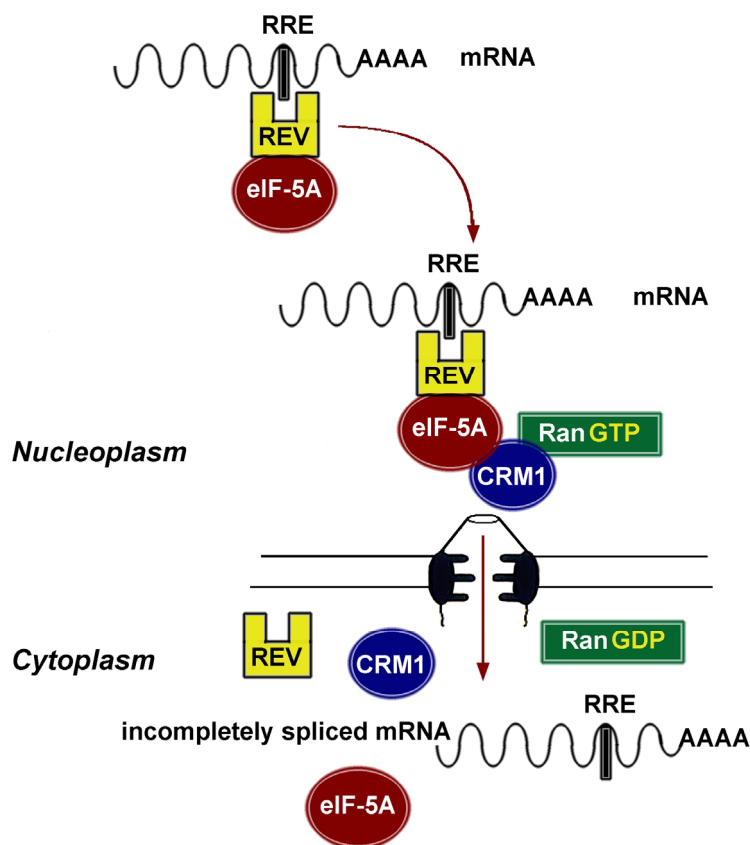


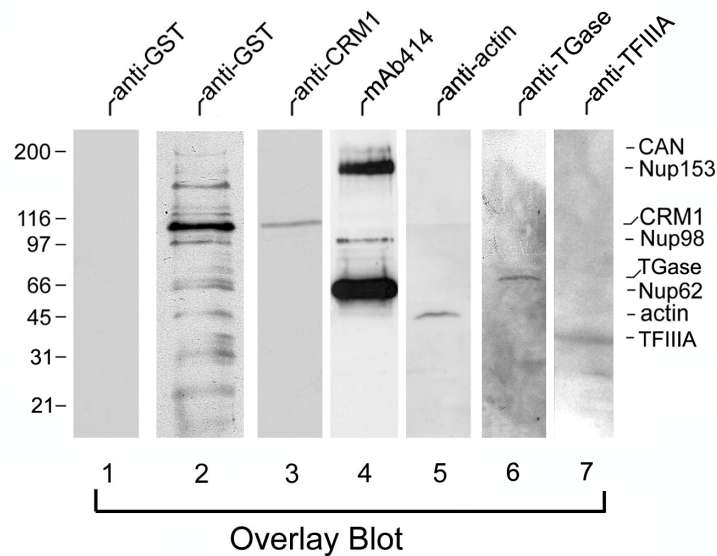
Abb.4.15: Modell der Funktion von eIF-5A im Rev-vermittelten viralen mRNA-Export

## 4.2 Identifikation von eIF-5A-Bindungspartnern, die mit der Kernhülle assoziiert sind

Wie gezeigt werden konnte, ist eIF-5A ein essentieller Faktor für den Rev-vermittelten Export der RRE RNA in *Xenopus* Oocyten (Kap. 4.1). Die zelluläre Funktion von eIF-5A dagegen, ist noch völlig unbekannt. Um Aufschluß über potentielle Funktionen von eIF-5A zu erhalten, wurden bereits Overlay Blot Assays auf Kernhüllen von *Xenopus laevis* Oocyten durchgeführt (Rosorius et al., 1999b; Reichart, B. Diplomarbeit 1998), um Bindungspartner des eIF-5A zu identifizieren.

Dazu wurden Kernhüllen von *Xenopus* Oocyten, wie unter 3.2.6 beschrieben, manuell isoliert. Die Proteine der Kernhülle wurden über 18% SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Diese wurde anschließend mit GST-eIF-5A, unter Zugabe von Energie inkubiert. Die von eIF-5A gebundenen Proteine wurden dann mit einem GST-Antikörper detektiert. Als Kontrolle wurde dieser Overlay Blot Assay mit GST-Protein alleine durchgeführt, um unspezifische Bindungen auszuschließen. Wie die Abb.4.16 zeigt, bindet GST-eIF-5A spezifisch an mehrere Proteine der Kernhülle (Spur 2), während GST alleine nicht bindet (Spur 1). Um diese potentiellen Bindungspartner zu identifizieren, wurden die gebundenen Proteine von der Nitrocellulose entfernt (siehe 3.3.4). Anschließend wurde diese dann mit spezifischen Antikörpern inkubiert. Auf diese Weise konnte bereits der Exportrezeptor CRM1/exportin (Spur 3: anti-CRM1), die Nucleoporine CAN/nup214, Nup153, Nup98 und Nup62 (Spur 4: mAB 414) sowie Aktin (Spur 5: anti-Aktin) als eIF-5A-Bindungspartner identifiziert werden (Rosorius et al., 1999b; Reichart, B. Diplomarbeit 1998).

Neben diesen Proteinen konnten nun, mit Hilfe spezifischer Antikörper, noch zwei weitere Bindungspartner gefunden werden. Dabei handelt es sich zum einen um die Tissue Transglutaminase (TGase) (Spur 6: anti-TGase), sowie um den Transkriptionsfaktor IIIA (TFIIIA) (Spur 7: anti-TFIIIA).



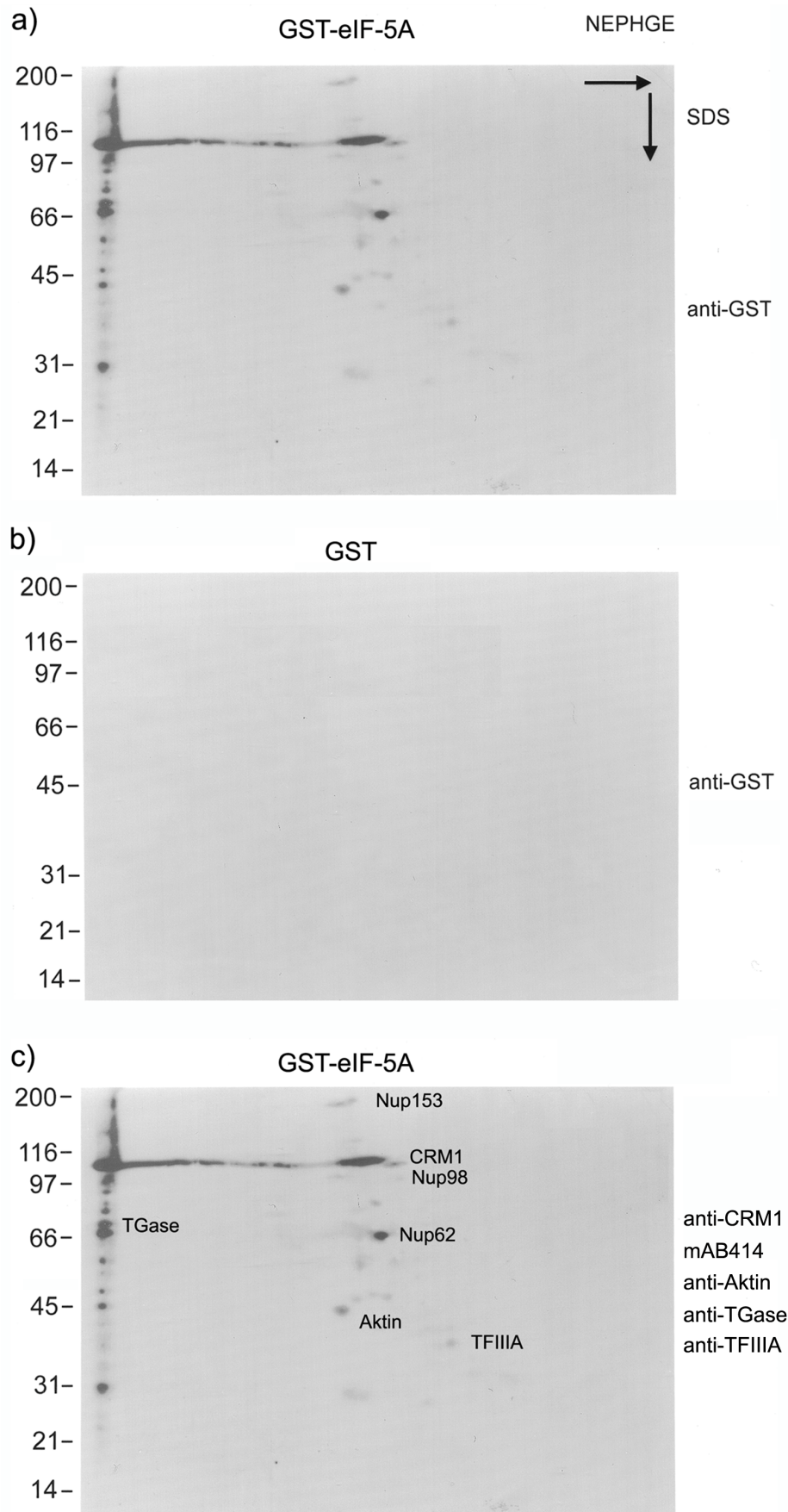
**Abb.4.16:** Interaktion von eIF-5A mit Kernhüllenproteinen im Overlay Blot Assay.

Kernhüllen von *Xenopus* Oocyten wurden manuell isoliert und über 12% SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden auf Nitrocellulose transferiert und mit GST (Spur 1) bzw. GST-eIF-5A (Spur 2) und Energie inkubiert. Antikörperinkubation der Nitrocellulose mit anti-GST zeigt, daß eIF-5A an mehrere Proteine bindet (Spur 2), während GST alleine nicht bindet (Spur 1). Die Nitrocellulose (Spur 2) wurde gestrippt und mit Antikörpern gegen CRM1 (Spur 3), gegen eine Familie von Nucleoporinen (mAB414, Spur 4), gegen Aktin (Spur 5), gegen TGase (Spur 6) und gegen TFIIIA (Spur 7) inkubiert. Die identifizierten eIF-5A-bindenden Proteine sind auf der rechten Seite gezeigt. Die Molekulargewicht-Marker in kDa sind auf der linken Seite gezeigt.

Um die Proteine besser aufzutrennen und eventuelle weitere Bindungspartner zu identifizieren wurden die Kernhüllen-assoziierten Proteine über 2-Dimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 3.2.2: NEPHGE) (Abb.4.17).

Durch diese 2-D-Gelelektrophorese werden Proteine in der 1. Dimension nach ihrem individuellen isoelektrischen Punkte aufgetrennt und in der 2 Dimension nach ihrem Molekulargewicht.

Nach der Auftrennung der Kernhüllenproteine wurde weiter verfahren, wie oben beschrieben. Mit Hilfe dieser 2-D-Gelelektrophorese konnten die bekannten Proteine der Kernhülle, an die eIF-5A bindet, zweifelsfrei identifiziert werden (siehe Abb.4.17).



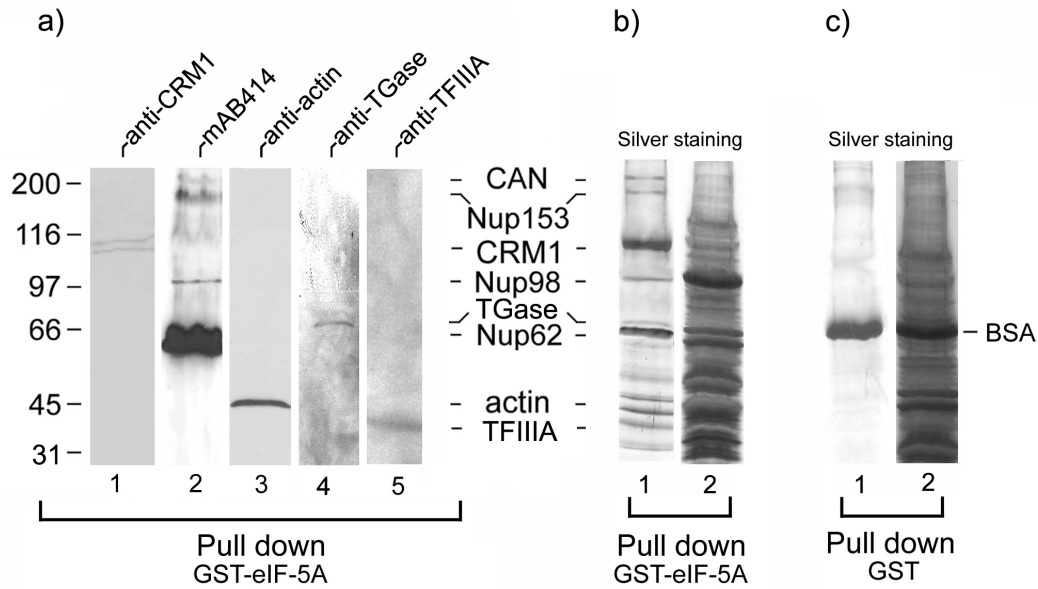
**Abb.4.17:** Interaktion von Kernhüllen-assoziierten Proteinen mit eIF-5A im 2-D-Gel (NEPHGE). Kernhüllen von *Xenopus* Oocyten wurden manuell isoliert. Die Proteine wurden zunächst durch NEPHGE nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt und danach und über 12% SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht. Die Proteine wurden anschließend auf Nitrocellulose transferiert und mit GST bzw. GST-eIF-5A inkubiert. Antikörperinkubation der Nitrocellulose mit anti-GST zeigt, daß eIF-5A an mehrere Proteinbanden bindet (a), während GST alleine nicht bindet (b). Die Nitrocellulose wurde mehrmals gestrippt und mit Antikörpern gegen CRM1, gegen eine Familie von Nucleoporinen (mAB414), gegen Aktin, gegen TGase und gegen TFIIIA inkubiert. Die identifizierten eIF-5A bindenden Proteine sind mit Pfeilen markiert (c). Die Molekulargewicht-Marker in kDa sind jeweils auf der linken Seite gezeigt.

Die im Overlay Blot Assay beobachteten Interaktionen wurden auch durch Bindungsstudien in Lösung, durch Pull down Experimente, bestätigt (siehe 3.2.7) (Abb.4.18). Hierzu wurde GST-gekoppeltes eIF-5A bzw. GST alleine als Kontrolle, an Glutathion-Sepharose Beads immobilisiert und mit Proteinextrakt aus *Xenopus* Oocytenkernen inkubiert. Die gebundenen und ungebundenen Fraktionen wurden anschließend pelletiert, über 12% SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Diese wurde dann mit den spezifischen Antikörpern (anti-CRM1, mAB414, anti-Aktin, anti-TGase und anti-TFIIIA) inkubiert. Dabei ließen sich, wie in Abb.4.18a dargestellt, alle im Overlay Blot Assay beobachteten Interaktionen verifizieren. GST alleine bindet auch in diesem Experiment an keine Proteine (Daten nicht gezeigt). Die dazugehörenden, silbergefärbten Gele der beiden Pull down Experimente mit GST-eIF-5A und GST alleine, die in Abb.4.18b und c gezeigt sind, demonstrieren die Spezifität dieser Bindungsassays. Nur wenige spezifisch gebundene Proteine sind im Fall des Pull downs mit GST-eIF-5A zu sehen (Abb.4.18b: vergleiche Spur 1 mit Spur 2). Im Kontrollexperiment haben keine Kernproteine an GST gebunden (Abb.4.18c: vergleiche Spur 1 mit Spur 2). Bei dem deutlichen Signal, das man hier erhält, handelt es sich um BSA, einen Bestandteil des Absättigungspuffers.

In den Fällen, in denen gereinigte Proteine vorhanden waren, wurden diese Bindungsstudien auch in die andere Richtung durchgeführt. Das jeweilige Protein wurde an eine entsprechende Matrix gebunden und mit Kernextrakt inkubiert, um eine Bindung des endogenen eIF-5A an das jeweilige Protein nachzuweisen. In allen durchgeführten Fällen war das Ergebnis dabei auch positiv. Die Ergebnisse dieser Bindungsstudien sind in den entsprechenden Kapiteln gezeigt.

Genauerer über die Interaktion von eIF-5A mit:

TGase	→	Kap. 4.3
TFIIIA	→	Kap. 4.4
Aktin	→	Kap. 4.7



**Abb.4.18:** Interaktion von eIF-5A mit Kernproteinen, gezeigt im Pull down Experiment.

Glutathion-Sepharose Beads an die GST-eIF-5A (a: Spuren 1-5 und b) bzw. GST alleine (c) gekoppelt war, wurden mit Extrakt aus je 150 manuell isolierten *Xenopus* Oocytenkernen inkubiert. a) Die gebundenen pelletierten Proteine wurden über 12% SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend durch Immunblot mit Antikörpern gegen CRM1 (Spur 1), Nucleoporine (mAB414, Spur 2), Aktin (Spur 3), TGase (Spur 4) und TFIIIA (Spur 5) analysiert. Die dazu gehörenden Gele wurden mit Silber gefärbt, so daß man das Muster der gebundenen Proteine erkennen kann (b und c). Die Molekulargewicht-Marker in kDa sind auf der linken Seite gezeigt.

### 4.3 Lokalisation der Tissue Transglutaminase in *Xenopus* Oocyten

Bei der Tissue Transglutaminase (TGase) oder auch Typ II Transglutaminase handelt es sich um ein ubiquitär exprimiertes Protein, dem eine Rolle bei der Regulation des Zellwachstums (Birckbichler et al., 1981; Ikura et al., 1990), bei der Differenzierung (Kannagi et al., 1982; Murtaugh et al., 1984) und bei der Apoptose (Fesus, 1993; Piacentini, 1995) nachgesagt wird. Während seine zelluläre Funktion jedoch noch weitgehend ungeklärt ist, ist seine enzymatische Funktion gut charakterisiert. Die TGase ist sowohl ein signaltransduzierendes GTP-bindendes Protein (Nakaoka et al., 1994), als auch ein transamidierendes Enzym (Greenberg et al., 1991). Als ein Mitglied der Transglutaminase Familie, katalysiert die Tissue Transglutaminase eine Calcium-abhängige Acyl-Transferreaktion zwischen der  $\gamma$ -Carboxamidgruppe eines peptidgebundenen Glutaminrestes und entweder einer  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Peptid-gebundenen Lysins oder der primären Aminogruppe eines Polyamins.

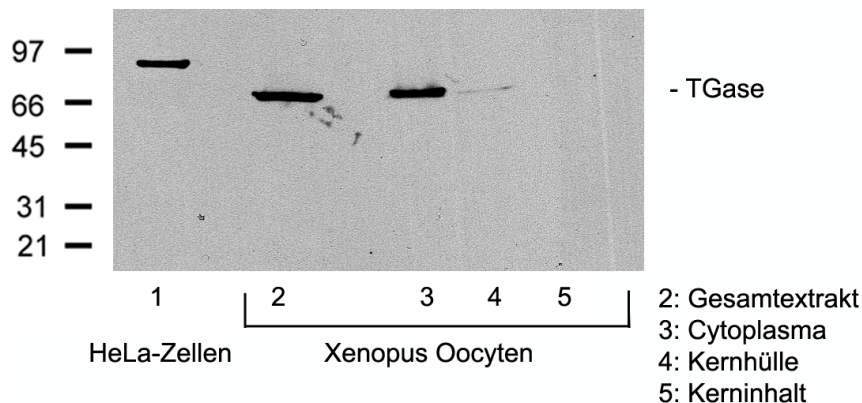
Da eIF-5A im Overlay Blot Assay mit der Tissue Transglutaminase interagiert, wurde zunächst die genaue Verteilung dieser Transglutaminase in *Xenopus* Oocyten untersucht (Abb.4.19).

Der TGase Antikörper wurde im Immunblot auf verschiedenen Oocyten-Fractionen (Kernhülle, Kerninhalt, Cytoplasma) sowie auf Gesamt-Oocyten getestet (Abb.4.19: Spuren 2-5). Dazu wurden die Polypeptide durch 18% SDS-PAGE getrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit dem TGase Antikörper inkubiert. Parallel dazu wurden, als Referenz für die TGase in somatischen Zellen, die Gesamt-Proteine aus HeLa-Zellextrakt mit verarbeitet (Abb.4.19: Spur 1).

Der TGase Antikörper reagiert bei HeLa-Zellen mit einem Polypeptid mit dem Molekulargewicht von 80kDa (Abb.4.19: Spur 1). Bei dem Gesamtextrakt (Spur 2), sowie Cytoplasma (Spur 3) und Kernhülle (Spur 4) aus *Xenopus* Oocyten wurde ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 68kDa erkannt.

Wie dieser Immunblot zeigt, liegt die Hauptmenge der TGase im Cytoplasma vor (Spur 3). Ein kleiner Teil ist mit der Kernhülle assoziiert (Spur 4), während keine TGase im Kerninhalt nachweisbar ist (vergleiche Spuren 3 und 4 mit Spur 5).

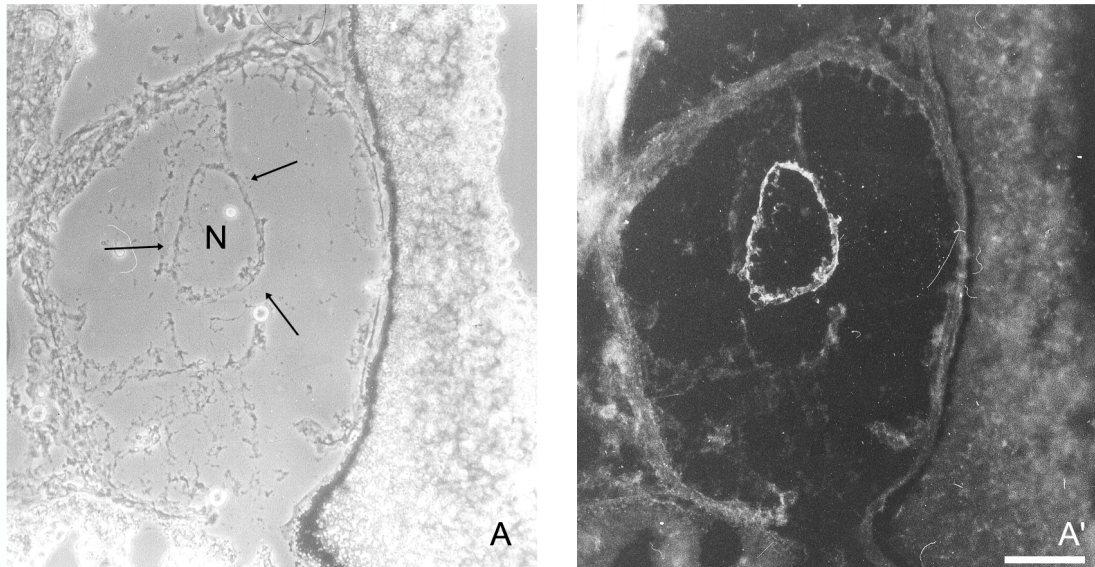




**Abb.4.19:** Nachweis der TGase in *Xenopus* Oocyten. Proteine aus HeLa-Zellen (Spur 1), Gesamt-Proteinextrakt aus *Xenopus* Oocyten (Spur 2), cytoplasmatische Proteine (Spur 3), Kernhüllenproteine (Spur 4) und Proteine des Kerninhaltes (Spur 5) wurden über 12% SDS-PAGE getrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit einem Antikörper gegen TGase analysiert. TGase kommt, wie erwartet in HeLa-Zellen vor. In den *Xenopus* Oocytenfraktionen konnte ein TGase spezifisches Signal im Gesamtextrakt, in der cytoplasmatischen Fraktion sowie der Kernhüllenfraktion, nicht jedoch im Kerninhalt nachgewiesen werden. Die Molekulargewicht-Marker in kDa sind auf der linken Seite gezeigt.

Um die Lokalisierung der TGase in *Xenopus* Oocyten weiter zu charakterisieren, wurden als nächstes Gefrierschnitte (5  $\mu$ m) von *Xenopus* Oocyten, wie unter 3.3.1 beschrieben, mittels indirekter Immunfluoreszenz-Mikroskopie analysiert (Abb.4.20). Nach Inkubation der Gefrierschnitte mit dem TGase Antikörper war eine deutliche Markierung der Kernhülle zu erkennen (siehe Abb. 4.20A'). Zusätzlich zeigte der Antikörper eine spezifische Anfärbung von punktartigen Strukturen im Cytoplasma (Abb. 4.20A'). Hierbei handelt es sich vermutlich um Annulate Lamellae (Dabauvalle et al., 1991), die in großer Zahl in Amphibien Oocyten vorkommen. Bei Annulate Lamellae handelt es sich um gestapelte Membran-Zisternen mit hoher Porendichte (reviewed in: Kessel, 1992).

Bei dem durchgeführten Immunblot (Abb.4.19) läßt sich eine große Menge TGase im Cytoplasma detektieren. Daß bei der indirekten Immunfluoreszenz-Mikroskopie auf Oocyten-Gefrierschnitten (Abb.4.20) kaum eine cytoplasmatische Färbung auftritt, liegt an der Methode. Bei Gefrierschnitten geht ein großer Teil des Cytoplasmas und Nucleoplasmas verloren, während die Membranstrukturen gut erhalten bleiben.



**Abb.4.20:** Lokalisation der TGase an der Kernhülle von *Xenopus leavis* Oocyten.

Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie eines Gefrierschnittes durch *Xenopus* Ovar, nach Inkubation mit anti-TGase (A'). Die dazugehörige Phasenkontrastaufnahme ist in A gezeigt. Die Position der Kernhülle ist in A durch Pfeile angezeigt. Wie A' zeigt, bindet der Antikörper deutlich an die Kernhülle sowie an punktförmige Strukturen im Cytoplasma, bei denen es sich vermutlich um Annulate Lamellae handelt.

N: Kern; A: Phasenkontrastaufnahme; A': entsprechende Fluoreszenzaufnahme;

Eichstrich: 80  $\mu\text{m}$

Es konnte bereits gezeigt werden, daß eIF-5A, ebenso wie die Tissue Transglutaminase an der Kernhülle akkumuliert (Rosorius et al., 1999b).

Durch Bindungsstudien in Lösung (Pull down) sowie durch Overlay Blot Assays konnte nun gezeigt werden, daß diese beiden Proteine colokalisieren. Um diese Colokalisation zu verifizieren, wurde eine Doppel-Immunogoldlokalisation, auf *Xenopus* Oocytenkernen, durchgeführt (siehe 3.3.2) (Abb.4.21). Handisolierte Kerne aus *Xenopus* Oocyten wurden mit Antikörpern gegen eIF-5A (Kaninchen), sowie TGase (Maus) inkubiert. Zur Unterscheidung wurde bei anti-eIF-5A ein mit 6nm kolloidalem Gold gekoppelter und bei anti-TGase ein mit 12nm kolloidalem Gold gekoppelter Antikörper verwendet. Nach der Fixierung und Einbettung, wurden die Kernhüllen dann für die Elektronenmikroskopie präpariert.

In Abb.4.21 erkennt man eine deutliche Akkumulation von sowohl eIF-5A als auch TGase an den Kernporenkomplexen, auf beiden Seiten der Kernhülle. Außerdem kann man eine deutliche Colokalisation der beiden Proteine (durch Pfeile markiert) an den Kernporenkomplex-assoziierten, nucleoplasmatischen und cytoplasmatischen Filamenten beobachten.

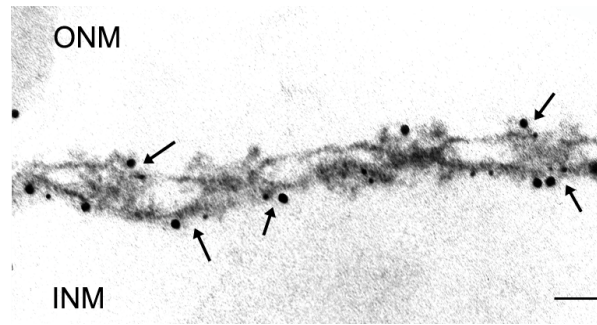


Abb.4.21: Colokalisation von eIF-5A und TGase an Kernporenkomplexen, gezeigt durch eine Doppelimmunlokalisation auf handisolierten Kernen von *Xenopus* Oocyten. Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt einen Querschnitt durch handisolierte *Xenopus* Oocytenkerne, die mit Antikörpern gegen eIF-5A (Kaninchen) und TGase (Maus) inkubiert wurden. Die entsprechenden Zweitantikörper waren an kolloidales Gold gekoppelt (Kaninchen: 6 nm; Maus: 12 nm). eIF-5A und TGase colokalisieren an den NPC-assoziierten Fibrillen (markiert durch Pfeile), sowohl auf der cytoplasmatischen Seite (ONM), als auch auf der nucleoplasmatischen Seite (INM).

ONM: outer nuclear membrane; INM: inner nuclear membrane

Eichstrich: 0,05  $\mu$ m

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, daß eIF-5A und die Tissue Transglutaminase nicht nur colokalisieren sondern auch miteinander interagieren. Des weiteren zeigen sie, daß diese Interaktion an den Kernporenkomplexen stattfindet.

Aufgrund der bereits beschriebenen enzymatischen Funktionen der TGase (siehe Kap.1.4) könnte man spekulieren, daß die TGase an der Bildung der Hypusinmodifikation beteiligt ist. Bis heute ist jedoch nicht bekannt, welche Rolle die Hypusinmodifikation bei der Funktion des eIF-5A spielt. Es gibt jedoch verschiedenen Hinweise darauf, daß sie mit der Shuttleaktivität des eIF-5A in Verbindung stehen könnte (siehe auch Kap.4.6).

Da in den Kern injizierte Antikörper gegen TGase jedoch keinen Einfluß auf das Exportverhalten von eIF-5A zeigte (Daten nicht gezeigt), wurde die mögliche Funktion der TGase nicht näher untersucht.

#### 4.4 eIF-5A ist am TFIIIA-vermittelten Export der Oocyten-Typ 5S rRNA in *Xenopus* Oocyten beteiligt

Wie bereits in Kap.4.2 erwähnt, konnte mit Hilfe von Overlay Blot Assays auf Hand-isolierten Oocyten Kernhüllen der Transkriptionsfaktor IIIA (TFIIIA) als ein Bindungspartner von eIF-5A identifiziert werden.

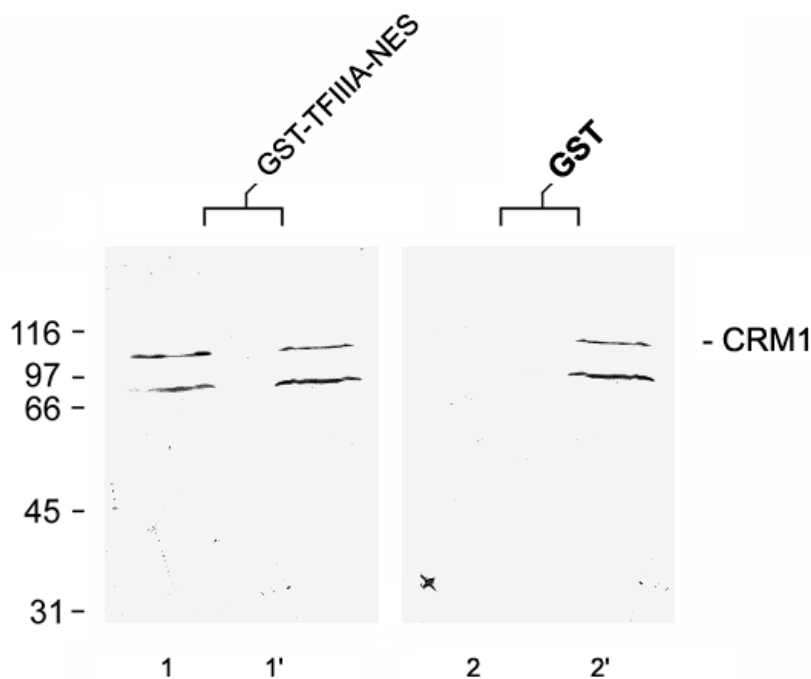
TFIIIA ist ein RNA Polymerase III Transkriptionsfaktor, der an die innere Region der beiden, in *Xenopus* Oocyten vorhandenen, 5S rRNA Gene bindet. Diese Bindung ist notwendig für die Bildung eines funktionellen Transkriptionsinitiations Komplexes (Engelke et al., 1980). TFIIIA hat aber in Stadium I-III Oocyten noch eine weitere Funktion. Zu diesem Zeitpunkt beginnt in Amphibien Oocyten eine gesteigerte Expression der Oocyten-Typ 5S rRNA. Amphibien Oocyten haben die Strategie entwickelt, in späten Oocyten und Eiern einen Vorrat an Ribosomen anzulegen, der dann, während der Embryogenese gebraucht wird. Da die gesteigerte Expression der 5S rRNA viel früher beginnt als die der anderen ribosomalen rRNAs (5,8S, 18S und 28S), wird die 5S rRNA zunächst einmal im Cytoplasma gelagert (Mairy & Denis, 1971). Der Transport und die Lagerung erfolgt in Form von 7S RNPs, einem Komplex der aus 5S rRNA und TFIIIA besteht (Picard & Wegnez, 1979; Guddat et al., 1990) (siehe auch Kap.1.3.2). Neben der Funktion als Transkriptionsfaktor hat TFIIIA hier also auch eine Funktion als RNA Exportfaktor. Von besonderer Bedeutung ist, daß er ein Rev-ähnliches, Leucin-reiches Kernexportsignal besitzt, welches den Kernexport von HIV-1 mRNAs induzieren kann (Fridell et al., 1996).

Frühere Konkurrenzexperimente in *Xenopus* Oocyten haben bereits gezeigt, daß die Kernexportwege des Rev-vermittelten RNA Exportes zum einen, und der 5S rRNA zum anderen, gemeinsame Exportfaktoren benutzen müssen (Fisher et al., 1995).

Die beobachtete Interaktion von TFIIIA und eIF-5A im Overlay Blot Assay (Kap.4.2: Abb.4.16) läßt nun darauf schließen, daß eIF-5A im TFIIIA-vermittelten Kernexport eine ähnliche Rolle spielen könnte, wie es im Rev-vermittelten RNA Export spielt. Aufgrund dessen wurde der Kernexport des TFIIIA sowie der TFIIIA-vermittelte Export der Oocyten-Typ 5S rRNA näher untersucht.

#### 4.4.1 TFIIIA und die Oocyten-Typ 5S rRNA werden über den Exportrezeptor CRM1/exportin1 exportiert

Da TFIIIA ein Rev-ähnliches, Leucin-reiches Kernexportsignal besitzt (Fischer et al., 1995; Fridell et al., 1996) ist zu erwarten, daß TFIIIA, wie alle bisher untersuchten Proteine, die ein solches NES besitzen, über den Exportrezeptor CRM1/exportin1 exportiert wird. Daher wurde die Rolle von CRM1/exportin1 beim Export des TFIIIA bzw. beim TFIIIA-vermittelten Export der Oocyten-Typ 5S rRNA in *Xenopus* Oocyten untersucht. Zum einen wurden Bindungsstudien in Lösung durchgeführt (Abb.4.22), um eine eventuelle Bindung an CRM1/exportin1 zu untersuchen, zum anderen Mikroinjektionsexperimente mit der Droge Leptomycin B, dem spezifischen Inhibitor der CRM1/exportin1 Aktivität (Abb.4.23). Zunächst wurde die Interaktion des TFIIIA-NES mit CRM1/exportin1 analysiert.



**Abb.4.22:** CRM1/exportin1 bindet an GST-TFIIIA-NES.

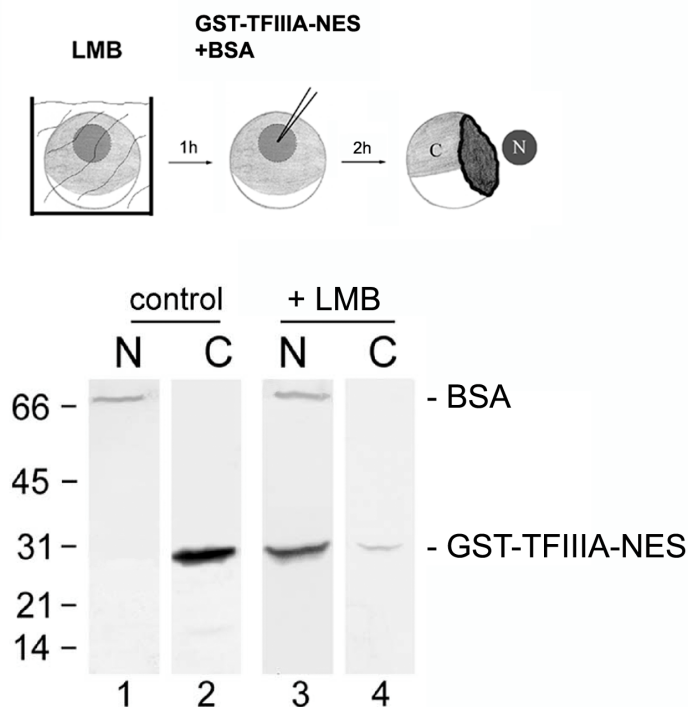
GST-TFIIIA-NES (Spuren 1 und 1') oder GST (Spuren 2 und 2') wurden an Glutathion-Sepharose Beads gebunden und mit *Xenopus* Oocyten Gesamt-Proteinextrakt inkubiert. Die gebundenen (Spuren 1 und 2) und ungebundenen (Spuren 1' und 2') Fraktionen wurden anschließend pelletiert und für den Immunblot präpariert. Gebundenes und ungebundenes CRM1/exportin1 wurde dann mit einem CRM1 Antiserum nachgewiesen. *Xenopus* Oocyten CRM1/exportin1 bindet spezifisch an GST-TFIIIA-NES, da es keine unspezifische Bindung an GST oder die Sepharose gibt (Vergleich Spur 1 und 2). Die Molekulargewicht-Marker in kDa sind links gezeigt.

Dazu wurde GST-TFIIIA-NES oder GST, als Kontrolle, an Glutathion-Sepharose Beads immobilisiert und anschließend mit Gesamtoocytenextrakt inkubiert (siehe 3.2.7) (Abb.4.22). Die gebundenen und ungebundenen Fraktionen wurden pelletiert, über 12% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit einem CRM1-spezifischen Antiserum analysiert (siehe 3.2.1 und 3.3.4). Wie erwartet hat CRM1/exportin1 an das GST-gekoppelte NES vonTFIIIA gebunden (Abb.4.22: Spur 1). Es hat dagegen keine Bindung an GST alleine stattgefunden, was die Spezifität der Bindung verdeutlicht (Abb.4.22: Spur 2).

Da durch diese Bindungsstudien also tatsächlich eine Interaktion zwischen dem TFIIIA und CRM1/exportin1 gezeigt werden konnte, kann man davon ausgehen, daß der Export des TFIIIA in der Tat über diesen generellen Exportrezeptor stattfindet. Um dies zu überprüfen wurden Mikroinjektionsexperimente in Anwesenheit der Droge Leptomycin B durchgeführt (Abb.4.23).

Alle folgenden Mikroinjektionsexperimenten wurden mit GST-TFIIIA-NES durchgeführt, da es vollkommen ausreichend für den Export ist (Fridell et al., 1996).

*Xenopus* Oocyten wurden vor der Mikroinjektion in den Kern für 1h in Medium mit und ohne Leptomycin B (20 nM) inkubiert. Anschließend wurden GST-TFIIIA-NES und exportdefizientes BSA in die Kerne der Oocyten coinjiziert. Nach weiteren 2h Inkubation wurden Kerne und Cytoplasma manuell isoliert und die Proteine der einzelnen Fraktionen wurden, wie unter 3.2.1 beschrieben, über 18% SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf Nitrocellulose, wurde diese mit Antikörpern gegen GST und BSA inkubiert, um das injizierte GST-TFIIIA-NES und BSA zu lokalisieren (siehe 3.3.4). Wie erwartet, wurde der Export des TFIIIA-NES durch Leptomycin B inhibiert, da es sich hauptsächlich im Kern befindet (Abb.4.23: Spuren 3 und 4). Im Kontrollexperiment dagegen, in dem die Oocyten vor der Injektion in Medium ohne Zusatz inkubiert wurden, hat ein vollständiger Export des TFIIIA-NES stattgefunden (Abb.4.23: Spuren 1 und 2). Diese Daten bestätigen, daß auch TFIIIA, wie alle Proteine mit Leucin-reichen Kernexportsignalen, über den generellen Exportrezeptor CRM1/exportin1 exportiert wird.



**Abb.4.23:** Der Export des GST-TFIIIA-NES wird durch Leptomycin B inhibiert. Das Oocyten Injektionsschema ist in der oberen Hälfte gezeigt. Vor der Injektion wurden die Oocyten für 1h in Medium mit bzw. ohne Leptomycin B (LMB) inkubiert. Nach Injektion und Inkubation wurden die Oocyten manuell in Kern (N) und Cytoplasma (C) getrennt. Die Proteine wurden durch 18% SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Anschließend wurden die Blots mit Antikörpern gegen GST und BSA inkubiert. Im Kontrollexperiment ohne LMB findet ein effizienter Export des GST-TFIIIA-NES aus dem Kern ins Cytoplasma statt (Spuren 1 und 2). Eine Inkubation der Oocyten mit LMB dagegen, führt zu einer Inhibition des Exportes (Spuren 3 und 4). Die ausschließliche Präsenz von BSA in den Kernen, bestätigt daher die Spezifität der Kerninjektion (Spuren 1, 3 und 5). Die Molekulargewicht-Marker in kDa sind links gezeigt.

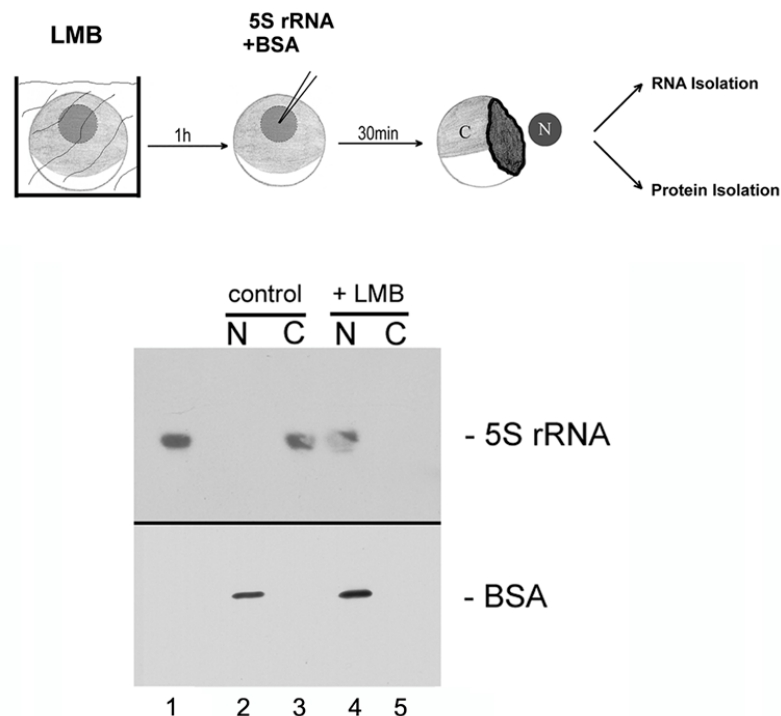
Da TFIIIA der Exportrezeptor für die Oocyten-Typ 5S rRNA ist (Guddat et al., 1990), sollte auch der Export dieser 5S rRNA durch die Droge LMB inhibiert werden. Um dies zu bestätigen, wurde der Export Digoxigenin-markierter Oocyten-Typ 5S rRNA in Stadium VI Oocyten mit und ohne LMB analysiert (Abb.4.24). Die Analyse des Transportes der Oocyten-Typ 5S rRNA, die eigentlich nur in Stadium I-III Oocyten exprimiert wird, wurde aufgrund der einfacheren Injektionsbedingungen in Stadium VI Oocyten durchgeführt. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, daß injizierte Oocyten-Typ 5S rRNA in diesen Stadium VI Oocyten auf dieselbe Art transportiert wird, wie in Stadium I-III Oocyten, also auch mit TFIIIA (Allison et al., 1991).

Um nun den Effekt von LMB auf den Kernexport der Oocyten-Typ 5S rRNA zu untersuchen, wurde diese Digoxigenin markiert (siehe 3.6.9) und zusammen mit der Injektionskontrolle BSA in Kerne von Oocyten injiziert, die vor der Injektion mit und ohne LMB inkubiert wurde (Abb.4.24). 30 min nach der Injektion wurden Kerne und Cytoplasma manuell getrennt. Eine Hälfte der Proben wurde daraufhin für Western Blot Analysen präpariert, um das coinjizierte BSA zu lokalisieren. Aus der anderen Hälfte wurde Gesamt-RNA isoliert (siehe 3.6.1), die über ein 1% RNA-Agarosegel aufgetrennt und durch Kapillarblot auf eine Nylonmembran transferiert wurde. Anschließend wurde diese mit einem Antikörper gegen Digoxigenin inkubiert, um die injizierte 5S rRNA zu lokalisieren (siehe 3.6.5).



Wie die Abb.4.24 zeigt, wurde im Kontrollexperiment die 5S rRNA effizient aus dem Kern exportiert (Spuren 2 und 3). Der Export der Oocyten-Typ 5S rRNA wurde dagegen, wie erwartet, durch die Droge Leptomycin B inhibiert (Spuren 4 und 5). Spur 1 zeigt die Menge der jeweils injizierten RNA Probe, um eventuelle Degradationen der RNA in den Oocyten zu bemerken.

Die Bindungsstudien und Mikroinjektionsexperimente zeigen, daß also tatsächlich der generelle Exportrezeptor CRM1/exportin1 in den Kernexport des TFIIIA-NES sowie in den TFIIIA-vermittelten Export der Oocyten-Typ 5S rRNA involviert ist.



**Abb.4.24:** Der Export der Oocyten-Typ 5S rRNA wird durch Leptomycin B inhibiert. Das Oocyten-Injektionsschema ist in der oberen Hälfte gezeigt. Digoxigenin-markierte Oocyten-Typ 5S rRNA wurde zusammen mit BSA als Injektionskontrolle in Oocytenkerne injiziert. Vor der Injektion wurden die Oocyten entweder in Medium mit oder ohne Leptomycin B (LMB) inkubiert. Nach Injektion und Inkubation wurden Kerne (N) und Cytoplasma (C) manuell isoliert und für Western Blots mit BSA-Antikörpern bzw. Northern Blots mit Digoxigenin-Antikörpern präpariert. Ein effizienter Export der 5S rRNA findet nur in Oocyten statt die nicht mit LMB inkubiert wurden (Spuren 2 und 3). Eine Inkubation der Oocyten mit LMB dagegen, führt zu einer kompletten Inhibition des 5S rRNA Exportes (Spuren 4 und 5). Die ausschließliche Präsenz des co-injizierten, exportdefizienten BSA in den Kernen bestätigt die Genauigkeit der Kerninjektion (Spuren 2 und 4). Spur 1 zeigt die Menge der injizierten RNA Probe.



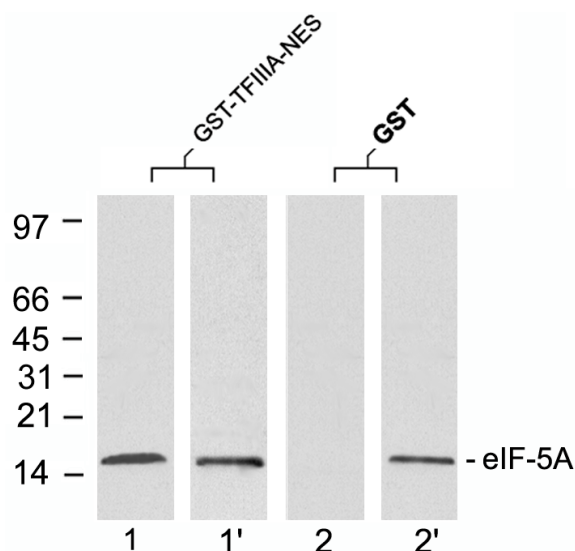
#### 4.4.2 Antikörper gegen eIF-5A inhibieren den Export des TFIIIA-NES und den TFIIIA-vermittelten Export der Oocyten-Typ 5S rRNA

Da nun bestätigt werden konnte, daß die Oocyten-Typ 5S rRNA mittels TFIIIA über den generellen Exportrezeptor CRM1/exportin1 exportiert wird (Abb.4.23 und 4.24) wurde nun, in Analogie zum Rev-vermittelten RRE RNA Export untersucht, ob eIF-5A auch in diesem TFIIIA Exportweg eine Funktion als Exportfaktor hat.

Zunächst wurde die, im Overlay Blot Assay beobachtete, Interaktion zwischen TFIIIA und eIF-5A (Abb.4.16) durch Bindungsstudien in Lösung bestätigt (Abb.4.25).

GST-TFIIIA-NES sowie GST alleine als Kontrolle, wurden an Glutathion-Sepharose Beads immobilisiert (siehe 3.2.7). Nach der darauffolgenden Inkubation mit Oocytenextrakt wurden die gebundenen und nicht gebundenen Fraktionen pelletiert und für Immunblot Analysen mit einem Antikörper gegen eIF-5A präpariert (siehe 3.2.1 und 3.3.4).

Die Abb.4.25 zeigt ganz deutlich, daß eIF-5A an das TFIIIA-NES gebunden hat (Spur 1), nicht jedoch unspezifisch an GST alleine (Spur 2). Die Bindung von eIF-5A an das TFIIIA-NES ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß eIF-5A eine Rolle bei diesem Export spielen könnte.

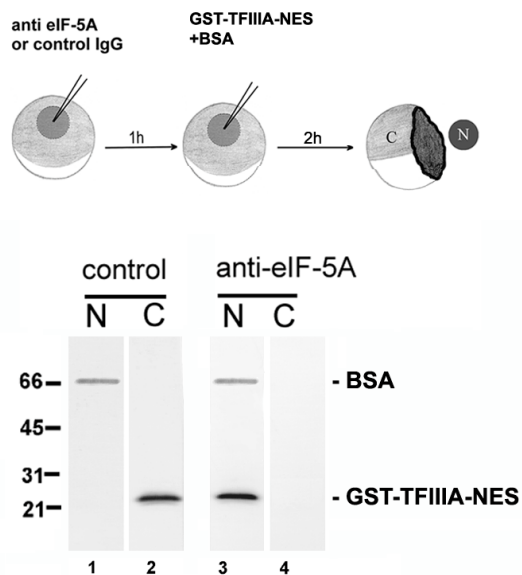


**Abb.4.25:** eIF-5A bindet an GST-TFIIIA-NES. GST-TFIIIA-NES (Spuren 1 und 1') oder GST (Spuren 2 und 2') wurden an Glutathion-Sepharose Beads gebunden und mit *Xenopus* Oocyten Gesamtproteinextrakt inkubiert. Die gebundenen (Spuren 1 und 2) und ungebundenen (Spuren 1' und 2') Fraktionen wurden anschließend pelletiert und für den Immunblot präpariert. Gebundenes und ungebundenes eIF-5A wurde dann mit einem Antikörper gegen eIF-5A nachgewiesen. *Xenopus* Oocyten eIF-5A bindet spezifisch an GST-TFIIIA-NES (Spur 1), nicht jedoch an GST alleine (Spur 2). Die Molekulargewicht-Marker in kDa sind links gezeigt.

Nachdem nun die Interaktion zwischen eIF-5A und TFIIIA bestätigt werden konnte, wurde als nächstes der Einfluß von Antikörpern, die gegen eIF-5A gerichtet sind, auf den Export des TFIIIA-NES untersucht (Abb.4.26). Antikörper gegen eIF-5A oder als Kontrolle unspezifisches IgG, wurden in Kerne von *Xenopus* Oocyten injiziert. Nach einer Inkubation

von 1h wurde das Exportsubstrat GST-TFIIIA-NES zusammen mit dem exportdefizienten BSA als Injektionskontrolle in die Kerne injiziert. Nach weiteren 2h wurden Kerne und Cytoplasma manuell isoliert, die Proteine der einzelnen Fraktionen über 18% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit Antikörpern gegen GST und BSA analysiert.

Wie erwartet, hat im Kontrollexperiment, in Anwesenheit des unspezifischen IgG, ein effizienter Export des TFIIIA-NES aus dem Kern ins Cytoplasma stattgefunden (Abb.4.26: Spuren 1 und 2). Antikörper gegen eIF-5A dagegen führten zu einer deutlichen Inhibition des Kernexportes (Abb.4.26: Spuren 3 und 4). Wie erwartet wurde die BSA Injektionskontrolle ausschließlich im Kern gefunden (Abb. 4.26: Spuren 1 und 3).

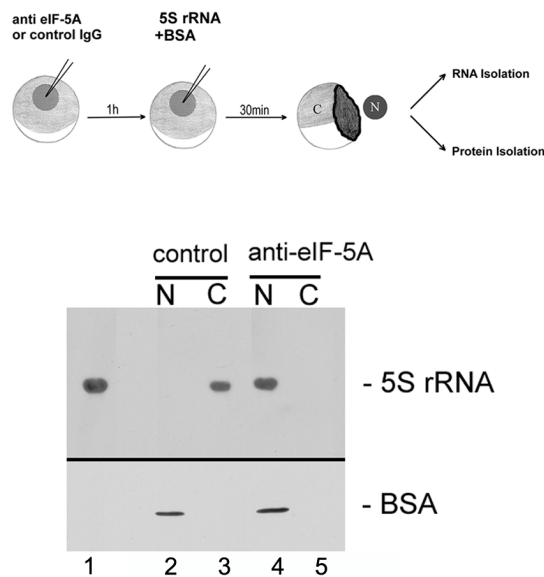


**4.26:** Antikörper gegen eIF-5A inhibieren den Kernexport von GST-TFIIIA-NES.

Das Oocyten Injektionsschema ist in der oberen Hälfte gezeigt. Nach Injektion und Inkubation wurden die Oocyten manuell in Kern (N) und Cytoplasma (C) getrennt. Die Proteine wurden über 18% SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Anschließend wurden die Blots mit Antikörpern gegen GST und BSA inkubiert. In Anwesenheit des Kontroll-IgG wird GST-TFIIIA-NES effizient vom Kern ins Cytoplasma exportiert (Spuren 1 und 2), während Antikörper gegen eIF-5A den Kernexport des GST-TFIIIA-NES stark inhibierten (Spuren 3 und 4). Um die Kerninjektion zu kontrollieren, wurde BSA zusammen mit den Exportsubstraten coinjiziert. Die ausschließliche Präsenz von BSA in den Kernen bestätigt daher die Spezifität der Kerninjektion (Spuren 1 und 3). Die Molekulargewicht-Marker in kDa sind links gezeigt.

Mit dem gleichen experimentellen Versuchsansatz wurde auch der TFIIIA-vermittelte Export der Oocyten-Typ 5S rRNA untersucht (Abb.4.27). Auch hier wurden vor der Injektion des Exportsubstrates Antikörper gegen eIF-5A bzw. als Kontrolle unspezifisches IgG in Kerne von *Xenopus* Oocyten injiziert. Nach 1h wurde Digoxigenin-markierte Oocyten-Typ 5S rRNA zusammen mit der Injektionskontrolle BSA in die Kerne injiziert. Nach 30min wurden Kerne und Cytoplasma manuell isoliert. Eine Hälfte der Proben wurde für Western Blot Analysen mit einem BSA-Antikörper präpariert, während aus der anderen Hälfte der Proben Gesamt-RNA isoliert wurde, die dann für Northern Blot Analysen mit einem Digoxigenin-Antikörper präpariert wurde (siehe 3.6.4 und 3.6.5). Wie die Abb.4.27 zeigt, wurde der TFIIIA-vermittelte Export der Oocyten-Typ 5S rRNA ebenfalls durch Antikörper, die gegen eIF-5A

gerichtet sind, inhibiert (Spuren 4 und 5). Mikroinjektion des unspezifischen IgGs dagegen, hatte keine Auswirkungen auf das Exportverhalten der RNA (Spuren 2 und 3).



**Abb.4.27:** Antikörper gegen eIF-5A inhibieren den Export der Oocyten-Typ 5S rRNA in *Xenopus* Oocyten.

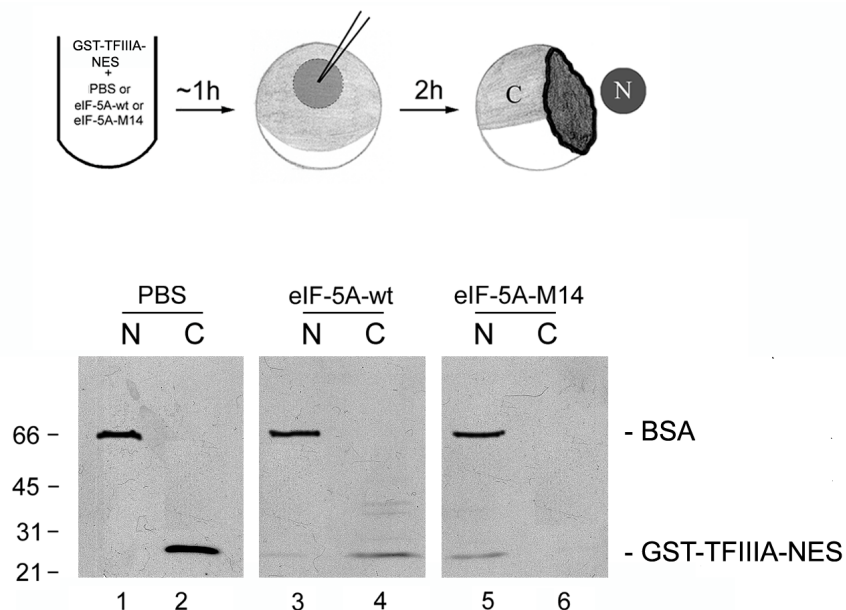
Das Oocyten Injektionsschema ist in der oberen Hälfte gezeigt. Nach Injektion und Inkubation wurden die Oocyten manuell in Kern (N) und Cytoplasma (C) getrennt und Aliquots von jeder Probe wurden für Proteinanalysen mit BSA-Antikörpern bzw. RNA-Analysen mit Digoxigenin-Antikörpern präpariert. In Anwesenheit des unspezifischen IgG wird die Oocyten-Typ 5S rRNA komplett aus dem Kern in das Cytoplasma exportiert (Spuren 2 und 3). Antikörper gegen eIF-5A dagegen inhibieren den Kernexport der Oocyten-Typ 5S rRNA (Spuren 4 und 5). Die ausschließliche Präsenz des coinjizierten, exportdefizienten BSA in den Kernen bestätigt die Genauigkeit der Kerninjektion (Spuren 2 und 4). Spur 1 zeigt die Menge der injizierten RNA Probe.

#### 4.4.3 eIF-5A ist ein Adapter der die Bindung des TFIIIA-NES an CRM1/exportin1 vermittelt

eIF-5A scheint also eine ähnlich essentielle Funktion im Export des TFIIIA und des TFIIIA-vermittelten Exportes der 5S rRNA zu haben, wie es auch im Rev-vermittelten RRE RNA Export hat. Um nun herauszufinden, ob eIF-5A auch in diesem Exportweg eine Adapterfunktion hat und die Bindung des TFIIIA-NES an den generellen Exportrezeptor CRM1/exportin1 vermittelt, wurde die eIF-5A Mutante M14 verwendet. Wie in Kap.4.1.10 gezeigt werden konnte, handelt es sich bei dieser Mutante um ein Protein, welches zwar noch an ein adequates NES binden kann, jedoch nicht mehr an den Exportrezeptor CRM1/exportin1 (siehe auch Abb.4.13), wodurch eine effiziente Bindung des entsprechenden NES-enthaltenden Exportsubstrates an diesen Exportrezeptor und dadurch auch der effiziente Export verhindert wird.

Um den Effekt von eIF-5A-M14 auf den Export des TFIIIA-NES zu untersuchen, wurden Mikroinjektionsexperimente durchgeführt (Abb.4.28).

Vor der Injektion des GST-TFIIIA-NES wurde dieses für 1h auf Eis mit einem 10fachen Überschuß an eIF-5A-M14, eIF-5A-wt bzw. PBS als Kontrolle inkubiert, um eine Bindung der exogenen eIF-5A Proteine an das TFIIIA-NES zu ermöglichen. Nach der Inkubation wurde der jeweilige Mix, zusammen mit BSA als Injektionskontrolle, in die Kerne von *Xenopus* Oocyten injiziert. 2h nach der Injektion wurden Kerne und Cytoplasma getrennt, die Proteine der einzelnen Fraktionen über 18% SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Das injizierte GST-TFIIIA-NES wurde dann durch Antikörper, die gegen GST gerichtet waren, lokalisiert.



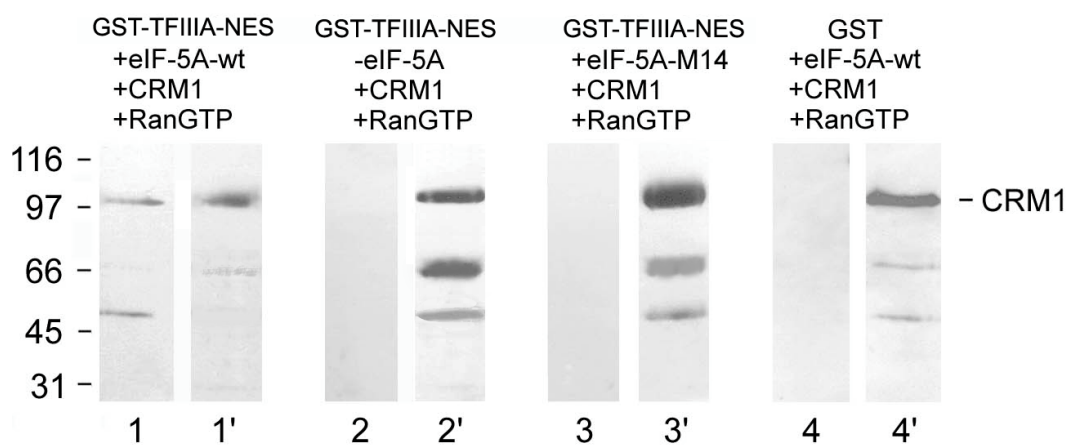
**Abb.4.28:** Inhibition des Kernexportes von GST-TFIIIA-NES durch die eIF-5A-M14 Mutante.

Das Oocyten Injektionsschema ist in der oberen Hälfte gezeigt. Vor der Kerninjektion wurde das Exportsubstrat GST-TFIIIA-NES für 1h auf Eis mit rekombinantem eIF-5A-wt, eIF-5A-M14 oder PBS inkubiert. Nach Injektion und Inkubation wurden die Kern (N)- bzw. Cytoplasma (C)-Proteine über 18% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und diese dann mit Antikörpern gegen GST bzw. BSA inkubiert. In Anwesenheit von PBS und eIF-5A-wt wurde das GST-TFIIIA-NES effizient aus dem Kern ins Cytoplasma exportiert (Spuren 2 und 4). Im Gegensatz dazu wird der Export deutlich durch die eIF-5A Mutante M14 inhibiert (Spuren 5 und 6). Die ausschließliche Präsenz des coinjizierten exportdefizienten BSA in den Kernen bestätigt die korrekte Kerninjektion (Spuren 1, 3 und 5).

Die Molekulargewicht-Marker in kDa sind links gezeigt.

Wie schon die Mikroinjektionen von Antikörper gegen eIF-5A, inhibierte auch eine Inkubation des GST-TFIIIA-NES mit der eIF-5A Mutante M14 den Kernexport des GST-TFIIIA-NES (Abb.4.28: Spuren 5 und 6). Eine Inkubation des Exportsubstrates mit PBS (Abb.4.28: Spuren 1 und 2) oder mit eIF-5A-wt (Spuren 3 und 4) hatte dagegen keine Folgen für den Kernexport.

eIF-5A scheint also auch hier direkt an das TFIIIA-NES zu binden und den Export dadurch zu inhibieren. Ob dies ebenfalls an einer fehlenden Bindung an CRM1/exportin1 liegt, wurde durch Bindungsstudien in Lösung untersucht (Abb.4.29). Hier wurde GST-TFIIIA-NES oder GST alleine an Glutathion-Sepharose Beads immobilisiert. Anschließend wurde dieses dann mit und ohne eIF-5A-wt bzw. eIF-5A-M14 sowie His-CRM1 und Energie in Form von RanGTP inkubiert. Die gebundenen und ungebundenen Fraktionen wurden über 12% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit einem His-spezifischen Antikörper auf eine Bindung des His-CRM1 hin analysiert.



**Abb.4.29:** eIF-5A-wt vermittelt die Bindung von rekombinantem CRM1/exportin1 an GST-TFIIIA-NES.

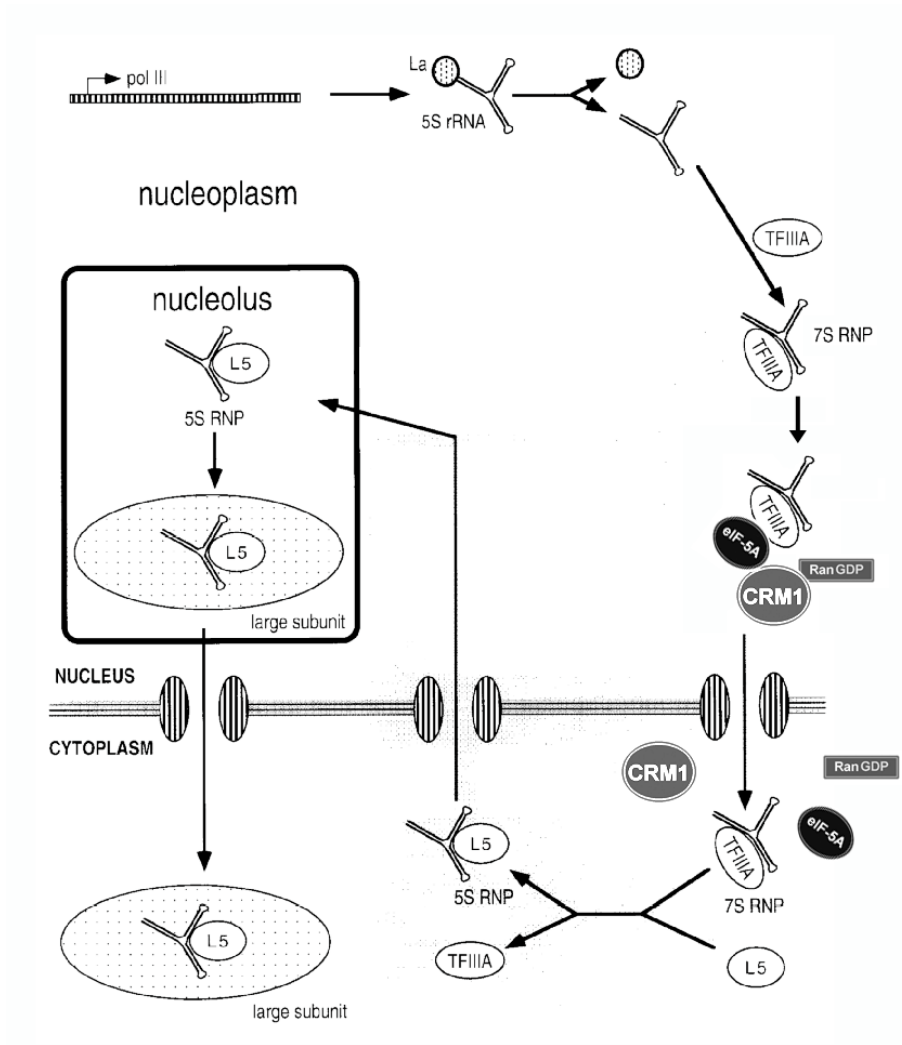
GST-TFIIIA-NES oder GST alleine, welche an Glutathion-Sepharose Beads gebunden waren, wurden in verschiedenen Kombinationen mit RanGTP, eIF-5A-wt oder eIF-5A-M14 inkubiert, ehe rekombinantes His-gekoppeltes CRM1 zugegeben wurde. Gebundenes (Spuren 1-4) und ungebundenes (Spuren 1'-4') CRM1 wurde durch His-spezifische Antikörper nachgewiesen. CRM1 Fusionsprotein bindet nur in Anwesenheit von eIF-5A-wt und RanGTP an das TFIIIA-NES (vergleiche Spur 1 mit den Spuren 2 und 3), nicht jedoch in Anwesenheit von eIF-5A-M14 (Spur 3) und nicht an GST (Spur 4). Bei den 66 und 46kDa Banden handelt es sich vermutlich um CRM1 Abbauprodukte.

Die Molekulargewicht-Marker in kDa sind links gezeigt.

Die Abb.4.29 zeigt, daß CRM1/exportin1, wie schon im Fall des Rev-NES (siehe Kap.4.1.10: Abb.4.14), nur in Gegenwart von eIF-5A-wt an das TFIIIA-NES binden konnte (vergleiche Spur 1 mit 2 und 3). Ohne eIF-5A (Spur 2) oder in Anwesenheit der eIF-5A Mutante M14 (Spur 3) dagegen, hat keine Bindung des His-CRM1 an das NES von TFIIIA stattgefunden. eIF-5A scheint in *Xenopus* Oocyten also eine essentielle Rolle im TFIIIA-vermittelten Export der Oocyten-Typ 5S rRNA zu haben.

Aufgrund der Mikroinjektionsexperimente und Bindungsstudien kann das folgende Modell bezüglich des Exportes der Oocyten-Typ 5S rRNA in *Xenopus* Oocyten erstellt werden (Abb.4.30). Demnach kommt es zunächst zu einer Bindung des TFIIIA an die Oocyten-Typ

5S rRNA. eIF-5A bindet dann an das Kernexportsignal des TFIIIA und vermittelt dadurch eine effiziente Bindung an den Exportrezeptor CRM1/exportin1, wodurch der Export des TFIIIA/5S rRNA Komplexes stattfinden kann.

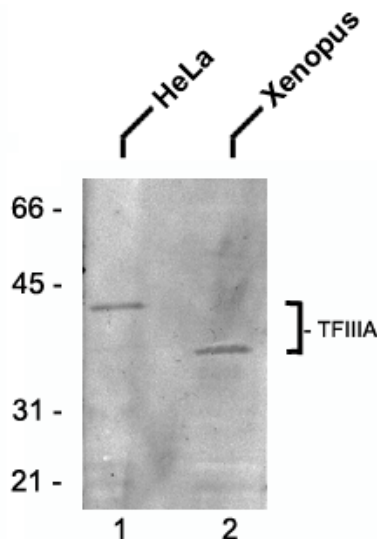


**Abb.4.30:** Modell des Transportes der Oocyten-Typ 5S rRNA in Amphibien Oocyten  
(Modifiziert von Nakielny et al., 1997)



#### 4.4.4 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen *Xenopus* TFIIIA

Zur Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen *Xenopus* TFIIIA wurde eine Maus mit GST-gekoppeltem TFIIIA immunisiert (siehe 3.4). Die erhaltenen Hybridomzellüberstände, die aus der Fusion resultierten, wurden durch Immunblot auf Oocyten-Proteinextrakt und HeLa-Zellextrakt getestet (Abb.4.31). Dazu wurden die Proteine aus *Xenopus* Oocyten sowie HeLa-Zellen über 18% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit den Hybridomzellüberständen inkubiert. Der mAB W9 erkannte im Immunblot jeweils eine spezifische Bande auf den beiden Proteinextrakten in Höhe von 38kDa bei *Xenopus* Oocytenextrakt und 42kDa bei HeLa-Zellextrakt, was jeweils der Höhe von TFIIIA in den jeweiligen Organismen entspricht (siehe Abb.4.31) (Engelke et al., 1980; Moorefield & Roeder, 1994).



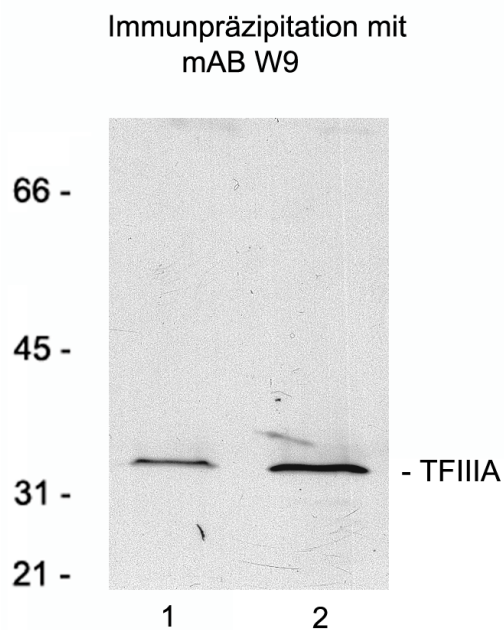
**Abb.4.31:** Immunblot Analyse des monoklonalen mAB W9 auf *Xenopus* Oocytenextrakt und HeLa-Zellextrakt.

*Xenopus* Oocytenproteine (Spur 2) und HeLa-Zellproteine (Spur 1) wurden über 18% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit Hybridomzellüberstand des W9 inkubiert. Der Antikörper zeigt eine spezifische Reaktion auf eine Proteinbande in Höhe von 38kDa bei *Xenopus* Oocytenextrakt und 42kDa bei HeLa-Zellextrakt. Die Molekulargewicht Marker in kDa sind auf der linken Seite angegeben.

Die Bestimmung der Antikörper-Subklasse erfolgte mit Hilfe der doppelten Immundiffusion (Ouchterlony & Nilsson, 1978). Dabei wurde der Antikörper mAB W9 als der IgM Subklasse zugehörend, identifiziert.

Um das erkannte Polypeptid als TFIIIA zu identifizieren, wurde eine Immunpräzipitation mit dem mAB W9 durchgeführt (Abb.4.32). Der Antikörper wurde dazu, wie unter 3.3.3 beschrieben, an aktivierte CNBr-Sepharose gebunden und mit Kernextrakt aus *Xenopus* Oocyten inkubiert. Die gebundene und die nicht gebundene Fraktion wurden anschließend über 18% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit einem bereits bekannten Antikörper gegen TFIIIA (Krämer & Roeder, 1983) inkubiert.

Dieser bereits bekannte TFIIIA-Antikörper erkennt ein deutliches TFIIIA-Signal sowohl in der gebundenen als auch in der ungebundenen Fraktion (Abb.4.32: Spuren 1 und 2). Bei dem mAB W9 handelt es sich also tatsächlich um einen Antikörper, welcher *Xenopus* TFIIIA erkennt.



**Abb.4.32:** Analyse der Immunpräzipitation mit mAB W9 mittels eines bekannten Antikörpers gegen TFIIIA.

mAB W9 wurde an aktivierte CNBr-Sephrose gebunden und mit Kernextrakt aus *Xenopus* Oocyten inkubiert. Die gebundenen (Spur 1) und ungebundenen (Spur 2) Proteine wurden über 18% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit einem bereits bekannten Antikörper gegen TFIIIA analysiert. Der Antikörper erkennt in beiden Fraktionen ein spezifisches Protein in Höhe von 38 kDa, bei dem es sich um TFIIIA handelt. Die Molekulargewicht Marker in kDa sind auf der linken Seite angegeben.



#### 4.5 eIF-5A ist am Kernexport der CD83 mRNA beteiligt

Ein weiterer Hinweis auf eine Rolle von eIF-5A im zellulären RNA Export kommt aus Dendritischen Zellen (DCs). Dendritische Zellen sind die wirkungsvollsten Antigen-präsentierenden Zellen des Immunsystems und darauf spezialisiert Helfer- und Killer-T-Zellen zu sensibilisieren (Steinman, 1991). Unreife DCs nehmen Fremdantigene auf, woraufhin der Reifungsprozess startet. Reife Dendritische Zellen lassen sich dann durch ihre Fähigkeit T-Zellen zu stimulieren, sowie durch ein phänotypisches Expressionsmuster von Oberflächenmolekülen charakterisieren. Eines dieser, für reife DCs charakteristischen, Oberflächenproteine ist neu synthetisiertes CD83, dessen Funktion allerdings noch nicht klar ist (Banchereau & Steinman, 1998) (siehe auch Kap.1.3.2).

Untersuchungen des eIF-5A mRNA Levels in menschlichen Zellen haben gezeigt, daß eIF-5A in verschiedenen Zelllinien und Geweben konstitutiv exprimiert wird. In primären lymphoiden Geweben dagegen, wird die eIF-5A Genexpression durch T-Zell spezifische Stimulantien induziert und zeigt das gleiche Expressionsmuster wie auch CD83 (Bevec et al., 1994; Kruse et al., 2000). Weiterhin wurde gezeigt, daß die CD83 Oberflächenexpression durch Inhibitoren der eIF-5A Hypusinmodifikation (GC7: N<sup>1</sup>-guanyl-1,7-diaminoheptane) geblockt werden kann. In Zellen die mit GC7 behandelt wurden, wurde der Export der CD83 mRNA aus dem Kern ins Cytoplasma spezifisch gehemmt, wodurch die Translation des CD83 Proteins verhindert wurde (Kruse et al., 2000).

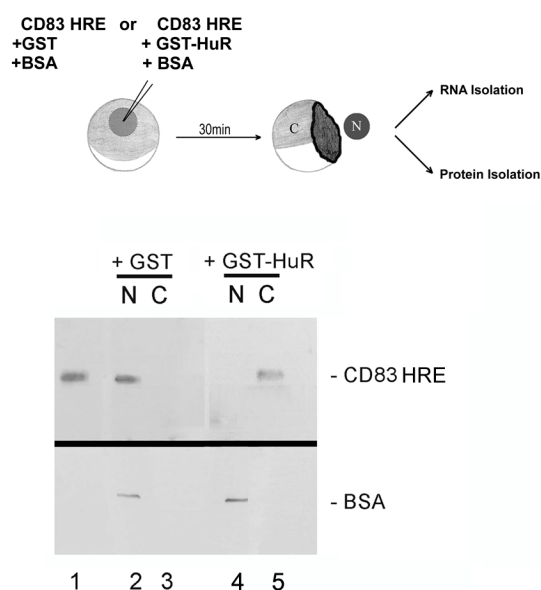
Detaillierte Untersuchungen der CD83 mRNA haben zur Identifikation einer *cis*-aktiven Sequenz in der CD83 codierenden Region geführt, die ein hochstrukturiertes RNA Element bildet, welches spezifisch an das zelluläre Protein HuR bindet (HRE: HuR response element) (siehe auch Kap.1.3.2) (Prechtel et al., submittet).

Da die Ergebnisse aus Dendritischen Zellen darauf hinweisen, daß eIF-5A scheinbar am Export der CD83 mRNA beteiligt sein könnte, wurde der Export der CD83 mRNA detailliert in *Xenopus* Oocyten untersucht.



Kern ins Cytoplasma exportiert (Spuren 4 und 5), während sich 2h nach der Injektion die HRE RNA ausschließlich im Cytoplasma befand (Spuren 6 und 7). In allen Experimenten zeigt die ausschließliche Präsenz von BSA im Kern, daß die Kerninjektion präzise war (Spuren 2, 4 und 6). Diese Daten zeigen, daß die HRE RNA in *Xenopus* Oocyten exportiert wird, wenn auch mit sehr langsamer Kinetik. Spur 1 zeigt die Menge der jeweils injizierten RNA Probe um eventuelle Degradation der RNA in den Oocyten zu bemerken.

Als nächstes wurde eine potentielle Rolle des HuR beim Kernexport der HRE RNA untersucht. GST-HuR oder GST wurde dazu zusammen mit der HRE RNA vor der Injektion für 1h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde dieser Mix dann mit BSA in den Kern injiziert (Abb.4.34). Wie gezeigt werden konnte, hat die Zugabe dieses exogenen HuR den Export der HRE RNA signifikant gesteigert (Abb.4.36). Bereits 30min nach der Injektion hat ein vollständiger Export der injizierten HRE RNA stattgefunden (Spuren 4 und 5). Wie erwartet, hatte eine Coinjektion von GST mit HRE RNA keinen Einfluß auf den Export (Spuren 2 und 3), was ein Hinweis darauf ist, daß der beobachtete Effekt des GST-HuR spezifisch ist.

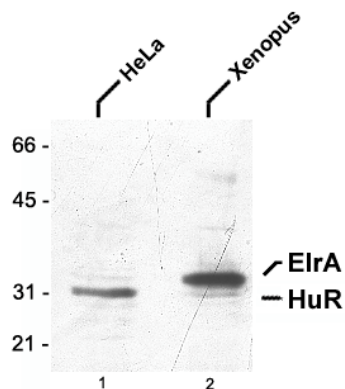


**Abb.4.34:** Coinjiziertes GST-HuR steigert den Export der HRE RNA.

Das Oocyt Injektionsschema ist in der oberen Hälfte gezeigt. 30min nach Injektion wurden Kerne (N) und Cytoplasma (C) manuell isoliert und Aliquots von jeder Probe wurden für Proteinanalysen mit BSA-Antikörpern bzw. für RNA-Analysen mit Digoxigenin-Antikörpern präpariert. Nach Comikroinjektion von HRE RNA mit GST-HuR hat nach 30min ein vollständiger Export der HRE RNA stattgefunden (Spuren 4 und 5), während Comikroinjektion von GST mit HRE RNA keinen Einfluß auf den Export hat (Spuren 2 und 3). Die ausschließliche Präsenz des coinjizierten, exportdefizienten BSA in den Kernen bestätigt die Genauigkeit der Kerninjektion (Spuren 2 und 4). Spur 1 zeigt die Menge der injizierten RNA Probe.

Wie in Abb.4.33 gezeigt, wird CD83 HRE RNA in *Xenopus* Oocyten auch ohne Zugabe exogener Faktoren aus dem Kern exportiert und nicht degradiert. Dies deutet darauf hin, daß sich auch in diesen Oocyten Exportfaktoren für die HRE RNA befinden. In *Xenopus* wurde bereits das Protein ElrA identifiziert (Good, 1995), bei dem es sich um das *Xenopus* Homolog von HuR handelt. Es ist vorstellbar, daß der Export der CD83 HRE RNA durch ElrA

vermittelt wird. Northern Analysen mit Gesamt RNA aus Oocyten haben in der Tat das Vorhandensein eines *elrA*-spezifischen Transkriptes in *Xenopus* Oocyten gezeigt (Prechtel, A.: persönliche Mitteilung). Außerdem war bei Immunblot Analysen auf Proteinextrakt aus Oocyten, mit einem HuR-spezifischen Antikörper, ein Signal in *Xenopus* Oocyten detektierbar (siehe Abb.4.35). Proteine aus HeLa-Zellen und Oocytenextrakt wurden dabei durch 18% SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Diese wurde dann mit einem HuR-spezifischen Antikörper inkubiert. Wie erwartet, war auf HeLa-Zellen ein spezifisches Signal in Höhe von 32kDa (Spur 1) detektierbar, welches dem Molekulargewicht von HuR entspricht. Auf dem Proteinextrakt aus *Xenopus* Oocyten konnte man ein Signal in Höhe von 36kDa detektieren (Spur 2), was dem Molekulargewicht von ElrA, dem HuR-Homolog in *Xenopus* entspricht (Good, 1995).



**Abb. 4.35:** Antikörper gegen HuR erkennen das *Xenopus* Homolog ElrA. HeLa-Zellen (Spur 1) oder Proteinextrakt aus *Xenopus* Oocyten (Spur 2) wurden über 18% SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Diese wurde mit einem HuR-spezifischen Antikörper analysiert. Bei HeLa-Zellen zeigt sich ein spezifisches Signal in Höhe von 32kDa, was dem Molekulargewicht von HuR entspricht. Bei dem Gesamtproteinextrakt aus Oocyten zeigt sich ein spezifisches Signal in Höhe von 36kDa, was dem Molekulargewicht von ElrA entspricht. Die Molekulargewicht-Marker in kDa sind links gezeigt.

#### 4.5.2 HuR wird in *Xenopus* Oocyten nur mit CD83 HRE RNA exportiert

Da die CD83 HRE RNA eine Bindungsstelle für HuR besitzt (Prechtel et al., submittet) und der Export der CD83 HRE RNA in *Xenopus* Oocyten, nach Zugabe des exogenen GST-HuR gesteigert wird (Abb.4.34), kann man davon ausgehen, daß durch Bindung von HuR an die HRE RNA der Komplex exportiert wurde. Im Umkehrschluß würde das bedeuten, daß auch das injizierte HuR aus dem Kern exportiert wird. Um das Exportverhalten des HuR Proteins in *Xenopus* Oocyten zu überprüfen, wurde His-gekoppeltes HuR zusammen mit BSA als Injektionskontrolle in Kerne von *Xenopus* Oocyten injiziert (Abb.4.36). Nach einer Inkubationszeit von 2h wurden Kerne und Cytoplasma manuell isoliert und die Proteine der

einzelnen Fraktionen über 18% SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf Nitrocellulose wurde das injizierte His-HuR mit einem Antikörper gegen His und das BSA mit einem BSA-Antikörper nachgewiesen.

In den Kern injiziertes His-HuR war jedoch nach 2h nur im Kern detektierbar (Abb.4.36: Spuren 1 und 2). Um die generelle Transportfähigkeit des HuR in *Xenopus* Oocyten zu überprüfen, wurde His-HuR als nächstes in das Cytoplasma injiziert. Wie die Abb.4.36 zeigt, wird das in das Cytoplasma injizierte His-HuR effizient in den Kern importiert (Spuren 3 und 4).

Es ist bereits bekannt, daß HuR ein Importsignal besitzt, das Polymerase II abhängig funktioniert. Import von Proteinen mit solchen Kernimportsignalen läßt sich durch die Droge Actinomycin D, die die Polymerase II-abhängige Transkription blockiert, inhibieren. Um nun die Gründe für die ausschließliche Lokalisation des injizierten His-HuR im Kern genauer zu analysieren, wurden Oocyten vor der Kerninjektion für 1h in Actinomycin D inkubiert (siehe auch 3.1.4). Anschließend wurde His-HuR mit BSA und der CD83 HRE RNA in Kerne coinjiziert. Die Präparation erfolgte dann wie oben beschrieben. Die Ergebnisse aus diesem Versuch zeigen, daß sich nach Actinomycin D Behandlung His-HuR, das zusammen mit CD83 HRE RNA injiziert wurde, im Cytoplasma befand (Abb.4.38: Spuren 5 und 6). His-HuR dagegen, das mit CD83 HRE RNA und BSA ohne vorherige Actinomycin D Behandlung injiziert wurde, war wiederum ausschließlich im Kern detektierbar (Abb.4.36: Spuren 7 und 8).

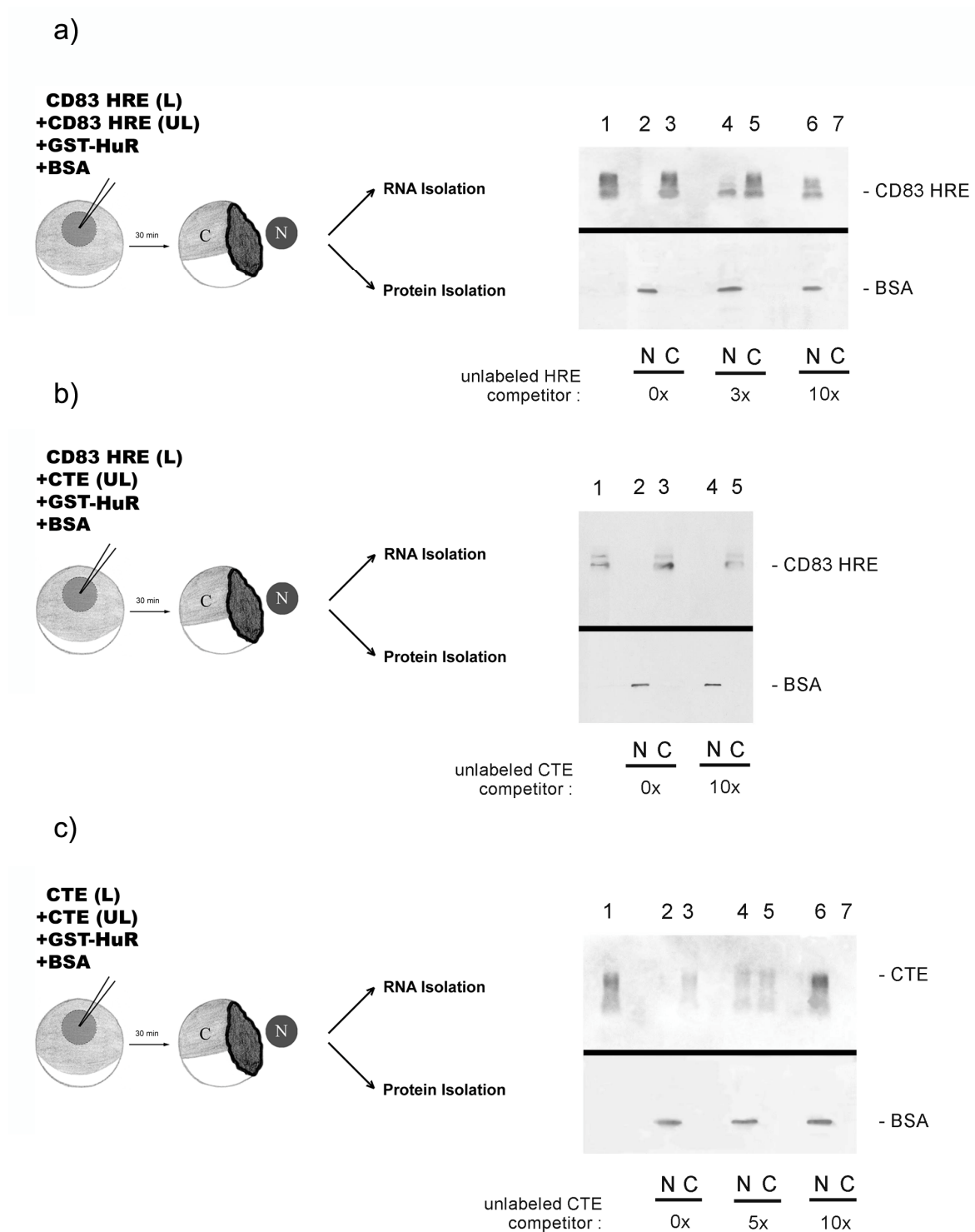
Dies bedeutet, daß HuR in *Xenopus* Oocyten nur zusammen mit einer coinjizierten mRNA (HRE RNA) aus dem Kern exportiert wird. Des weiteren zeigen die Ergebnisse, daß es scheinbar sofort nach der Ankunft des HRE RNA/HuR Komplexes im Cytoplasma, zu einer Dissoziation des Komplexes kommt, woraufhin HuR sofort wieder in den Kern zurückkehrt. Dabei kann die Rückkehr ins Cytoplasma durch eine Inhibition des Kernimportweges durch die Droge Actinomycin D verhindert werden. Diese wird auch bestätigt durch UV-crosslinking Experimente. Hierbei wurde HRE RNA durch UV-crosslinken irreversibel an GST-HuR gebunden. Injektion dieses Komplexes in den Kern führte zu einem Export und anschließendem Verbleib des GST-HuR im Cytoplasma (Daten nicht gezeigt). Scheinbar wird also durch eine Bindung der HRE RNA an HuR ein Kernlokalisierungssignal im HuR verdeckt, das erst nach einer Ablösung der HRE RNA im Cytoplasma wieder frei zugänglich ist, so daß ein Import stattfinden kann. Daß HuR in Oocyten nur mit einem coinjizierten, exogenen Substrat exportiert wird, könnte auch den extrem langsamen Export der injizierten HRE RNA



### 4.5.3 HuR-vermittelter Export der CD83 HRE RNA erfolgt über den Exportrezeptor CRM1/exportin1 und nicht über TAP

Zur Zeit sind zwei zelluläre Hauptexportwege bekannt, die von Retroviren benutzt werden, um ihre viralen mRNAs aus dem Kern zu exportieren. Der CRM1/exportin1 Exportweg ist zum Beispiel involviert in den Transport von unvollständig oder nicht gespleißter mRNAs des HIV-1. An dem zweiten Hauptexportweg ist das zelluläre Protein TAP beteiligt. TAP interagiert direkt mit *cis*-aktiven CTEs, die in den Genomen einfacherer Viren wie MPMV vorkommen. Wichtig dabei ist, daß TAP scheinbar auch im zellulären mRNA Export involviert ist, und das sich dieser mRNA Export wesentlich vom CRM1/exportin1-vermittelten Export unterscheidet (siehe auch Kap.1.3).

Daher sollte eine Inhibition des CTE-TAP Exportweges keinen negativen Effekt auf den CRM1/exportin1-vermittelten RNA Export haben. Um den für die HRE RNA zuständigen Exportweg zu finden, wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt. Verschiedene Mengen Digoxigenin-markierter und unmarkierter CTE- bzw. HRE RNA wurden zusammen mit GST-HuR comikroinjiziert, um die Konkurrenz der RNAs untereinander für die jeweiligen Exportfaktoren zu untersuchen (Abb.4.37). In 3 verschiedenen Mikroinjektionsexperimenten wurde 1. die Konkurrenz von markierter HRE RNA mit dem 3 bzw. 5fachen Überschuß an nicht markierter HRE RNA (Abb.4.37a), 2. Konkurrenz von markierter HRE RNA mit dem 10fachen Überschuß an unmarkierter CTE RNA (Abb.4.37b) und 3. die Konkurrenz von markierter CTE RNA mit dem 5 bzw. 10fachen Überschuß an unmarkierter CTE RNA (Abb.4.37c) untersucht. In allen Injektionsexperimenten wurde BSA als Injektionskontrolle coinjiziert. 30min nach der Injektion wurden Kerne und Cytoplasma manuell isoliert und die einzelnen Fraktionen, wie unter 4.5.1 beschrieben, präpariert.



**Abb.4.37:** Der Kernexport der CD83 HRE RNA unterscheidet sich vom CTE-TAP Exportweg. Das jeweilige Oocyten-Injektionsschema ist in der linken Hälfte gezeigt. Nach Coinjektion der jeweiligen Digoxigenin-markierten (L) und unmarkierten (UL) RNA mit GST-HuR und BSA, wurden Kerne (N) und Cytoplasma (C) nach 30 min Inkubation getrennt. Eine Hälfte der Proben wurde für Western Blot Analysen mit BSA-Antikörpern und die andere Hälfte für Northern Blot Analysen mit Digoxigenin-Antikörpern präpariert. Ein 10facher Überschuß an unmarkierte HRE RNA kompetitiert erfolgreich mit der Digoxigenin-markierten HRE RNA (a: Spuren 2-7), ebenso wie ein 10facher Überschuß an unmarkierter CTE RNA mit markierter CTE RNA (c: Spuren 2-7). Ein 10facher Überschuß an unmarkierter CTE RNA hat jedoch keinen Einfluß auf den Export markierter HRE RNA (b: Spuren 2-5), was zeigt, daß die beiden RNAs unterschiedliche Exportwege und damit auch Exportfaktoren benutzen. Die ausschließliche Präsenz des coinjizierten, exportdefizienten BSA in den Kernen bestätigt die Genauigkeit der Kerninjektion. Spur 1 zeigt jeweils die Menge der injizierten RNA Probe.

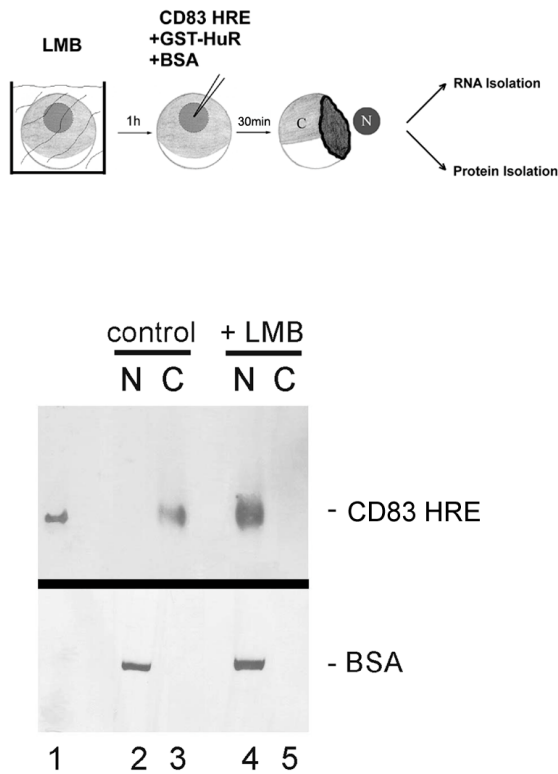


Wie die Abb.4.37a zeigt, wurde der GST-HuR-vermittelte HRE RNA Export durch einen 10fachen Überschuss an unmarkierter HRE RNA komplett blockiert, da aufgrund des Überschusses an RNA alle benötigten Exportfaktoren belegt sind (Spuren 2-7). Im Gegensatz dazu, wurde der Kernexport der HRE RNA jedoch nicht negativ beeinflusst, wenn unmarkierte HRE RNA durch unmarkierte, heterologe CTE RNA ersetzt wurde (Abb.4.37b). Trotz eines 10fachen Überschusses an unmarkierter CTE RNA ist ein ausschließlich cytoplasmatisches, HRE-spezifisches Signal in diesem Experiment detektierbar (Spuren 2-5). Im Kontrollexperiment dagegen, indem die Konkurrenz von markierter CTE RNA mit unmarkierter CTE RNA untersucht wurde (Abb.4.37c), inhibierte ein 10facher Überschuss an unmarkierter CTE RNA effektiv den Export seiner homologen RNA (Spuren 2-7). Diese Daten zeigen deutlich, daß der Kernexportweg, für die nucleocytoplasmatischen Translokation der CD83 HRE RNA sich definitiv vom zellulären TAP-abhängigen mRNA Exportweg, den CTE benutzt, unterscheidet.

Die RNA-Doppelbanden, die hier auftreten, resultieren aus der *in vitro* Transkription von Digoxigenin-markierter HRE RNA. Aufgrund der Digoxigenin-Markierung ist es nicht mehr möglich die RNA anschließend durch Phenolisierung zu reinigen, wodurch HRE-spezifische Abbauprodukte nicht entfernt werden können.

Kürzlich konnte gezeigt werden, daß HuR mit einer Familie zellulärer Shuttleproteine interagieren kann, die über den Exportrezeptor CRM1/exportin1 aus dem Kern exportiert werden (Brennan et al., 2000). Da der HuR-vermittelte HRE RNA Export nicht über den Exportrezeptor TAP geht, könnte man indirekt daraus schließen, daß HuR einige zelluläre mRNAs über den spezifischen CRM1/exportin1 Exportweg aus dem Kern transportiert. Um eine potentielle Rolle von CRM1/exportin1 bei der nucleocytoplasmatischen Translokation der HRE RNA zu analysieren, wurde der spezifische Inhibitor der CRM1/exportin1 Exportfunktion, die Droge Leptomycin B (LMB), verwendet (Abb.4.38). Oocyten wurden vor der Injektion der HRE RNA zusammen mit BSA und GST-HuR für 1h in Medium mit einer Konzentration von 20nM LMB, bzw. in Medium ohne LMB inkubiert (siehe auch 3.1.4). 30min nach der Injektion wurden Kerne und Cytoplasma manuell isoliert und die einzelnen Fraktionen für Northern Blot (siehe 3.6.1) bzw. Western Blot Analysen (siehe 3.2.1 und 3.3.4) präpariert. Wie in Abb. 4.38 gezeigt, wurde im Kontrollexperiment, ohne Inkubation mit Leptomycin B, die CD83 HRE RNA effizient aus dem Kern ins Cytoplasma exportiert (Spuren 2 und 3). Im Gegensatz dazu führte eine Inkubation der Oocyten mit LMB zu einer

eindeutigen Inhibition dieses Exportes (Spuren 4 und 5). Der Exportrezeptor CRM1/exportin1 scheint also in der Tat in den HuR-vermittelten Export der CD83 HRE RNA involviert zu sein.



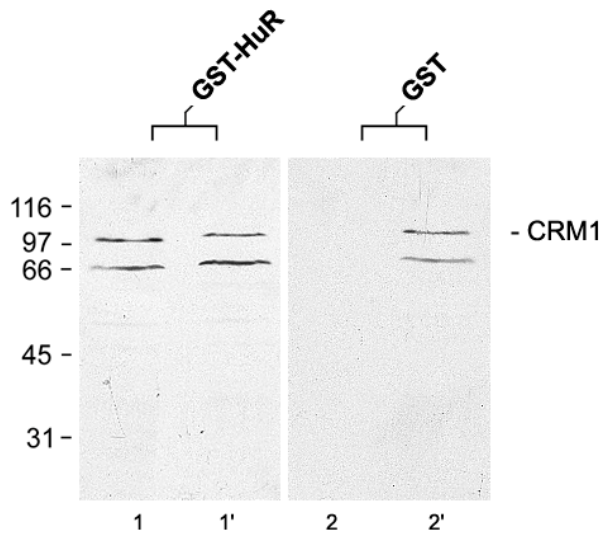
**Abb.4.38:** Export der CD83 HRE RNA wird durch LMB inhibiert.

Das Injektionsschema ist in der oberen Hälfte gezeigt. Digoxigenin markierte CD83 HRE RNA wurde zusammen mit GST-HuR und BSA als Injektionskontrolle in Oocytenkerne injiziert. Vor der Injektion wurden die Oocyten entweder in Medium mit bzw. ohne Leptomycin B (LMB) inkubiert. Nach Injektion und Inkubation wurden Kerne (N) und Cytoplasma (C) manuell isoliert und für Western Blots mit BSA-Antikörpern bzw. Northern Blots mit Digoxigenin-Antikörpern präpariert. Ein effizienter Export der HRE RNA findet nur in Oocyten statt, die nicht mit LMB inkubiert wurden (Spuren 2 und 3). Eine Inkubation der Oocyten mit LMB dagegen, führt zu einer kompletten Inhibition des HRE RNA Exportes (Spuren 4 und 5). Die ausschließliche Präsenz des coinjizierten, exportdefizienten BSA in den Kernen bestätigt die Genauigkeit der Kerninjektion (Spuren 2 und 4). Spur 1 zeigt die Menge der injizierten RNA Probe.

Dieses Ergebnis konnte auch durch Bindungsstudien in Lösung bestätigt werden, in denen eine Bindung von CRM1/exportin1 an GST-HuR gezeigt wurde (Abb.4.39). GST-gekoppeltes HuR oder GST alleine, wurde dabei an Glutathion-Sepharose Beads immobilisiert und mit Gesamt-Proteinextrakt aus *Xenopus* Oocyten inkubiert. Die Beads wurden anschließend durch Zentrifugation pelletiert und das gebundene und ungebundene Material mittels Western Blot unter Verwendung eines CRM1-spezifischen Antiserums (Kudo et al., 1997) analysiert (siehe 3.3.4).

Wie die Abb.4.39 zeigt, hat endogenes CRM1/exportin1 an GST-HuR gebunden (Spur 1), während keine Bindung an GST alleine erfolgte (Spur 2), was die Spezifität der Bindung bestätigt.

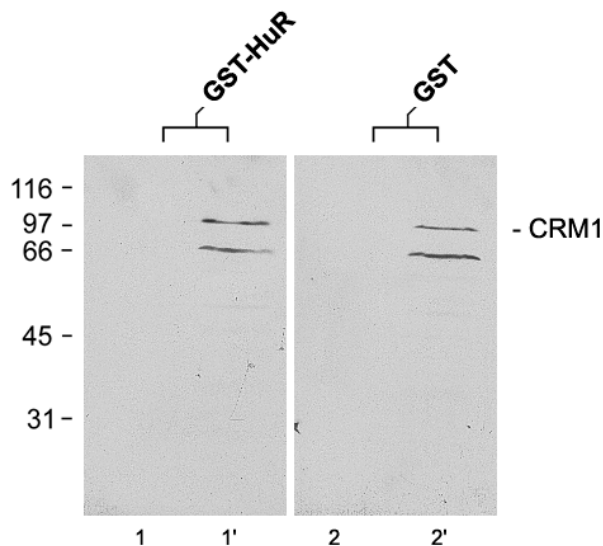
Zusammengenommen zeigen die Mikroinjektionsstudien sowie diese Bindungsstudie eindeutig, daß der Export der HRE RNA, der durch HuR vermittelt wird, auch den generellen Exportrezeptor CRM1/exportin1 involviert.



**Abb.4.39:** CRM1/exportin1 bindet an GST-HuR. Glutathion-Sepharose Beads an die GST-HuR bzw. GST alleine gekoppelt waren, wurden mit Gesamtprotein Extrakt aus *Xenopus* Oocyten inkubiert. Gebundene (Spuren 1 und 2) und ungebundene Proteine (Spuren 1' und 2') wurden über 12% SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunblot mit einem CRM1 Antiserum analysiert. Die gebundene Fraktion ist in den Spuren 1 und 2 gezeigt und die ungebundene Fraktion in den Spuren 1' und 2'. CRM1/exportin1 bindet an GST-HuR (Spur 1) aber nicht an GST alleine (Spur 2). Die Molekulargewicht-Marker in kDa sind links gezeigt.

#### 4.5.4 Der HuR Ligand APRIL ist in den Export der CD83 HRE RNA involviert

Der Kernexport von RNAs über den CRM1/exportin1 Kernexportweg wird durch spezifische RNA-bindende Proteine vermittelt, welche ein Leucin-reiches, Rev-ähnliches Kernexportsignal (NES) besitzen (Nakielny & Dreyfuss, 1999). Untersuchungen der HuR Sequenz haben jedoch gezeigt, daß dieses Protein keine solche Leucin-reiche Domäne besitzt, die funktionell mit CRM1/exportin1 interagieren könnte (Ma et al., 1996). Diese fehlende direkte Interaktion zwischen HuR und CRM1/exportin1 wurde auch durch Bindungsstudien in Lösung bestätigt (Abb.4.40). GST-HuR oder GST alleine wurden dabei an Glutathion-Sepharose Beads immobilisiert. Inkubiert wurde jedoch nicht mit *Xenopus* Oocyten Extrakt, sondern dieser wurde ersetzt durch Energie in Form von RanGTP und His-gekoppeltem CRM1. Eine Bindung des His-CRM1 an HuR wurde dann durch einen Antikörper gegen His nachgewiesen. Wie die Abb.4.40 zeigt, hat His-CRM1 ohne Oocyten Extrakt, nur in Gegenwart von Energie, nicht mehr an das GST-gekoppelte HuR gebunden (vergleiche Abb.4.39: Spur 1 mit Abb.4.40: Spur 1). Dies bedeutet, daß weitere zelluläre Faktoren, die HuR mit dem Exportrezeptor CRM1/exportin1 verbinden, am Export der HRE RNA beteiligt sein müssen.

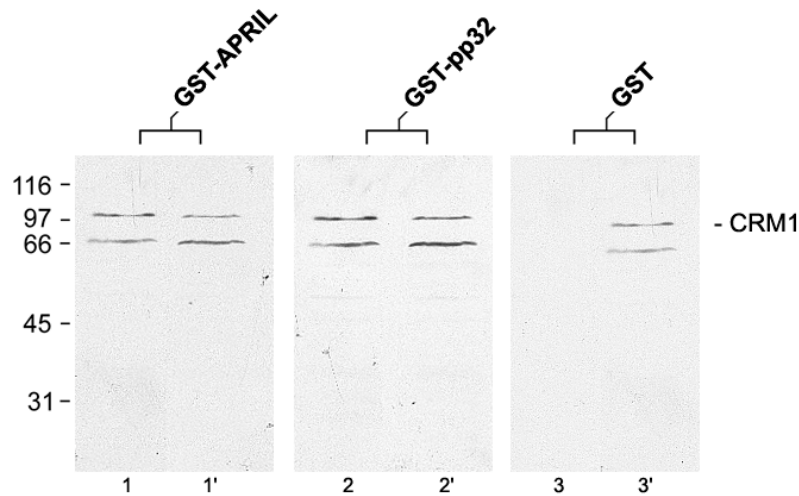


**Abb.4.40:** Ohne zusätzliche endogene Faktoren bindet CRM1/exportin1 nicht an HuR.

GST-HuR oder GST alleine wurden an Glutathion-Sepharose Beads immobilisiert und mit RanGTP sowie His-CRM1 inkubiert. Gebundene (Spuren 1 und 2) und ungebundene (Spuren 1' und 2') Proteine wurden über 12% SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem His-spezifischen Antikörper analysiert. His-CRM1 bindet weder an GST-HuR (Spur 1) noch an GST alleine (Spur 2). Die Molekulargewicht-Marker in kDa sind links gezeigt.

Mittlerweile wurden zwei Protein Liganden von HuR identifiziert, APRIL und pp32, die beide multiple Rev-ähnliche, Leucin-reiche Repeats besitzen, die als NES fungieren könnten (Brennan et al., 2000). Von beiden Proteinen konnte gezeigt werden, daß sie an den Exportrezeptor CRM1/exportin1 binden und daß ihr Kernexport durch die Droge Leptomycin B gehemmt wird (Brennan, et al., 2000). Daher kann man diese beiden HuR-Liganden als potentielle Kandidaten betrachten, die HuR mit dem CRM1/exportin1-abhängigen Exportweg verbinden.

Ehe die Rolle dieser beiden Proteine im HuR-vermittelten HRE RNA Export genauer analysiert wurde, wurde zunächst die Bindung dieser beiden Proteine an *Xenopus* CRM1/exportin1 durch Pull down Experiment überprüft (Abb.4.41). Wie unter 3.2.7 beschrieben, wurde GST-gekoppeltes APRIL bzw. GST-pp32 oder GST alleine an Glutathion-Sepharose Beads immobilisiert und mit Oocyten Extrakt inkubiert. Die gebundenen und ungebundenen Fraktionen wurden dann über 12% SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert, um diese dann anschließend mit einem CRM1-spezifischem Antiserum zu analysieren. Wie die Abb.4.41 zeigt, hat *Xenopus* CRM1/exportin1 in der Tat sowohl an APRIL als auch an pp32 (Spuren 1 und 2), nicht jedoch an GST alleine gebunden (Spur 3).



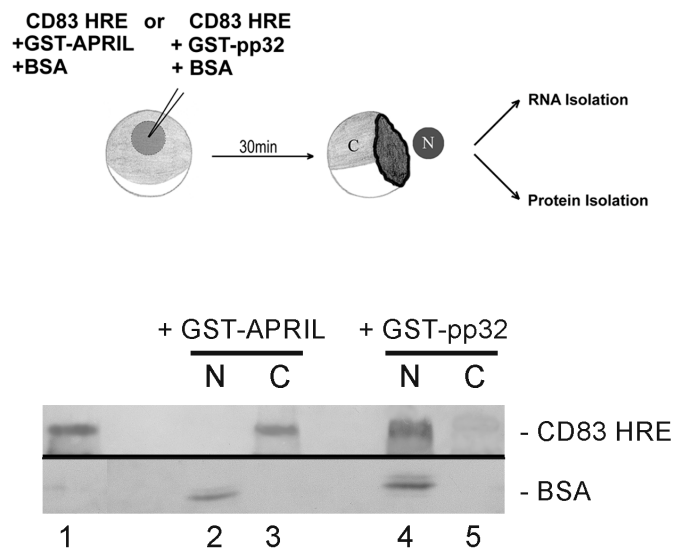
**Abb.4.41:** *Xenopus* CRM1/exportin1 bindet sowohl an APRIL als auch an pp32.

GST-APRIL bzw. GST-pp32 oder GST alleine wurden an Glutathion-Sepharose Beads immobilisiert und mit Oocyten Proteinextrakt inkubiert. Gebundene (Spuren 1, 2 und 3) und ungebundene (Spuren 1', 2' und 3') Proteine wurden über 12% SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem CRM1-spezifischem Antiserum analysiert. *Xenopus* CRM1/exportin1 bindet sowohl an GST-APRIL (Spur 1) als auch an GST-pp32 (Spur 2), nicht jedoch an GST (Spur 3). Die Molekulargewicht- Marker in kDa sind links gezeigt.

Um nun herauszufinden, welcher dieser beiden HuR-Liganden am HRE RNA Export beteiligt ist, wurden Comikroinjektionsexperimente durchgeführt. Digoxigenin-markierte HRE RNA wurde zum einen mit GST-APRIL und zum anderen mit GST-pp32 in Kerne von *Xenopus* Oocyten injiziert (Abb.4.42). In allen Experimenten wurde BSA als Injektionskontrolle coinjiziert. 30min nach der Injektion wurden Kerne und Cytoplasma getrennt. Eine Hälfte der Proben wurde für Western Blots präpariert um das coinjizierte BSA nachzuweisen (siehe 3.2.1 und 3.3.4), die andere Hälfte wurde für Northern Blots präpariert, um die Digoxigenin-markierte RNA zu detektieren (siehe 3.6.1 und 3.6.4).

Comikroinjektion der HRE RNA zusammen mit GST-APRIL führte dabei zu einer schnellen und kompletten Translokation der HRE RNA aus dem Kern ins Cytoplasma (Abb.4.42: Spuren 2 und 3). Im Gegensatz dazu führte eine Coinjektion der HRE RNA mit GST-pp32 zu keinem Export (Abb.4.42: Spuren 4 und 5), obwohl APRIL und pp32 große strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen (Brennan & Steitz, 2001). Dieses Ergebnis wurde auch durch Studien in somatischen Zellen bestätigt. Hier wurden Cos-Zellen mit einem Reporter Plasmid, das die CD83 HRE Sequenz enthielt, transfiziert. Eine Cotransfektion dieses Reporters mit Vektoren die entweder HuR oder APRIL überexprimierten, führte zu einer gesteigerten Reporter-Aktivität, während eine Cotransfektion des Reporters mit Vektoren, die HuR und

pp32 überexprimierten keinen Effekt hatte (Prechtel et al., submittet). Diese Daten, die aus *Xenopus* Oocyten und somatischen Zellen gewonnen wurden, stimmen genau überein und deuten darauf hin, daß der HuR-Ligand APRIL, nicht aber pp32 Teil des CD83 HRE RNA Exportweges ist.



**Abb.4.42:** Comikroinjektion von HRE RNA mit GST-APRIL, nicht aber mit GST-pp32 führt zu einem Export der HRE RNA. Das Oocyten-Injektionsschema ist in der oberen Hälfte gezeigt. Digoxigenin markierte CD83 HRE RNA wurde zusammen mit GST-APRIL bzw. GST-pp32 und BSA als Injektionskontrolle in Oocytenkerne injiziert. Nach Injektion und Inkubation wurden Kerne (N) und Cytoplasma (C) manuell isoliert und für Western Blots mit BSA-Antikörpern bzw. Northern Blots mit Digoxigenin-Antikörpern präpariert. Ein effizienter Export der HRE RNA findet nur bei Coinjektion mit GST-APRIL (Spuren 2 und 3), nicht aber bei Coinjektion mit GST-pp32 (Spuren 4 und 5) statt. Die ausschließliche Präsenz des coinjizierten, exportdefizienten BSA in den Kernen bestätigt die Genauigkeit der Kerninjektion (Spuren 2 und 4). Spur 1 zeigt die Menge der injizierten RNA Probe.

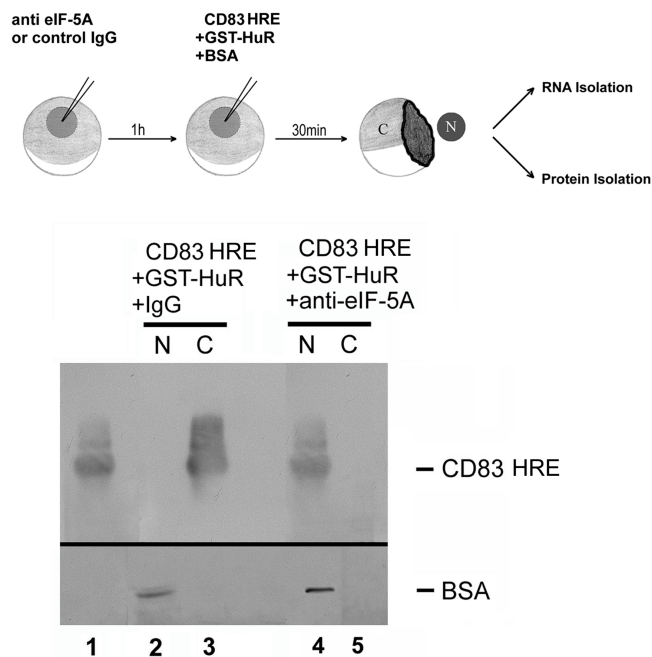
#### 4.5.5 eIF-5A ist ein weiterer Cofaktor im HuR-vermittelten Export der CD83 HRE RNA

In Dentritischen Zellen konnte der Export der CD83 mRNA durch einen Inhibitor der eIF-5A Hypusinmodifikation gehemmt werden (Kruse et al., 2000) (siehe auch Kap.1.5). Dies läßt vermuten, daß eIF-5A ein wesentlicher Cofaktor im HuR-vermittelten Export der CD83 mRNA ist. In Analogie zur HIV-1 Rev-RRE-RNA-Achse, bei der eIF-5A eine Adapterfunktion hat, indem es Rev-NES mit dem Exportrezeptor CRM1/exportin1 verbindet (siehe Kap.4.1), wurde daher eine Rolle von eIF-5A beim HuR-vermittelten HRE RNA Export in *Xenopus* Oocyten untersucht.

Wie in Abb.4.43 gezeigt, wurden Antikörper gegen eIF-5A bzw. unspezifisches IgG in Kerne von *Xenopus* Oocyten injiziert. Nach einer Inkubationszeit von 1h wurde HRE RNA zusammen mit GST-HuR als Exportsubstrat und BSA als Injektionskontrolle in die Kerne coinjiziert. 30min nach der Injektion wurden Kerne und Cytoplasma manuell isoliert und die



einzelnen Fraktionen wurden zur Hälfte für Western Blots und für Northern Blots präpariert (siehe 3.3.4 und 3.6.4).



**Abb.4.43:** Antikörper gegen eIF-5A inhibieren den HuR-vermittelten Kernexport der HRE RNA. Das Oocyten Injektionsschema ist in der oberen Hälfte gezeigt. Nach Injektion und Inkubation wurden die Oocyten manuell in Kern (N) und Cytoplasma (C) getrennt und Aliquots von jeder Probe wurden für Proteinanalysen mit BSA-Antikörpern bzw. RNA-Analysen mit Digoxigenin-Antikörpern präpariert. In Anwesenheit des unspezifischen IgG wird die HRE RNA komplett aus dem Kern in das Cytoplasma exportiert (Spuren 2 und 3). Antikörper gegen eIF-5A dagegen, inhibieren den Kernexport der HRE RNA (Spuren 4 und 5). Die ausschließliche Präsenz des coinjizierten, exportdefizienten BSA in den Kernen bestätigt die Genauigkeit der Kerninjektion (Spuren 2 und 4). Spur 1 zeigt die Menge der injizierten RNA Probe.

Wie erwartet, wurde die HRE RNA in Anwesenheit des unspezifischen IgG effizient aus dem Kern in das Cytoplasma exportiert (Abb.4.43: Spuren 2 und 3). Antikörper gegen eIF-5A dagegen, inhibierten deutlich den HuR-vermittelten Kernexport der HRE RNA (Spuren 4 und 5). Dies bestätigt die Ergebnisse aus den Dentritischen Zellen und zeigt, daß eIF-5A in der Tat am HuR-vermittelten Kernexport der HRE RNA beteiligt ist.

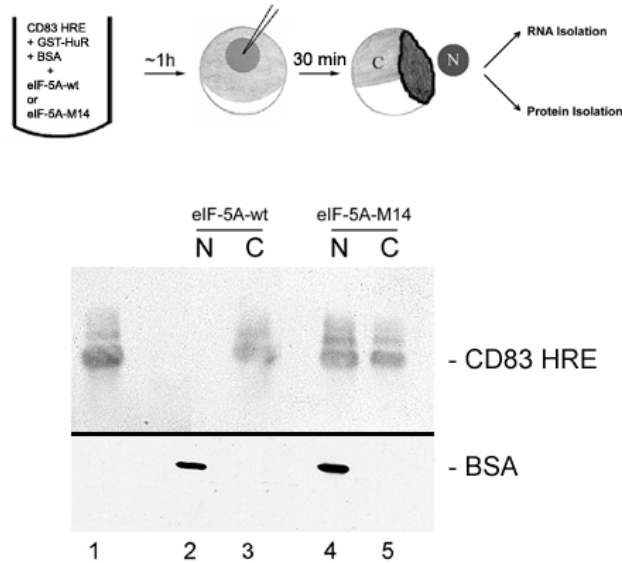
Da von der eIF-5A Mutante M14 bereits gezeigt werden konnte, daß sie den Export der HIV-1 RRE RNA inhibiert, indem sie eine Bindung des HIV-1 Rev Proteins an den Exportrezeptor CRM1/exportin1 verhindert (siehe Kap.4.1.10), wurde als nächstes diese Mutante in die Untersuchungen des HRE RNA Exportes mit eingeschlossen (Abb.4.44). HRE RNA wurde zusammen mit GST-HuR vor der Injektion für 1h auf Eis mit dem rekombinanten eIF-5A-wt oder eIF-5A-M14 bzw. PBS als Kontrolle inkubiert, um diesem exogenen eIF-5A die Möglichkeit zu geben an den RNA/HuR Komplex zu binden. Durch den hohen Überschuß an exogenem eIF-5A sollten alle Bindungsstellen abgesättigt werden, so daß endogenes eIF-5A nicht mehr binden kann.

Anschließend wurden diese Mischungen zusammen mit BSA als Injektionskontrolle in den Kern injiziert. Nach 30min Inkubation wurden Kerne und Cytoplasma getrennt. Bei einer

Hälfte der Proben wurden die Proteine über 18% SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert, die dann mit BSA-Antikörpern inkubiert wurde (siehe 3.3.4). Aus der anderen Hälfte der Proben wurde Gesamt-RNA isoliert und für Northern Blot präpariert, um die Digoxigenin-markierte RNA zu lokalisieren (siehe 3.6.3).

Wie die Abb.4.44 zeigt, wurde durch eine Inkubation des HRE RNA/HuR Komplexes mit exogenem eIF-5A-M14 der HRE RNA Export partiell gehemmt (Spuren 4 und 5), während Inkubation des Komplexes mit eIF-5A-wt (Spuren 2 und 3) keinen Einfluß auf den Export hatte. Daß der Export der HRE RNA nicht vollständig durch die eIF-5A Mutante M14 gehemmt wurde, wie im Fall der HIV-1 RRE RNA (siehe 4.1.6), steht in Übereinstimmung mit der Hypothese daß eIF-5A eine Adapterfunktion hat, bei der es Leucin-reiche Kernexportsignale adäquater Proteine mit CRM1/exportin1 verbindet. Die Ergebnisse aus den Untersuchungen des Exportweges des HIV-1 Rev Proteins sowie des Rev-vermittelten RRE RNA Exportes haben gezeigt, daß eIF-5A als ein Adapter wirkt, der das Kernexportsignal des HIV-1 Rev mit dem Exportrezeptor CRM1/exportin1 verbindet, wodurch der Rev/RNA Komplex dann exportiert werden kann. Da HuR selbst kein Leucin-reiches Kernexportsignal besitzt und auch nicht direkt an CRM1/exportin1 bindet (siehe 4.5.4), würde eIF-5A, dem Funktionsmodell folgend, natürlich auch nicht an HuR binden. Vielmehr sollte eIF-5A an die Leucin-reichen Kernexportsignale der beiden HuR-Liganden pp32 und APRIL binden und die direkte Bindung dieser Kernexportsignale an CRM1/exportin1 verhindern. Dies würde auch die partielle Inhibition des HRE RNA Exportes durch eIF-5A-M14 erklären. Demnach würde eIF-5A-M14 nicht an GST-HuR binden sondern nach der Injektion in die Oocyten mit dem endogen vorhandenen eIF-5A um eine Bindung an die, in Oocyten vorhandenen, Cofaktoren konkurrieren. Im Gegensatz zu Antikörpern gegen eIF-5A, die auch bereits an Faktoren gebundenes endogenes eIF-5A in Oocyten inhibieren, kann die eIF-5A Mutante nicht mehr an Faktoren binden und diese durch die Bindung inhibieren, die bereits von endogenem eIF-5A gebunden wurden. Daher kann es in diesem Fall nur zu einer partiellen Inhibition des Exportes kommen.

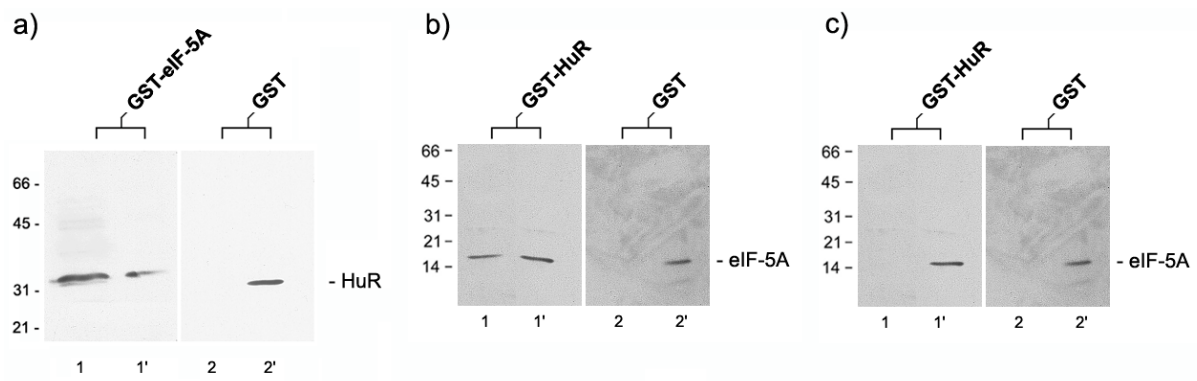




**Abb.4.44:** Partielle Inhibition des Kernexportes der HRE RNA durch die eIF-5A-M14 Mutante. Das Oocyten Injektionsschema ist in der oberen Hälfte gezeigt. Vor der Kerninjektion wurde HRE RNA zusammen mit GST-HuR für 1h auf Eis mit rekombinantem eIF-5A-wt oder eIF-5A-M14 inkubiert. Nach Injektion und Inkubation wurden die Oocyten manuell in Kern (N) und Cytoplasma (C) getrennt und Aliquots von jeder Probe wurden für Proteinanalysen mit BSA-Antikörpern bzw. RNA-Analysen mit Digoxigenin-Antikörpern präpariert. In Anwesenheit von eIF-5A-wt wurde die HRE RNA effizient aus dem Kern ins Cytoplasma exportiert (Spuren 2 und 3). Im Gegensatz dazu wird der Export partiell durch die eIF-5A Mutante M14 inhibiert (Spuren 4 und 5). Die ausschließliche Präsenz des coinjizierten exportdefizienten BSA in den Kernen bestätigt die korrekte Kerninjektion (Spuren 2 und 4). Spur 1 zeigt die Menge der injizierten RNA Probe.

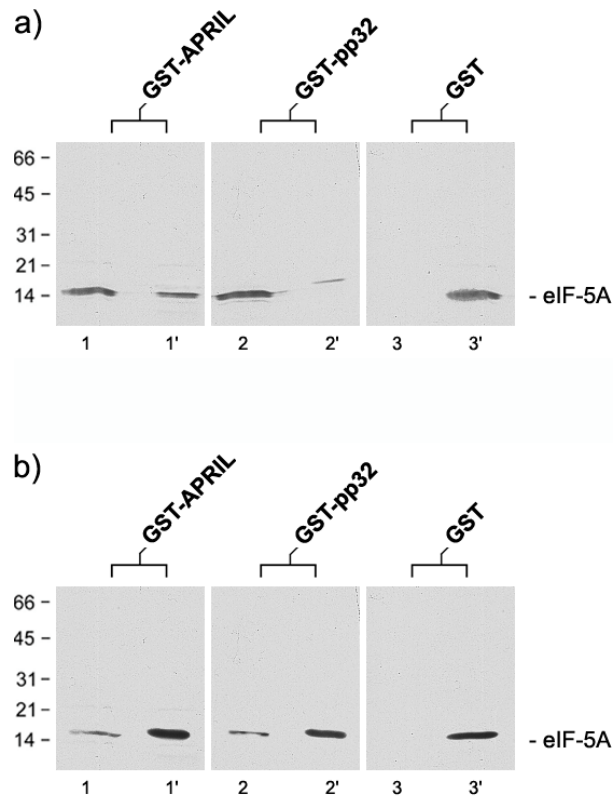
Um die Bindung zwischen eIF-5A und HuR genauer zu analysieren, wurden Bindungsstudien in Lösung durchgeführt (Abb.4.45). Zum einen wurde GST-eIF-5A bzw. GST alleine an Glutathion-Sepharose Beads immobilisiert und anschließend mit Oocyten Extrakt inkubiert. Die gebundenen und ungebundenen Fraktionen wurden anschließend, wie unter 3.3.4 beschrieben, mittels eines HuR-spezifischen Antikörpers auf eine Bindung des HuR Homologs ElrA hin untersucht (Abb.4.45a).

Zum anderen wurde GST-HuR bzw. GST alleine an Glutathion-Sepharose Beads immobilisiert und eine Bindung des endogenen eIF-5A an HuR mittels eines eIF-5A-spezifischen Antikörpers analysiert (Abb.4.45b). Wie die Abb.4.45 zeigt, hat sowohl eine Bindung von endogenem eIF-5A an GST-HuR stattgefunden (b: Spur 1), als auch eine Bindung des endogenen *Xenopus* HuR Homologs ElrA an eIF-5A (a: Spur 1). In beiden Fällen war die Bindung spezifisch, da es zu keiner Bindung an GST alleine kommt. Um die Hypothese, daß eIF-5A an bestimmte Kernexportsignale und nicht an HuR selbst bindet, zu bestätigen, wurde GST-HuR nicht mit Oocytenextrakt sondern mit eIF-5A-wt und Energie inkubiert (Abb.4.45c). In Übereinstimmung mit dem Modell, hat eIF-5A-wt nicht direkt an GST-HuR gebunden (c: Spur 1), womit auch die partielle Inhibition des HRE RNA Exportes durch eIF-5A-M14 (s.o.) erklärt wird.



**Abb.4.45:** In *Xenopus* Oocyten findet eine Interaktion zwischen eIF-5A und HuR statt, die jedoch nicht direkt ist. GST-eIF-5A bzw. GST (a) oder GST-HuR bzw. GST (b und c), wurden an Glutathion-Sepharose Beads immobilisiert und mit Oocyten Proteinextrakt (a und b), oder eIF-5A-wt mit Energie in Form von RanGTP (c) inkubiert. Gebundene (Spuren 1, und 2) und ungebundene (Spuren 1', und 2') Proteine wurden über 12% SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem eIF-5A-spezifischem bzw. HuR-spezifischem Antikörper analysiert. Es kommt sowohl zu einer Bindung von endogenem eIF-5A an GST-HuR (b: Spur 1) als auch zu einer Interaktion des *Xenopus* HuR Homologs ElrA mit GST-eIF-5A. (a: Spur 1). Wird allerdings der Oocyten Proteinextrakt gegen eIF-5A-wt und RanGTP ausgetauscht, findet keine Interaktion zwischen HuR und eIF-5A mehr statt (c: Spur 1). In allen Experimenten erfolgte keine Interaktion mit GST alleine (a, b und c: Spur 3). Die Molekulargewicht-Marker in kDa sind jeweils links gezeigt.

Da es keine direkte Interaktion zwischen HuR und eIF-5A gibt, wurde die Interaktion zwischen eIF-5A und den beiden bekannte Liganden von HuR, pp32 und APRIL, untersucht, die ja beide Leucin-reiche NES enthalten, an die eIF-5A binden könnte (Abb.4.48). Dazu wurden GST-APRIL und GST-pp32 an Glutathion-Sepharose Beads immobilisiert und zum einen mit Oocyten Proteinextrakt inkubiert. In einem zweiten Experiment wurde dieser Extrakt durch eIF-5A-wt und RanGTP ersetzt. Die gebundenen und ungebundenen Fraktionen wurden anschließend über 18% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit einem eIF-5A-spezifischen Antikörper analysiert. Wie die Abb.4.46 zeigt, binden sowohl pp32 als auch APRIL, im Gegensatz zu HuR (siehe Abb.4.45c), direkt an eIF-5A. Eine Interaktion erfolgte sowohl nach Inkubation mit Oocyten Proteinextrakt (a: Spuren 1 und 2) als auch mit eIF-5A ohne eventuelle zusätzliche Cofaktoren, die im Oocytenextrakt vorhanden sein könnten (b: Spuren 1 und 2)



**Abb.4.46:** APRIL und pp32 interagieren direkt mit eIF-5A.

GST-APRIL oder GST-pp32 bzw. GST, wurden an Glutathion-Sepharose Beads immobilisiert und mit Oocyten Proteinextrakt (a), oder eIF-5A-wt mit Energie in Form von RanGTP (b) inkubiert. Gebundene (Spuren 1, 2 und 3) und ungebundene (Spuren 1', 2' und 3') Proteine wurden über 18% SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem eIF-5A-spezifischen Antikörper analysiert. Es kommt sowohl zu einer Bindung von eIF-5A an GST-APRIL und GST-pp32 nach Inkubation mit Oocytenextrakt (a: Spuren 1 und 2) als auch nach Austausch des Oocytenextraktes durch eIF-5A-wt und RanGTP (b: Spuren 1 und 2). In beiden Experimenten erfolgt keine Interaktion mit GST alleine (a und b: Spur 3). Die Molekulargewicht-Marker in kDa sind jeweils links angeordnet.

Zusammenfassend lassen die Mikroinjektionsexperimente und die Bindungsstudien auf folgendes Exportmodell schließen (Abb.4.48). Der Export der CD83 HRE RNA hängt von mindestens 4 Faktoren ab. Zum einen erfolgt eine direkte Bindung des HuR Proteins an die *cis*-aktive Sequenz der CD83 RNA (HRE), wodurch diese erst exportiert werden kann (Prechtel et al., submittet). Dieser HuR/HRE RNA Komplex gelangt dann über den generellen Exportrezeptor CRM1/exportin1 aus dem Kern ins Cytoplasma. Da HuR selbst keine Leucinreichen, Rev-ähnlichen Kernexportsignale besitzt, braucht es Liganden. In Frage kommen hier APRIL und pp32, die beide an CRM1/exportin1 binden. In den durchgeführten Experimenten hatte allerdings lediglich APRIL, nicht aber pp32 einen positiven Effekt auf den Export des speziellen HuR/HRE RNA-Komplexes hatte (siehe Abb.4.42). Schließlich kommt noch eIF-5A als Cofaktor dazu, der eine erfolgreiche Bindung des HRE RNA/HuR/APRIL-Komplexes an CRM1/exportin1 vermittelt.

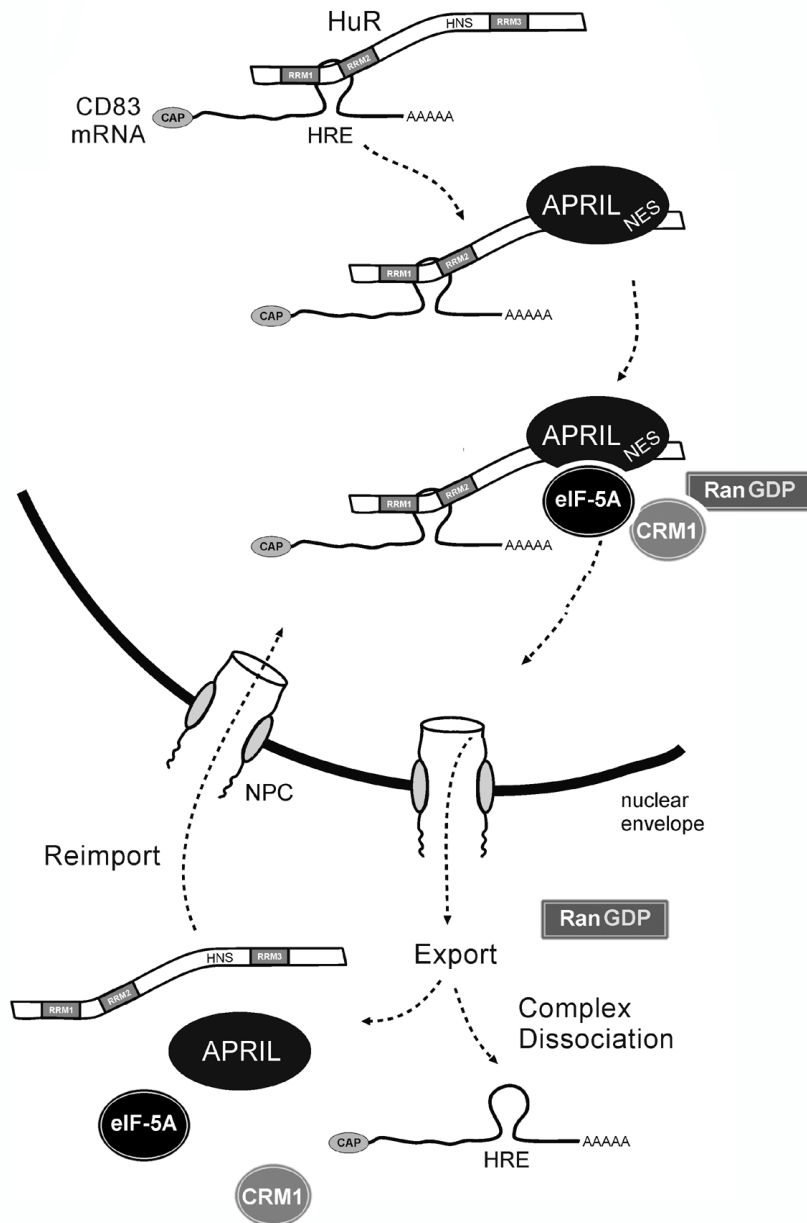


Abb.4.47: Modell des Exportes der CD83 mRNA

#### 4.6 Die Hypusinmodifikation des eIF-5A ist essentiell für den Import, nicht jedoch für den Export

Es gibt verschiedene Hinweise darauf, daß die einzigartige Hypusinmodifikation des eIF-5A essentiell für seine Funktion ist. So konnte z.B. in Dendritischen Zellen der Export der CD83 mRNA durch Inhibitoren der Hypusinmodifikation spezifisch gehemmt werden (Kruse et al., 2000).

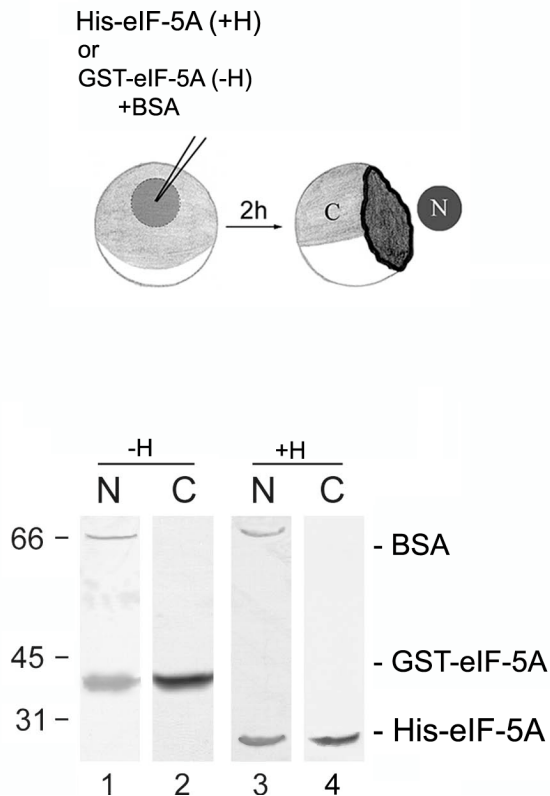
eIF-5A konnte nun als ein Faktor identifiziert werden, der am Export dieser CD83 mRNA beteiligt ist. Dies deutet darauf hin, daß die Hypusinmodifikation essentiell für die Funktion des eIF-5A und somit auch für den Export der CD83 mRNA ist.

Allerdings hatte die Bindung Hypusin-losen eIF-5As an Rev-NES (Abb.4.8), TFIIIA-NES (Abb.4.28) oder APRIL (Abb.4.44) keinen negativen Einfluß auf den Export dieser Proteine bzw. den Export der jeweiligen RNAs, der durch diese Proteine vermittelt wird.

Um nun genauen Aufschluß über die Rolle der Hypusinmodifikation beim Export des eIF-5A zu erhalten, wurde rekombinantes GST-eIF-5A aus Expressionsbakterien, d.h. ohne Hypusinmodifikation (-H) in Kerne von *Xenopus* Oocyten injiziert. In einem zweiten Experiment wurde His-eIF-5A in Kerne injiziert, welches in Insektenzellen exprimiert wurde, wodurch es eine Hypusinmodifikation besitzt (+H) (Abb.4.48). In beiden Experimenten wurde exportdefizientes BSA als Injektionskontrolle coinjiziert. Nach 2h Inkubation wurde Kerne und Cytoplasma manuell isoliert, die Proteine der jeweiligen Fraktionen wurden über 18% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und anschließend mit Antikörpern gegen GST bzw. His und BSA analysiert. Wie die Abb.4.48 zeigt, gibt es keinen Unterschied zwischen dem Export des eIF-5A mit Hypusinmodifikation (Spur 4) und ohne Hypusinmodifikation (Spur 2). In beiden Fällen wird eine signifikante Menge eIF-5A aus dem Kern exportiert.

Die ausschließliche Präsenz des BSA in den Kernen zeigt die korrekte Kerninjektion (Spuren 1 und 3).

Dieses Ergebnis zeigt, daß die Hypusinmodifikation nicht essentiell für den Export des eIF-5A ist und bestätigt die Ergebnisse aus Kap.4.1.8, wonach die Hypusinmodifikation keine Rolle beim Export des eIF-5A alleine, oder mit gebundenem Exportsubstrat spielt.



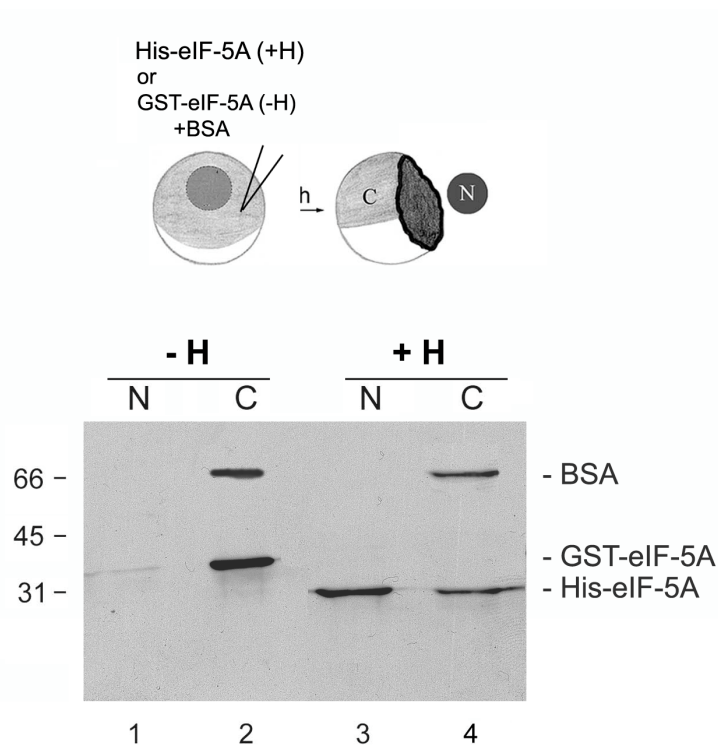
**Abb.4.48:** Die Hypusinmodifikation keinen Einfluß auf den Kernexport von eIF-5A. Das Oocyten Injektionsschema ist in der oberen Hälfte gezeigt. Nach Injektion und Inkubation wurden die Oocyten manuell in Kern (N) und Cytoplasma (C) getrennt. Die Proteine wurden durch 18% SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Anschließend wurden die Blots mit Antikörpern gegen GST bzw. His und BSA inkubiert. Es findet sowohl ein Export von eIF-5A mit Hypusinmodifikation (+H) (Spur 4), als auch von eIF-5A ohne Hypusinmodifikation (-H) (Spur 2) statt. Die ausschließliche Präsenz von BSA in den Kernen bestätigt die Spezifität der Kerninjektion (Spuren 1 und 3).

Die Molekulargewicht-Marker in kDa sind links gezeigt.

Eine weitere Möglichkeit wäre natürlich, daß die Hypusinmodifikation eine Rolle beim Import des eIF-5A spielt.

Um dies zu überprüfen, wurde GST-eIF-5A ohne Hypusinmodifikation (-H) aus Expressionsbakterien und His-eIF-5A mit Hypusinmodifikation (+H) aus Insektenzellen, zusammen mit BSA in das Cytoplasma von *Xenopus* Oocyten injiziert, um die Importfähigkeit zu analysieren (Abb.4.49). 2h nach der Injektion wurden Kerne und Cytoplasma manuell getrennt, die Proteine der einzelnen Fraktionen wurden über 18% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit Antikörpern gegen GST bzw. His und BSA analysiert. Wie die Abb.4.49 zeigt, scheint die Hypusinmodifikation in der Tat essentiell für die Importfähigkeit des eIF-5A zu sein. Während ein Großteil des injizierten eIF-5A mit Modifikation in den Kern importiert wurde (Spuren 3 und 4), hat kein Import des eIF-5A ohne Hypusinmodifikation stattgefunden (Spuren 1 und 2).

Da sich diese Arbeit jedoch auf die Funktion von eIF-5A bei Exportprozessen konzentriert, wurde der Import von eIF-5A nicht weiter untersucht.



**Abb.4.49:** Die Hypusinmodifikation des eIF-5A ist essentiell für den Import.

Das Oocyten Injektionsschema ist in der oberen Hälfte gezeigt. eIF-5A mit (+H) und ohne (-H) Hypusinmodifikation wurde in das Cytoplasma injiziert. Nach Injektion und Inkubation wurden die Oocyten manuell in Kern (N) und Cytoplasma (C) getrennt. Die Proteine wurden durch 18% SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Anschließend wurden die Blots mit Antikörpern gegen GST bzw. His und BSA inkubiert. Ein Import findet nur im Falle einer Hypusinmodifikation statt (+H: Spuren 3 und 4). Ohne diese Modifikation verbleibt eIF-5A im Cytoplasma (-H: Spuren 1 und 2). Die ausschließliche Präsenz von BSA im Cytoplasma bestätigt die Spezifität der Injektion (Spuren 1 und 3).

Die Molekulargewicht-Marker in kDa sind links gezeigt.

## 4.7 Export anderer Proteine mit Leucin-reichen NES in *Xenopus* Oocyten

### 4.7.1 Der Protein Kinase Inhibitor (PKI)

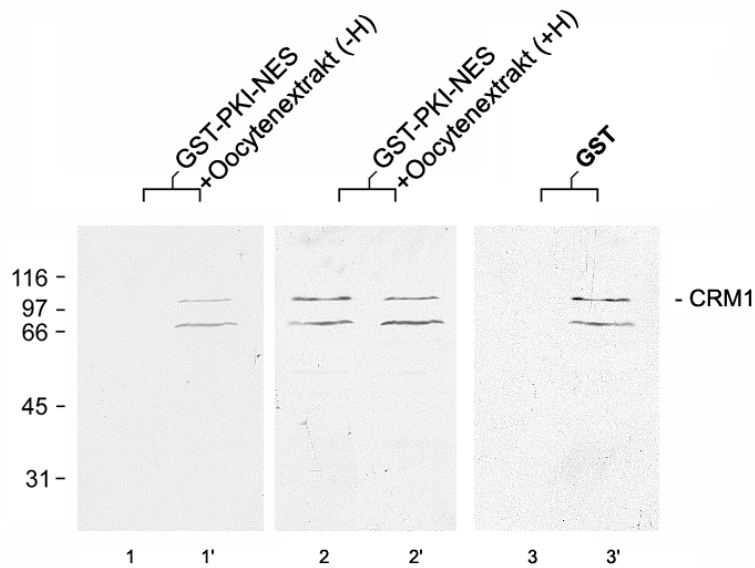
Wie bereits in Kap.4.1.5 erwähnt, besitzt auch das Protein PKI ein Rev-ähnliches, Leucin-reiches NES. Im Gegensatz zum Rev Protein oder dem Transkriptionsfaktor IIIA, wird PKI erstaunlicherweise nur in Oocyten exportiert, welche aus Hormon-induzierten Tieren stammen (Kap.4.1.5). Es ist daher zu Vermuten, daß ein zusätzlicher Exportfaktor existiert, welcher in *Xenopus* Oocyten aus unbehandelten Fröschen nicht vorhanden, oder nicht aktiv ist.

In somatischen Zellen konnte gezeigt werden, daß der Export aller Proteine, die ein Leucin-reiches NES enthalten, durch den generellen Exportrezeptor CRM1/exportin1 vermittelt wird (Ohno et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, daß zumindest im Fall des Rev Proteins und des TFIIIA ein Adapter existiert, in diesem Fall eIF-5A, der eine effiziente Bindung dieser speziellen Kernexportsignale an den Exportrezeptor CRM1/exportin1 vermittelt. Solch ein Adapter wurde auch für andere Exportsubstrate beschrieben, wie etwa für den Export der U snRNA. Hier wurde das Protein PHAX identifiziert, welches den Exportkomplex, der die U snRNA enthält, mit dem Exportrezeptor CRM1/exportin1 verbindet (Ohno et al., 2000).

Um die Existenz eines für PKI spezifischen Adapters in *Xenopus* Oocyten zu überprüfen, wurden Bindungsstudien in Lösung durchgeführt (Abb.4.50). GST-PKI-NES bzw. GST alleine wurde an Glutathion-Sepharose Beads immobilisiert (siehe 3.2.7) und zum einen mit Proteinextrakt von Oocyten aus unbehandelten Fröschen und zum anderen mit Extrakt von Oocyten, die aus Gonadotropin-Hormon induzierten Fröschen stammten, inkubiert. Die gebundenen und ungebundenen Fraktionen wurden anschließend über 12% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und auf eine Bindung des Exportrezeptors CRM1/exportin mit einem CRM1-spezifischem Antiserum analysiert (siehe 3.3.4).

Wie die Abb.4.50 zeigt, bindet CRM1/exportin1 nur an das PKI-NES, wenn dieses mit Proteinextrakt von Oocyten aus Hormon-induzierten Fröschen inkubiert wurde. Diese Ergebnisse erklären deutlich, warum PKI nicht in Oocyten aus unbehandelten Fröschen exportiert wird, sondern nur in Oocyten aus Gonadotropin-behandelten Fröschen.

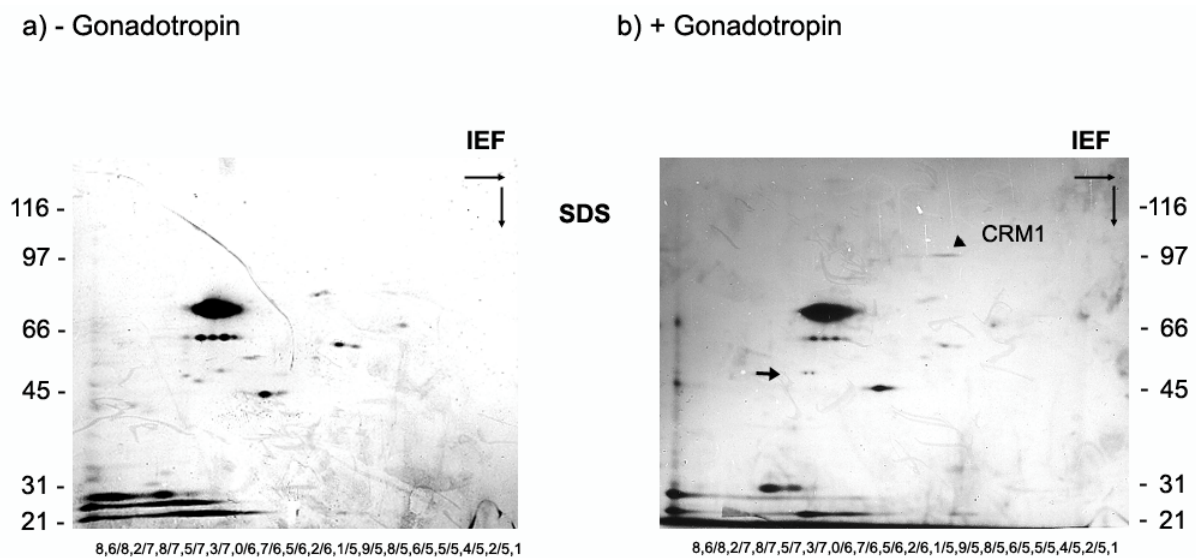




**Abb.4.50:** GST-PKI-NES interagiert nur mit CRM1/exportin1 in Anwesenheit eines Proteinextraktes von Oocyten aus hormonbehandelten Fröschen. GST (Spuren 3 und 3') bzw. GST-PKI-NES wurde an Glutathion-Sepharose Beads immobilisiert und mit Proteinextrakt von Oocyten aus hormonbehandelten (+H: Spuren 2 und 2') bzw. unbehandelten Fröschen (-H: Spuren 1 und 1') inkubiert. Gebundene (Spuren 1, 2 und 3) und ungebundene (Spuren 1', 2' und 3') Proteine wurden über 12% SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunblot, mit einem CRM1-spezifischen Antiserum analysiert. CRM1/exportin1 bindet nur in Anwesenheit von Oocytenextrakt der aus Fröschen stammt, die mit Gonadotropin behandelt wurden (vergleiche Spur 1 mit 2). An GST alleine bindet, wie erwartet kein CRM1/exportin1 (Spur 3). Molekulargewicht-Marker in kDa sind links gezeigt.

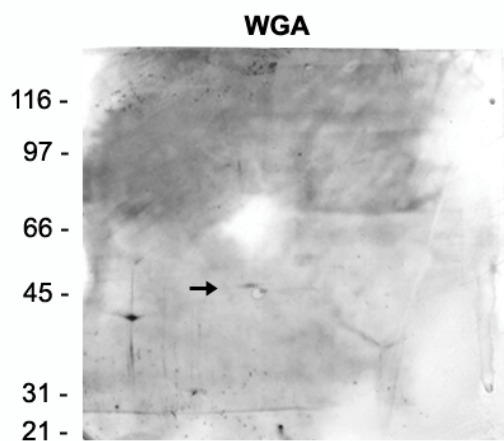
Da es sich hier scheinbar um einen oder mehrere Exportfaktoren handelt, die in Oocyten aus unbehandelten Fröschen nicht vorhanden oder inaktiv sind, wurden die PKI-NES-bindenden Proteine durch Overlay Blot Assays auf manuell isolierten Kernhüllen vergleichend analysiert (Abb.4.51). Diese Untersuchung der Proteine, die mit der Kernhülle assoziiert sind bietet sich an, da Exportfaktoren in der Regel an der Kernhülle angereichert sind. Die Proteine der Kernhülle wurden über 2-Dimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 3.2.3), auf Nitrocellulose transferiert und anschließend mit GST-PKI-NES und Oocytenextrakt inkubiert, welcher entweder aus Fröschen stammte die hormonbehandelt waren, oder aus unbehandelten Fröschen (siehe 3.1). Mit einem Antikörper gegen GST wurden dann die GST-PKI-NES-bindenden Proteine detektiert. Wie die Abb.4.51 zeigt, unterscheidet sich das Proteinmuster in zwei Bereichen. Eine Inkubation der Kernhüllen mit GST-PKI-NES und Oocytenextrakt aus behandelten Fröschen führte zu einer Bindung an CRM1/exportin1 (Abb.4.51b: durch Pfeilspitze markiert). Außerdem kommt es zu einer Interaktion mit einem Protein, welches in zwei Phosphorylierungszuständen vorliegt und ein Molekulargewicht von 48kDa besitzt (Abb. 4.51b: durch Pfeil markiert).

Wie erwartet, und wie auch bereits durch Bindungsstudien in Lösung bestätigt (Abb.4.50), hat GST-PKI-NES im Overlay Blot Assay, der mit Oocytenextrakt aus unbehandelten Fröschen durchgeführt wurde, nicht an den Exportrezeptor CRM1/exportin1 gebunden (Abb.4.51b). Des weiteren kommt es im Falle einer Inkubation mit Oocytenextrakt aus unbehandelten Fröschen, zu einer Interaktion mit 4 Proteinen mit Molekulargewichten zwischen 48-60kDa, die bei einer Inkubation mit Oocytenextrakt aus behandelten Fröschen nicht aufgetreten ist (Abb.4.51: vergleiche a mit b)



**Abb.4.51:** Interaktion von GST-PKI-NES mit Proteinen der Kernhülle nach Inkubation mit Oocytenextrakt aus Gonadotropin behandelten sowie unbehandelten Fröschen. Kernhüllen von *Xenopus* Oocyten wurden manuell isoliert. Zunächst wurden die Proteine durch Isoelektrische Fokussierung nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt und danach über 12% SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht. Die Proteine wurden dann auf Nitrocellulose transferiert und mit GST-PKI-NES in Anwesenheit von Oocytenextrakt aus unbehandelten Fröschen (a) bzw. mit Gonadotropin behandelten, Fröschen (b) inkubiert. Antikörperinkubation der Nitrocellulose mit anti-GST zeigt, daß PKI-NES an mehrere Proteine bindet (a und b). Bei Inkubation mit Oocytenextrakt aus behandelten Fröschen kommt es zu einer Bindung an CRM1 (b: durch Pfeilspitze markiert). Des weiteren kommt es zu einer Interaktion des GST-PKI-NES mit einem Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 48kDa, daß in zwei Phosphorylierungszuständen vorliegt (b: durch Pfeil markiert). Bei Inkubation mit Oocytenextrakt aus unbehandelten Oocyten findet keine Bindung an CRM1/exportin1 statt (a). Hier bindet GST-PKI-NES jedoch an 4 Proteine mit Molekulargewichten zwischen 48-60kDa (a). Die Molekulargewicht-Marker in kDa sind jeweils auf der Seite gezeigt. Der pH-Bereich ist jeweils unten angegeben.

Durch anschließende Entfernung der gebundenen Proteine auf dem Overlay Blot Assay und Inkubation der Nitrocellulose mit WGA (wheat germ agglutinin; bindet O-glycosidisch gebundene N-Acetyl-Glucosamine) konnte das in Abb.4.51b detektierte Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 48 kDa als ein WGA bindendes Protein identifiziert werden (Abb.4.52).



**Abb.4.52:** Identifizierung eines Bindungspartners von PKI-NES als WGA-bindendes Protein.

Die gebundenen Proteine auf der Nitrocellulose des Overlay-Blot-Assays aus Abb.4.51b, wurden entfernt. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Nitrocellulose mit WGA. Das in Abb.4.51b durch Pfeile markierte Protein, mit einem Molekulargewicht von ca. 48 kDa und den beiden Phosphorylierungszuständen, konnte als WGA-bindendes Protein identifiziert werden. Die Molekulargewicht-Marker in kDa sind auf der linken Seite gezeigt.

Wie gezeigt werden konnte, wird das PKI-NES in *Xenopus* Oocyten aus unbehandelten Fröschen nicht exportiert und bindet auch nicht an den Exportrezeptor CRM1/exportin1. In Oocyten dagegen, die aus Hormon-induzierten Fröschen stammten, bindet PKI-NES an CRM1/exportin1 und wird in diesen Oocyten auch exportiert. Dies sind deutliche Zeichen dafür, daß ein Adapter existiert, der eine effiziente Bindung des PKI-NES an CRM1/exportin1 vermittelt. Dieser Adapter scheint jedoch nur in Oocyten, die aus Fröschen mit Gonadotropin-Behandlung stammen, vorhanden oder aktiv zu sein. Ein guter Kandidat für solch eine Adapterrolle ist sicherlich das, im Overlay Blot Assay beobachtete, Protein (Abb.4.51b). Bei diesem handelt es sich um ein WGA-bindendes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 48kDa. Auffallend sind hier die beiden Phosphorylierungszustände, die für dieses Protein als möglichen Adapter sprechen. Wie bereits in Kap. 4.1.5 erwähnt, wird nach dem Ablachen die Proteinsyntheserate in den verbleibenden Oocyten enorm gesteigert, um eine schnelle Reifung dieser Oocyten zu erreichen. Unter anderem werden in diesem Moment auch viele Proteine durch Phosphorylierung aktiviert.

Es wäre daher sicherlich von Interesse dieses Protein näher zu charakterisieren und auf eine potentielle Rolle im Kernexport des PKI-NES hin, zu untersuchen.

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag jedoch auf der Rolle des eIF-5A bei Kernexportprozessen. Da eIF-5A im Kernexport des PKI-NES jedoch keine Rolle spielt, wurde dieses Projekt nicht weiter verfolgt.

#### **4.7.2 Aufstellung einer vergleichenden Exportkinetik für verschiedenen Leucin-reiche Kernexportsignale in *Xenopus* Oocyten**

Rev-ähnliche, Leucin-reiche Kernexportsignale wurden in einer, noch immer ansteigenden Zahl von zellulären und viralen Proteinen identifiziert. Diese Proteine haben dabei die verschiedensten biologischen Funktionen, wie etwa Rollen beim RNA Transport (Pollard & Malim, 1998; Sandri-Goldin, 1998), beim Zellzyklus und der transkriptionellen Kontrolle (Begitt et al., 2000; Toyoshima et al., 1998), bei der Regulation von Kinaseaktivitäten (Fukuda et al., 1996; Engel et al., 1998) oder der kontrollierten Lokalisation von Cytoskelettproteinen (Wada et al., 1998).

Die vorhandenen Daten deuten darauf hin, daß CRM1/exportin1 als ein genereller Exportrezeptor für alle diese Leucin-reichen Kernexportsignale fungiert (Ohno et al., 1998; siehe auch Kap.1.3.1.1). Mikroinjektionsexperimente in somatischen Zellen von Heger et al. (2001) haben gezeigt, daß die Exportdauer der verschiedenen Exportsignale in somatischen Zellen dramatisch variiert und von Minuten bis hin zu mehreren Stunden reicht. In dieser Studie wurden ebenfalls die Bindungsaffinitäten der verschiedenen Kernexportsignale für den Exportrezeptor CRM1/exportin1 untersucht. Es wurde gezeigt, daß Kernexportsignale, die sehr schnell exportiert werden, eine hohe Bindungsaffinität zu CRM1/exportin1 aufweisen, während solche, die langsam exportiert werden auch nur schwach binden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Schlußfolgerung gezogen, daß die Kernexportsignale selbst, in ihrer Struktur oder Sequenz, Informationen für die Bindung an CRM1/exportin1 und dem entsprechend auch für die Exportgeschwindigkeit haben.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich des Kernexportes von HIV-1 Rev-NES (Kap.4.1) und PKI-NES (Kap.4.7.1) widersprechen jedoch dieser Theorie. Daher wurden zunächst vergleichende Exportkinetiken verschiedener Kernexportsignale durchgeführt. Verschiedene GST-GFP-gekoppelte Kernexportsignale (siehe Tab.4.1) wurden dazu, wie

unter 3.1 beschrieben, in Kerne von *Xenopus* Oocyten injiziert. Nach verschiedenen Inkubationszeiten von 10min-48h wurden Kerne und Cytoplasma manuell isoliert, die Proteine der einzelnen Fraktionen wurden über 18% SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Die Lokalisation der injizierten GST-GFP-NES wurde dann durch einen GST-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Teilweise wurden diese Experimente auch in Oocyten durchgeführt, die aus Hormon-induzierten Tieren stammten (siehe 3.1) (in Tab.4.1 durch hochgestellte Zahlen markiert).

Aufgrund der Ergebnisse dieser Mikroinjektionsversuche in *Xenopus* Oocyten lassen sich zwei Schlußfolgerungen ableiten: 1. Es bestehen erhebliche Unterschiede zwischen dem Exportverhalten verschiedener Kernexportsignale in somatischen Zellen und *Xenopus* Oocyten. 2. Die Exportgeschwindigkeit, zumindest einiger Kernexportsignale kann nicht allein von einer Interaktion des jeweiligen NES mit dem Exportrezeptor CRM1/exportin1 abhängen.

NES-Sequenz	Protein	Kernexport in somatischen Zellen (Heger et al., 2001)	Kernexport in <i>Xenopus laevis</i> Oocyten
MTKKFGTLTI	Minute Maus Virus NS2	schnell: 5-10min	Ja <sup>1</sup> (1h)
LALKLAGLDIG	Protein Kinase Inhibitor (PKI)	schnell: 5-10min	NEIN <sup>1</sup> / JA <sup>2</sup> (1h)
LSAQLYSSLSD	HTLV-1 Rex	mittel: 10-20min	NEIN <sup>1</sup> /NEIN <sup>2</sup>
LQLPPLRLTL	HIV-1 Rev	mittel: 10-20min	JA <sup>1</sup> (1h)/JA <sup>2</sup> (1h)
LYPELRRILTI	Adenovirus Typ 5 E1B-55K	langsam: 30-60min	JA <sup>1</sup> (1h)/? <sup>2</sup>
MFRELNEALELK	Tumor Suppressor Protein p53	langsam:: > 10h	NEIN <sup>1</sup> /? <sup>2</sup>

<sup>1</sup>: Oocyten aus unbehandelten Fröschen

<sup>2</sup>: Oocyten aus hormoninduzierten Fröschen

**Tab.4.1.:** Exportgeschwindigkeit verschiedener NES-Sequenzen in somatischen Zellen und *Xenopus* Oocyten

Im Gegensatz zu somatischen Zellen, in denen eine Klassifizierung der einzelnen Exportsignale, aufgrund unterschiedlicher Exportgeschwindigkeiten, aufgestellt werden kann, ist dies in *Xenopus* Oocyten nicht möglich. In *Xenopus* Oocyten werden alle Exportsignale, die auch transportiert werden, innerhalb 1h aus dem Kern exportiert. Die exportierten Proteinmengen sind auch nach Trennung von Kern und Cytoplasma in 10min Schritten innerhalb dieser ersten Stunde für alle injizierten Kernexportsignale gleich. Man kann also keine Unterteilung in schnelle oder langsame Exportsignale vornehmen, da alle Signale gleich schnell exportiert werden.

Des weiteren fällt auf, daß manche Kernexportsignale in Oocyten aus unbehandelten Fröschen gar nicht exportiert werden (Tab.4.1: Rex-NES; p53-NES; PKI-NES), wobei die Fähigkeit exportiert zu werden oder nicht, unabhängig ist von der, in somatischen Zellen beobachteten Exportgeschwindigkeit (Tab.4.1: vergleiche PKI-NES (schnell) mit E1B-NES (langsam)).

Es konnte bereits gezeigt werden, daß die Faktoren, d.h. Nucleoporine, an die CRM1/exportin1, nach Bildung eines Exportkomplexes während des Translokationsschrittes über die Pore bindet, nicht regulierend auf den Export wirken (Askjaer et al., 1999). Dies läßt vermuten, daß zumindest im Fall der Proteine Rex, p53 und PKI, die solche enormen Exportunterschiede in *Xenopus* Oocyten und somatischen Zellen aufweisen, Faktoren regulierend wirken, die vor CRM1/exportin1 an diese binden. Da die NES-Sequenz selber scheinbar keinen Einfluß auf die Bindung an CRM1/exportin1 hat, was durch die vergleichenden Mikroinjektionsexperimente in somatischen Zellen und *Xenopus* Oocyten belegt werden konnte, müssen zusätzliche Adapter existieren, die eine Interaktion zwischen dem NES und CRM1/exportin1 vermitteln. In dieser Studie konnte dies bereits für das NES von Rev (Kap.4.1) und TFIIIA (Kap.4.4) gezeigt werden. Weitere Hinweise auf solche Faktoren kommen aus den Untersuchungen des Kernexportes von PKI-NES, da dieses nur in Oocyten aus Hormon-induzierten Fröschen exportiert wird (Kap.4.7.1). Außerdem bindet es nur in Anwesenheit von Proteinen aus diesen Oocyten an den Exportrezeptor CRM1/exportin1, was auf die Existenz eines Faktors hinweist, der in Oocyten aus unbehandelten Fröschen nicht vorhanden oder nicht aktiv ist. Nur aufgrund solcher Faktoren läßt sich auch erklären, warum das NES von HTLV-1 Rex in *Xenopus* Oocyten (auch in Oocyten aus hormoninduzierten Tieren) nicht exportiert wird, obwohl sowohl die Sequenz des NES als auch die Funktion des Rex Proteins enorme Ähnlichkeiten zum Rev Protein aufweist.

Dies alles deutet darauf hin, daß der Export der Proteine, die ein Rev-ähnliches, Leucinreiches Kernexportsignal besitzen, in der Tat durch mehrere spezifische Adapter reguliert wird, die eine Bindung des jeweiligen NES individuell an CRM1/exportin1 vermitteln. Die Sequenz- und Strukturunterschiede der einzelnen Kernexportsignale scheinen daher nicht für die direkte, unterschiedlich gute Bindung an CRM1/exportin1 verantwortlich zu sein, sondern eher für die Interaktion mit spezifischen Adaptern die dann, eventuell aufgrund der vorhandenen Menge oder Aktivität unterschiedlich gut die Bindung des NES an CRM1/exportin1 vermitteln.

## 4.8 Kernaktin

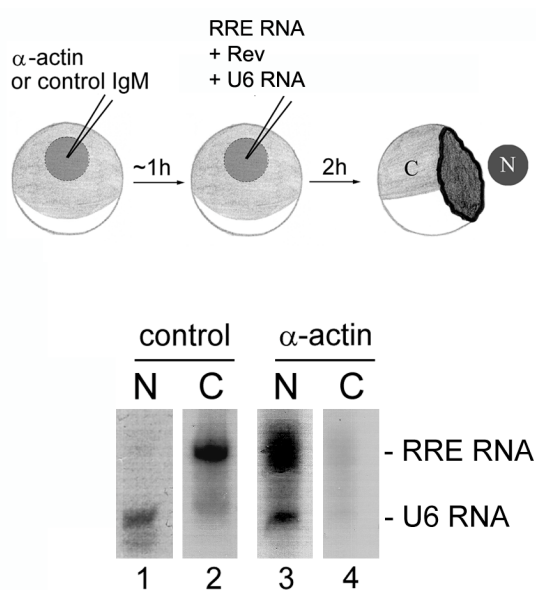
Aktin wird in der Regel als ein typisches cytoplasmatisches Protein betrachtet, obwohl auch eine Vielzahl von Autoren die Anwesenheit von Aktin innerhalb des Kernes beobachtet haben (Übersicht: DeBoni, 1994). Bereits während der Diplomarbeit, konnte Aktin im Overlay Blot Assay als ein Bindungspartner von eIF-5A identifiziert werden (siehe Kap.4.2). Weiterführende Analysen der Kernlokalisierung haben gezeigt, daß Aktin an den Kernporenkomplex-assoziierten nucleoplasmatischen Fibrillen lokalisiert ist, ebenso wie die beiden Exportrezeptoren eIF-5A und CRM1/exportin1. Diese Lokalisation von Aktin, in Kombination mit der Tatsache das eIF-5A als ein Exportfaktor in der Lage ist, mit Aktin zu interagieren, führte zu der Vermutung, daß Aktin eine essentielle Rolle im Kernexport spielen könnte. Mikroinjektionen des Aktin-Antikörper 2G2 (ein Antikörper der Aktindimere im Kern erkennt; Gonsior et al., 1999) in Kerne von *Xenopus* Oocyten und somatischen Zellen, haben dann tatsächlich zu einer Inhibition des Kernexportes von Rev-NES und auch des Kernexportes von PKI-NES geführt (Hofmann, W. Diplomarbeit 1999; Hofmann et al., 2001). Des weiteren konnte ein zellfreies Exportsystem etabliert werden. Extrakt, der aus aktivierten Amphibieneiern hergestellt wurde, ist in der Lage, gereinigte DNA oder Chromatin in synthetische Kerne einzubauen (Lohka & Masui, 1983; Newport, 1986). Diese künstlichen Kerne sind zwar zum Import von Proteinen fähig, nicht aber zum Export (Newmeyer et al., 1987). Normalerweise wird dieser Extrakt in Anwesenheit von Cytochalasin B hergestellt, was die Viskosität herabsetzt, indem es bestehende Aktinfilament depolymerisiert und ihre Neubildung verhindert. Da nun die Ergebnisse bezüglich Kernaktin darauf hindeuten, daß Aktin in den Kernexport involviert ist, wurde dieser Extrakt ohne Cytochalasin B hergestellt, was tatsächlich zu einem Export in diesem System führte (Hofmann, W. Diplomarbeit 1999; Hofmann et al., 2001).

Dies alles deutet darauf hin, daß Aktin tatsächlich essentiell an Exportprozessen beteiligt ist. Wie schon erwähnt konnte gezeigt werden, daß Aktin am Kernexport des Rev und des PKI beteiligt ist. Zunächst wurden nun auch RNA Exportwege auf eine Beteiligung des Aktin hin analysiert und zwar der Rev-vermittelte und der CTE-vermittelte RNA Export.



### 4.8.1 Aktin ist auch an RNA Exportwegen beteiligt

Um die Frage nach einer Beteiligung von Aktin am RNA Export zu klären, wurden Mikroinjektionsexperimente in *Xenopus* Oocyten durchgeführt. Zunächst wurde der Rev-vermittelte RRE RNA Export untersucht (Abb.4.53). Antikörper gegen Aktin, oder unspezifisches IgM als Kontrolle wurde in die Kerne von *Xenopus* Oocyten injiziert. Nach einer Inkubationszeit von 1h wurde radioaktiv markierte RRE RNA zusammen mit Rev Protein und exportdefizienter, radioaktiv-markierter U6 RNA in die Kerne injiziert. Eine Coinjektion von Rev ist, wie schon unter 4.1.3 gezeigt, notwendig für einen Export der RRE RNA. Nach weiteren 30min Inkubation wurden Kerne und Cytoplasma manuell getrennt und aus den einzelnen Fraktionen wurde Gesamt-RNA isoliert. Diese wurde über ein 6% RNA Acrylamidgel aufgetrennt und mittels Autoradiographie analysiert (siehe 3.6.1-3.6.3).

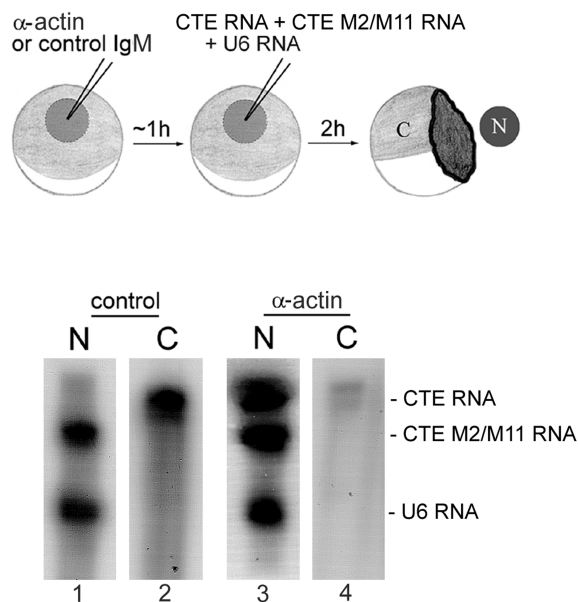


**Abb.4.53:** Antikörper gegen Aktin inhibieren den Rev-vermittelten Export der RRE RNA.

Das Oocyten Injektionsschema ist in der oberen Hälfte gezeigt. Nach Injektion und Inkubation wurden die Oocyten manuell in Kern (N) und Cytoplasma (C) getrennt. Nach Isolierung der Gesamt-RNA wurde diese über ein 6% RNA-Acrylamidgel aufgetrennt und die injizierte RNA wurde mittels Autoradiographie lokalisiert. In Anwesenheit von unspezifischem IgM wird die injizierte RRE RNA mittels Rev exportiert (Spuren 1 und 2). Antikörper gegen Aktin dagegen, inhibieren den Rev-vermittelten RRE RNA Export (Spuren 3 und 4). Die ausschließliche Präsenz der coinjizierten, exportdefizienten U6 RNA bestätigt die Genauigkeit der Kerninjektion (Spuren 1 und 3).

Wie die Abb.4.53 zeigt, wurde auch der Rev-vermittelte RNA Export, wie schon der Export des Rev-NES (Hofmann, W. Diplomarbeit 1999; Hofmann et al., 2001), durch Aktin-Antikörper komplett inhibiert (Spuren 3 und 4). Im Kontrollexperiment dagegen, in dem unspezifisches IgM in die Kerne injiziert wurde, wurde die RRE RNA, wie erwartet, effizient aus dem Kern ins Cytoplasma exportiert (Spuren 1 und 2). Die ausschließliche Präsenz der coinjizierten, exportdefizienten U6 RNA in den Kernen, zeigt die Genauigkeit der Kerninjektion (Spuren 1 und 3).

Als nächstes wurde der CTE-vermittelte RNA Export analysiert (Abb.4.54), dessen Exportweg sich ja von dem Rev-vermittelten RRE RNA Exportweg unterscheidet (Bogerd et al., 1998; Kang & Cullen, 1999) (siehe auch Kap.1.3.1). Auch hier wurden, 1h vor Injektion der Exporsubstrate, Antikörper gegen Aktin bzw. unspezifisches IgM in Kerne von *Xenopus* Oocyten injiziert. 30min nach Injektion der radioaktiv-markierten CTE RNA zusammen mit der Exportkontrolle U6 RNA, wurden Kerne und Cytoplasma getrennt. Die Lokalisation der beiden RNAs erfolgte dann wie oben beschrieben. Der Export der CTE RNA wurde durch Antikörper, die gegen Aktin gerichtet sind inhibiert, ebenso wie der Rev-vermittelte RRE RNA Export (Abb.4.54: Spuren 3 und 4).



**Abb.4.54:** Antikörper gegen Aktin inhibieren den Export der CTE RNA.

Das Oocyten Injektionsschema ist in der oberen Hälfte gezeigt. Nach Injektion und Inkubation wurden die Oocyten manuell in Kern (N) und Cytoplasma (C) getrennt. Nach Isolierung der Gesamt-RNA wurde diese über ein 6% RNA-Acrylamidgel aufgetrennt und die injizierte RNA wurde mittels Autoradiographie lokalisiert. CTE RNA Export findet zwar in Anwesenheit von unspezifischem IgM (Spuren 1 und 2), nicht jedoch in Anwesenheit von Antikörpern die gegen Aktin gerichtet sind statt (Spuren 3 und 4). Die CTE-Mutante (M2/M11) ist exportdefizient und verbleibt nach der Injektion im Kern (Spuren 1 und 3). Die Kernlokalisation der U6 RNA bestätigt die Präzision der Kerninjektion (Spuren 1 und 3).

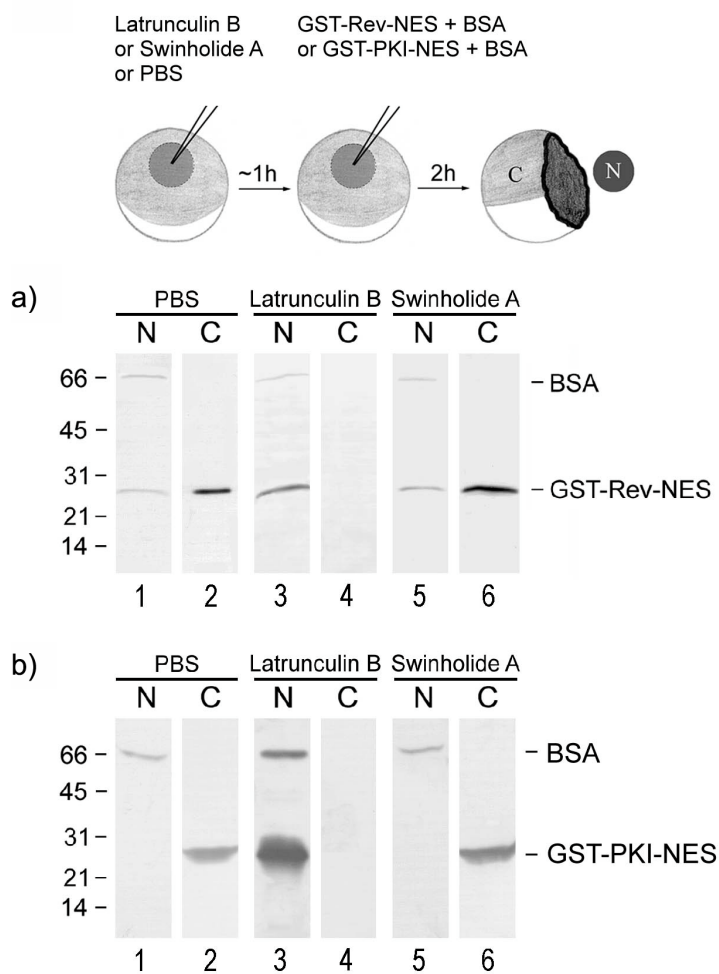
Diese Ergebnisse zeigen, daß Aktin am Export des Rev-NES (Hofmann, W. Diplomarbeit 1999; Hofmann et al., 2001), am Export des PKI-NES (Hofmann, W. Diplomarbeit 1999; Hofmann et al., 2001), am Rev-vermittelten RNA Export und am CTE-vermittelten RNA Export beteiligt ist. Im Gegensatz zu eIF-5A, das an einem ganz spezifischen Exportweg beteiligt ist, scheint Aktin ein eher genereller Exportfaktor zu sein.

#### 4.8.2 Eine monomere oder oligomere Form von Aktin ist an Kernexportprozessen beteiligt

Eine, bis heute noch offene Frage, ist die Form, in der Kernaktin vorliegt. Kerne von somatischen Zellen und Amphibien Oocyten werden nicht durch Phalloidin, einem spezifischen Marker von F-Aktin in der Immunfluoreszenz Mikroskopie, angefärbt. Daher ist es durchaus denkbar, das Kernaktin in einer unpolymerisierten oder oligomeren Form vorliegt, welche von Phalloidin nicht erkannt wird. Um nun die Rolle der Aktinpolymerisation bei Exportprozessen näher zu untersuchen, wurden zwei Aktin-bindende Drogen mit unterschiedlichen Spezifitäten verwendet. Das Toxin Latrunculin B bindet an G-Aktin und verhindert dadurch die Polymerisation (Coue et al., 1987). Die Droge Swinholide A zerstört F-Aktin und stabilisiert Aktindimere. Hierbei ist wichtig, daß F-Aktin nicht durch Depolymerisation oder Inhibition der Polymerisation zerstört wird, sondern Swinholide A bindet an verschiedenen Stellen des F-Aktin und "zerbricht" dann die Filamente an diesen Bindungsstellen (Bubb et al., 1995).

Um nun den Effekt dieser beiden Drogen auf den Kernexport zu untersuchen, wurde Latrunculin B bzw. Swinholide A oder PBS als Kontrolle in die Kerne von *Xenopus* Oocyten injiziert (Abb.4.55). Nach 1h wurden die Exportsubstrate GST-Rev-NES bzw. GST-PKI-NES zusammen mit exportdefizientem BSA in die Kerne injiziert. Um den Export des PKI-NES zu untersuchen, wurden natürlich Oocyten aus Hormon-induzierten Fröschen verwendet, da ein Export des PKI-NES nur in diesen beobachtet werden kann (siehe Kap.4.1.5). Nach einer Inkubationszeit von 2h wurden Kerne und Cytoplasma manuell getrennt, die Proteine der einzelnen Fraktionen über 18% SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert (siehe Kap.3.2.1 und 3.3.4). Diese Nitrocellulose wurde dann anschließend mit Antikörpern gegen GST und BSA inkubiert, um die injizierten Proteine zu lokalisieren.

Wie die Abb.4.55 zeigt, wurde durch Mikroinjektion von Latrunculin B in Kerne von *Xenopus* Oocyten sowohl der Kernexport von GST-Rev-NES (a: Spuren 3 und 4) als auch von GST-PKI-NES inhibiert (b: Spuren 3 und 4). Im Gegensatz dazu hatte eine Injektion der Droge Swinholide A (a und b: Spuren 5 und 6) ebenso wenig einen Einfluß auf den Export der injizierten Substrate, wie PBS (a und b: Spuren 1 und 2). Die ausschließliche Präsenz des coinjizierten BSA zeigt die Präzision der Kerninjektion (a und b: Spuren 1, 3 und 5).



**Abb.4.55:** Effekte verschiedener Aktin-bindenden Drogen auf den Kernexport von GST-Rev-NES und GST-PKI-NES.

Das Oocyten Injektionsschema ist in der oberen Hälfte gezeigt. 1h nach der Kerninjektion von Latrunculin B, Swinholide A oder PBS, wurden die Exportsubstrate GST-Rev-NES oder GST-PKI-NES zusammen mit exportdefizientem BSA in die Oocytenkerne injiziert. Nach Injektion und Inkubation wurden die Oocyten manuell in Kern (N) und Cytoplasma (C) getrennt. Die Proteine wurden durch 18% SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Anschließend wurden die Blots mit Antikörpern gegen GST und BSA inkubiert. Der größte Teil der injizierten Exportsubstrate wird in Anwesenheit von PBS (a und b: Spuren 1 und 2) und Swinholide A (a und b: Spuren 5 und 6) aus dem Kern ins Cytoplasma exportiert. Im Gegensatz dazu verbleiben die Exportsubstrate in Anwesenheit von Latrunculin B hauptsächlich im Kern (a und b: Spuren 3 und 4). Die ausschließliche Präsenz von BSA in den Kernen bestätigt daher die Spezifität der Kerninjektion (a und b: Spuren 1, 3 und 5). Die Molekulargewicht-Marker in kDa sind links gezeigt.

Diese Ergebnisse unterstützen die Idee, daß eher eine lösliche Form von Aktin anstelle von Aktinfilamenten an Kernexportprozessen beteiligt ist.

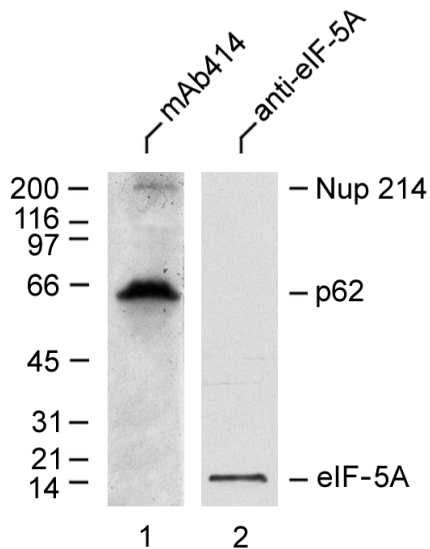
#### 4.8.3 Identifikation Aktin-bindender Kernproteine

Um mehr über die funktionelle Rolle von Kernaktin bei Kernexportprozessen zu erfahren, ist es von enormer Bedeutung Kernaktin-bindende Proteine zu identifizieren.

Dazu wurden Bindungsstudien in Lösung durchgeführt, mit gereinigtem, Fluorescein-gelabelten Actinmonomeren als Köder (Abb.4.56).

Diese Aktinmonomere wurden, wie unter 3.3.3 beschrieben, an aktivierte CNBr-Sepharose gekoppelt und mit Extrakt von 150 manuell isolierten *Xenopus* Oocytenkernen inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden über 12% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit verschiedenen Antikörpern inkubiert (siehe 3.3.4). Wie die Abb.4.56 zeigt, konnte mit einem Antikörper gegen eIF-5A die bereits beobachtete Interaktion (siehe

Kap.4.2.) zwischen eIF-5A und Aktin bestätigt werden (Spur 1). Als weitere Bindungspartner der Aktinmonomere konnten die Nucleoporine CAN/Nup214 sowie p62 mit Hilfe des mAB414 (einem Antikörper, der gegen eine Familie von Nucleoporinen gerichtet ist) identifiziert werden (Spur 2).

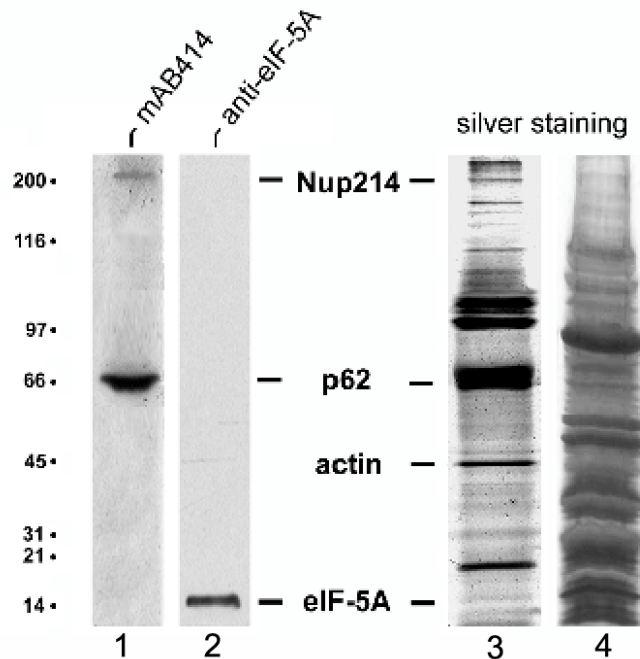


**Abb.4.56:** Aktinmonomere interagieren mit eIF-5A und den Nucleoporinen CAN/Nup214 und p62. Aktinmonomere wurden an aktivierte CNBr-Sepharose gebunden und mit Extrakt aus 150 Oocytenkernen inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden über 12% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und durch Immunblot mit Antikörpern gegen eIF-5A (Spur 1) und eine Familie von Nucleoporinen (mAB414; Spur 2) analysiert. Es konnte eine Interaktion zwischen Aktinmonomeren und eIF-5A (Spur 1), sowie eine Interaktion zwischen Aktinmonomeren und den Nucleoporinen CAN/Nup214 und p62 (Spur 2) detektiert werden. Die Molekulargewicht-Marker in kDa sind links gezeigt.

Eine Interaktion zwischen Kernaktin und Nucleoporinen ließ sich bereits aufgrund der Lokalisation an den nucleoplasmatischen Fibrillen vermuten. Zu beachten ist hier jedoch die Spezifität, mit der die Aktinmonomere genau an diese beiden Nucleoporine binden, nicht jedoch an andere, wie Nup98 oder Nup153, die auch von diesem mAB414 erkannt werden. Interessant könnte hier auch die Lokalisation dieser beiden im Kernporenkomplex sein. Während sich p62 entlang der Kernpore und an den nucleoplasmatischen Filamenten befindet, ist CAN/Nup214 eigentlich an den cytoplasmatischen Filamenten lokalisiert (siehe auch Abb.1.2). Es konnte kürzlich jedoch auch gezeigt werden, daß im Rahmen von Transportereignissen CAN/Nup214 bis hin zum nucleären Basket shutteln kann (Boer et al., 1997) (siehe Kap 1.1.2). Dies könnte ein interessanter Aspekt in Bezug auf eine Funktion von Kernaktin bei Exportprozessen sein.

Interaktion von Aktin mit Kernproteinen wurde auch durch Immunpräzipitations-Assays untersucht (Abb.4.57). Der Antikörper gegen Kernaktin (mAB 2G2) wurde an aktivierte CNBr-Sepharose gebunden und mit Extrakt aus manuell isolierten Kernen von *Xenopus* Oocyten inkubiert (siehe 3.3.3), um Kernaktin sowie an dieses gebundene Kernproteine zu

präzipitieren. Gebundene und ungebundene Proteine wurden über 18% SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Diese wurde dann mit verschiedenen Antikörpern inkubiert (siehe 3.3.4). Das Gel wurde anschließend mit Silber gefärbt.

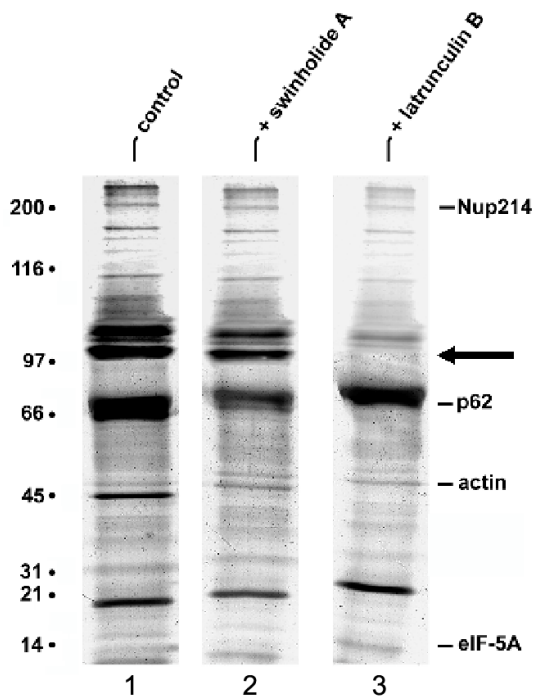


**Abb.4.57:** Immunpräzipitation von Aktin-bindenden Kernproteinen.

Der anti-Aktin Antikörper 2G2 wurde an aktivierte CNBr-Sepharose gebunden und mit 1000 handisolierten Kernen von *Xenopus* Oocyten inkubiert. Die gebundenen (Spuren 1-3 und b) und nicht gebundenen (Spur 4) Proteine wurden anschließend im 1-D Gel über 12% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit Antikörpern gegen eIF-5A (Spur 2) und eine Familie von Nucleoporinen (mAB 414, Spur 1) analysiert, wodurch eIF-5A und p62 als Bindungspartner von Aktin identifiziert werden konnten (Spuren 1 und 2). Die anschließende Silberfärbung des 1-D Geles zeigt mehrere noch nicht identifizierte copräzipitierte Proteine (Spur 3). Die Molekulargewicht-Marker in kDa sind links gezeigt.

Diese Immunpräzipitation wurde auch mit anschließender Auftrennung der Proteine im 2-Dimensionalen Gel (Auftrennung der Proteine durch IEF in der 1. Dimension und durch SDS-PAGE in der 2. Dimension) durchgeführt (siehe 3.2.3), um eine Identifikation der Proteine zu erleichtern.

Wie die Silberfärbung des 1-D-Geles zeigt, wurden unter diesen Bedingungen mehrere Aktin-bindende Proteine präzipitiert (Abb.4.57: Spur 3). Mit Hilfe von Antikörpern gegen eIF-5A (Spur 2) und einer Familie von Nucleoporinen (mAB 414) (Spur 1) konnten eIF-5A sowie p62 auch hier als Bindungspartner identifiziert werden. Die anderen Proteine konnten noch nicht identifiziert werden. Zum Teil werden diese zur Zeit massenspektrometrisch analysiert.



**Abb.4.58:** Effekt von Aktin-bindenden Drogen auf die Immunpräzipitation mit einem anti-Aktin Antikörper. Der anti-Aktin Antikörper 2G2 wurde an aktivierte CNBr-Sephrose gebunden und mit 1000 handisolierten Kernen von *Xenopus* Oocyten inkubiert. Vor dieser Inkubation wurden die Kernproteine mit den Aktin-bindenden Drogen Swinholide A (Spur 2), Latrunculin B (Spur 3) oder PBS als Kontrolle (Spur 1) inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden über 12% SDS-PAGE aufgetrennt, mit einer anschließenden Silberfärbung des Geles. In Anwesenheit von Latrunculin B wird ein Protein mit einer Molekularen Masse von 98 kDa nicht mehr präzipitiert (durch Pfeil markiert). Die bereits identifizierten Proteine sind auf der rechten Seite angegeben. Die Molekulargewicht-Marker in kDa sind links gezeigt.

Als diese Immunpräzipitation in Anwesenheit der Aktin-bindenden Proteine Latrunculin B und Swinholide A (siehe 4.7.2) durchgeführt wurde, konnte man erstaunlicherweise einen Effekt beobachten. Eine Präinkubation der Kernproteine mit dem Toxin Latrunculin B, vor Inkubation des, an CNBr-Sephrose gebundenen Aktin-Antikörpers führte dazu, daß das Protein mit einem Molekulargewicht von 98kDa nicht mehr mit Aktin copräzipitierte (siehe Abb.4.58.: Spur 3; durch Pfeil markiert). In den früheren Mikroinjektionsversuchen, die unter 4.7.2 beschrieben sind (Abb.4.55), führte eine Mikroinjektion dieser Droge zu einer Exportinhibition. Dies läßt darauf schließen, daß es sich bei diesem Protein, welches unter dem Einfluß von Latrunculin B nicht mehr an Aktin bindet, um einen Faktor handeln könnte, der essentiell am Aktin-abhängigen Export beteiligt ist. In Anwesenheit der Droge Swinholide A konnte man dagegen keinen solchen Effekt bei der Immunpräzipitation beobachten (Spur 2), was auch mit den Injektionsexperimenten übereinstimmt, bei denen eine Injektion von Swinholide A ebenfalls keinen Effekt auf den Export hatte (Abb.4.55).

Zur Zeit wird dieses hoch interessante Protein mit dem Molekulargewicht von 98kDa mit Hilfe von Massenspektrometrie analysiert.



## 5. Diskussion

Der bidirektionale Transport von Makromolekülen zwischen Kern und Cytoplasma über den Kernporenkomplex ist ein hoch selektiver, Energie-abhängiger Prozeß. Eine Familie von Transporterproteinen, die man auch als Importine und Exportine bezeichnet, vermittelt den Transport von Proteinen und RNAs zwischen Kern und Cytoplasma (Corbett & Silver, 1997; Görlich & Kutay, 1999; Izaurralde & Adam, 1998; Nakielny & Dreyfuss, 1999). Diese nucleocytoplasmatische Translokation erfordert spezifische Signale innerhalb des zu transportierenden Substrates, die entweder den Kernimport oder den Kernexport vermitteln (reviewed in: Adam, 1999). Obwohl einige generelle Charakteristika der Exportmaschinerie etabliert und einige Komponenten identifiziert sind, ist ihre genaue Wirkungsweise noch unklar.

So ist noch für keine der zellulären RNAs ein präziser Exportmechanismus geklärt. Generell akzeptiert ist jedoch, daß der Export der verschiedenen RNA-Klassen in Form von RNPs stattfindet und RNA-bindende Proteine erfordert. Der Export der RNPs wird spezifiziert durch Kernexportsignale (NES), die sich im Proteinanteil der RNPs befinden (Jarmolowsky et al., 1994; Stade et al., 1997). Die ersten Kernexportsignale wurden in retroviralen Proteinen identifiziert, die am viralen RNA Export beteiligt sind (Fischer et al., 1995) und bestehen aus einer kurzen, Leucin-reichen Aminosäure-Sequenz.

Mittlerweile wurden diese Kernexportsignale auch in einer Reihe anderer, zellulärer Proteine identifiziert, mit einer Vielzahl von zellulären Funktionen (reviewed in: Macara, 2001).

Der zur Zeit am Besten untersuchte, spezifische mRNA Exportfaktor mit einem solchen Leucin-reichen NES ist das Rev-Protein von HIV-1, das den Export Intron-enthaltender viraler mRNAs aus dem Kern vermittelt. Es wurden verschiedene zelluläre Proteine gezeigt, die direkt und spezifisch an das Rev-NES binden. Dazu gehören CRM1/exportin1 (Fornerod et al., 1997; Stade et al., 1997) und der eukaryotische Initiationsfaktor 5A (eIF-5A, Bevec et al., 1996). CRM1/exportin1 ist ein Mitglied der Importinβ Superfamilie und scheint ein genereller Exportrezeptor für Leucin-reiche Kernexportsignale zu sein (Fornerod et al., 1997; Fukuda et al., 1997; Ossareh-Nazari et al., 1997; Stade et al., 1997).

Im Fall von eIF-5A konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden, daß eIF-5A in somatischen Zellen spezifisch für die nucleocytoplasmatische Translokation der Rev/Rex-Klasse retroviraler RNA-Exportfaktoren benötigt wird ( Ruhl et al., 1993; Bevec et al., 1996;



Katahira et al., 1995). Im besonderen haben Mikroinjektionsstudien darauf hingedeutet, daß eIF-5A vermutlich vor oder simultan mit dem generellen Exportrezeptor CRM1/exportin1, während des Kernexportes von Rev wirkt (Elfgang et al., 1999). So konnte durch konstitutive Expression der eIF-5A Mutante M14 in menschlichen T-Zellen die Rev Aktivität und dadurch die HIV-1 Replikation *in trans* blockiert werden (Junker et al., 1996; Bevec et al., 1996). Des weiteren konnte bereits gezeigt werden, daß eIF-5A ein Shuttle Protein ist, in *Xenopus* Oocyten und somatischen Zellen, an den Kernporenkomplex-assoziierten Filamenten akkumuliert und mit dem generellen Exportrezeptor CRM1/exportin1 interagiert (Rosorius et al., 1999b).

Aufgrund dieser Daten wurde in dieser Arbeit zunächst die Rolle von eIF-5A beim Kernexport des Rev und beim Rev-vermittelten RNA Export in *Xenopus* Oocyten untersucht.

Mit Hilfe von Antikörpern gegen eIF-5A, die in Kerne von *Xenopus* Oocyten injiziert wurden, konnte gezeigt werden, daß auch in *Xenopus* Oocyten der Kernexport des Rev und der Rev-vermittelte RNA Export von eIF-5A abhängig ist. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß eIF-5A spezifisch für den Rev-vermittelten Export viraler RNA ist. Im Gegensatz dazu, spielt eIF-5A keine Rolle im CTE-vermittelten RNA Export und im Kernexport des PKI Proteins. Diese Daten stimmen mit bereits früher veröffentlichten Daten perfekt überein. Der Export der Intron-enthaltenden viralen mRNA des Mason-Pfizer Monkey Virus wird im Gegensatz zu HIV-1 nicht durch einen Transaktivator wie Rev vermittelt, sondern durch eine Sequenz in der RNA Struktur, dem sogenannten CTE (constitutive transport element). Es konnte bereits gezeigt werden, daß der Export dieser CTE-enthaltenden RNA über einen anderen Exportweg, mit anderen zellulären Faktoren stattfindet, als der Rev-vermittelte RNA Export (Bogerd et al., 1998; Kang & Cullen, 1999; Pasquinelli et al., 1997; Zolotukhin & Felber, 1999). Dies gilt auch für den Kernexport des Proteins PKI. Auch hier konnte in somatischen Zellen gezeigt werden, daß eIF-5A zwar für den Kernexport des Rev-NES, nicht aber für den Kernexport des PKI-NES benötigt wird.

Durchgeführte Mikroinjektionen der eIF-5A Mutante M14 in Kerne von *Xenopus* Oocyten haben gezeigt, daß auch eIF-5A-M14 den Kernexport des Rev und den Rev-vermittelten RNA Export inhibiert. Daraufhin wurde diese eIF-5A Mutante M14 genauer untersucht.

Es hat sich nun gezeigt, daß diese, im Gegensatz zum eIF-5A Wildtyp, nicht mehr mit dem Exportrezeptor CRM1/exportin1 interagiert und daher nicht mehr aus dem Kern exportiert

wird. Da durch Inkubation des Rev-NES mit dieser Mutante der Kernexport des Rev sowie der Rev-vermittelte RNA Export inhibiert wird, läßt dies den Schluß zu, daß eIF-5A als eine Art Adapter wirken könnte, der das Rev-NES mit CRM1/exportin1 verbindet. In der Tat haben darauffolgende *in vitro* Bindungsstudien gezeigt, daß eine effiziente Rev-NES/CRM1/exportin1 Komplexbildung nur in Anwesenheit von eIF-5A zu beobachten war. Ohne eIF-5A oder in Anwesenheit der eIF-5A Mutante M14 dagegen, fand keine Bindung des Exportrezeptors CRM1/exportin1 an das Rev-NES statt.

Dieses Konzept, daß die Bindung des Exportrezeptors CRM1/exportin1 an das Rev-NES durch einen Adapter vermittelt wird, stimmt mit Untersuchungen der Bindungsaffinitäten des Rev zu CRM1/exportin1 überein. In diesen Experimenten wurde Rev, gebunden an RRE RNA, mit CRM1/exportin1 sowie RanGTP inkubiert. In anschließenden Gel Retardations-Assays konnte nur eine sehr schwache Komplexbildung gemessen werden. Weniger als 1% der RRE-Rev RNPs interagierten hier mit dem rekombinanten CRM1/exportin1 (Askjaer et al., 1998). In einer anderen Studie konnte nur eine effiziente Interaktion des Rev-NES mit CRM1/exportin1 beobachtet werden, wenn CRM1/exportin1 benutzt wurde, das aus Reticulocyten Lysat stammte (Fornerod et al., 1997b). Bemerkenswert dabei ist, daß Reticulocyten Extrakt große Mengen von eIF-5A enthält (Schatz et al., 1998). Wenn dagegen CRM1/exportin1 verwendet wurde, das durch Translation in *E. coli* Lysat hergestellt wurde, der kein eIF-5A enthält, konnte keine Bindung des Rev an CRM1/exportin1 beobachtet werden (Fornerod et al., 1997a). Dies alles deutet darauf hin, daß zusätzliche Faktoren neben RanGTP, für eine effiziente Interaktion zwischen Rev-NES und CRM1/exportin1 benötigt werden.

Die Daten dieser Arbeit zeigen nun eindeutig, daß eIF-5A der zelluläre Faktor ist, der die Bindung des CRM1/exportin1 an das Rev-NES vermittelt. Des weiteren erklären diese Daten auch, wodurch die eIF-5A Mutante M14 die HIV-1 Replikation inhibiert. Offensichtlich bindet eIF-5A an das Rev-NES und vermittelt dadurch die Bindung des Rev/RRE RNA Komplexes an CRM1/exportin1. Aufgrund der, durch eIF-5A vermittelten, Interaktion mit CRM1/exportin1 wird der Komplex dann aus dem Kern exportiert. Da die eIF-5A Mutante M14 zwar an das NES des Rev bindet, jedoch nicht mehr an CRM1/exportin1, verhindert eIF-5A-M14 dadurch auch die Bindung des Rev/RRE RNA Komplexes an CRM1/exportin1. Aufgrund der fehlenden Interaktion mit CRM1/exportin1 kann der Komplex nicht exportiert werden. Dies führt dazu, daß keine Intron-enthaltende virale mRNA mehr in das Cytoplasma gelangt, wodurch letztendlich die Replikation inhibiert wird.

Da die zelluläre Funktion von eIF-5A noch unbekannt war, wurden Overlay Blot Assays auf manuell isolierten Kernhüllen von *Xenopus* Oocyten durchgeführt, um weitere Bindungspartner von eIF-5A zu identifizieren. Es konnten spezifische Interaktionen von eIF-5A mit CRM1/exportin1, mit den Nukleoporinen CAN/Nup214, Nup153, Nup98 und Nup62, mit der Tissue Transglutaminase, TFIIIA und Aktin gezeigt werden. All diese Interaktionen wurden auch durch Bindungsstudien in Lösung bestätigt.

Interessanterweise wurden nur Nukleoporine von eIF-5A gebunden, von denen man bis jetzt weiß, daß sie an Kernexportwegen beteiligt sind (Bastos et al., 1995; Fornerod et al., 1997b; Powers et al., 1997; Askjaer et al., 1999; Kehlenbach et al., 1999; Nakielny et al., 1999; Pritchard et al., 1999; Ullman et al., 1999; Bachi et al., 2000), während andere FG-Repeat enthaltende Nucleoporine wie etwa RanBP2 nicht detektiert wurden. Des weiteren konnte durch eine Serie von Studien, die in letzter Zeit durchgeführt wurden, die direkte Beteiligung von CAN/Nup214, Nup153 und Nup98 am Kernexport des Rev und am Rev-vermittelten viralen mRNA Export gezeigt werden (Bogerd et al., 1998; Ullman et al., 1999; Zolothukin & Felber, 1999). Die Interaktion von eIF-5A mit diesen Komponenten des Kernporenkomplexes, die alle am Kernexport beteiligt sind, deutet darauf hin, daß auch die zelluläre Funktion von eIF-5A beim Kernexport zu finden ist.

Von besonderer Bedeutung ist die Interaktion von eIF-5A mit TFIIIA. In *Xenopus* Oocyten hat TFIIIA, unter anderem, eine Rolle beim 5S rRNA Export, die analog zu der Rolle von Rev beim viralen mRNA Export ist.

Amphibien Oocyten besitzen 2 Typen von 5S rRNA, den Oocyten-Typ und den Somatisch-Typ 5S rRNA, die während der Oogenese unterschiedlich reguliert werden. In prävitellogenen Oocyten wird die Oocyten-Typ 5S rRNA exprimiert und dann zur Lagerung ins Cytoplasma transportiert (Mairy & Denis, 1971). Der Kernexport und die Lagerung erfolgt in Form von 7S RNPs, die aus einem Komplex aus 5S rRNA und dem Transkriptionsfaktor des 5S rRNA Genes, TFIIIA besteht (Picard & Wegnez, 1979; Honda & Roeder, 1980). Kürzlich konnte in TFIIIA ein Leucin-reiches NES gefunden werden, daß vermutlich den Export des TFIIIA und den TFIIIA-vermittelten Export der 5S rRNA vermittelt (Fridell et al., 1996).

Da es scheinbar große Ähnlichkeiten zwischen dem Kernexport des Rev und dem Kernexport des TFIIIA gibt, wurde die Rolle von eIF-5A beim Kernexport des TFIIIA und beim TFIIIA-vermittelten 5S rRNA Export untersucht.

Mit Hilfe von Mikroinjektionsexperimenten, in Anwesenheit der Droge Leptomycin B, dem spezifischen Inhibitor der CRM1/exportin1 Funktion konnte gezeigt werden, daß der Kernexport des TFIIIA sowie der TFIIIA-vermittelte 5S rRNA Export in der Tat über den generellen Exportrezeptor CRM1/exportin1 vermittelt wird. Dies war zu erwarten, da das NES des TFIIIA große Ähnlichkeiten zu dem NES des Rev Proteins aufweist und CRM1/exportin1, wie schon erwähnt, ein genereller Exportrezeptor für solche Rev-ähnlichen, Leucin-reichen Kernexportsignale ist (Fornerod et al., 1997; Fukuda et al., 1997; Ossareh-Nazari et al., 1997; Stade et al., 1997).

Neben CRM1/exportin1 konnte jedoch auch eIF-5A als ein essentieller Faktor in diesem Kernexportweg identifiziert werden. Durch Bindungsstudien konnte gezeigt werden, daß eIF-5A auch im TFIIIA-vermittelten Export der 5S rRNA eine Funktion als Adapter hat, analog seiner Rolle im Rev-vermittelten RNA Export. Auch hier bindet eIF-5A an das TFIIIA-NES und vermittelt eine effiziente Bindung von CRM1/exportin1 an den TFIIIA/5S rRNA Komplex, so daß dieser effizient aus dem Kern exportiert werden kann.

Das Rev für den viralen RNA Export und TFIIIA für den Export der 5S rRNA einen gemeinsamen zellulären Exportweg, mit gemeinsamen Faktoren benutzen, ist in voller Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen. Bei Konkurrenzexperimenten in *Xenopus* Oocyten führte dabei eine Inhibition des Rev Exportweges auch zu einer Inhibition des Exportes der 5S rRNA (Fischer et al., 1995). Des weiteren konnte gezeigt werden, daß das Rev-NES funktionell durch das TFIIIA-NES ersetzt werden kann. Auch nach dem Austausch des Kernexportsignals hat ein Export des Rev und ein Rev-vermittelter RNA Export stattgefunden (Fridell et al., 1996).

Ein weiterer Hinweis auf eine Rolle von eIF-5A beim zellulären RNA Export kommt aus Dendritischen Zellen (DCs).

Dendritische Zellen sind Antigen-präsentierende Zellen des Immunsystems. Nachdem ein Fremdantigen von einer Dendritischen Zelle aufgenommen wurde, beginnt der Reifungsprozess, der letztendlich zur Antigen-Präsentation auf der Oberfläche der DCs führt, wodurch Helfer- und Killer-T-Zellen, während der Einleitung der T-Zell-vermittelten Immunität, sensibilisiert werden (Steinman, 1991). Reife Dendritische Zellen können aufgrund

der Oberflächenexpression des CD83 Moleküls charakterisiert werden (Zhou et al., 1992), das vermutlich eine Funktion bei der Induktion der T-Zell-vermittelten Immunität hat (Lechmann et al., 2001). Frühere Studien haben gezeigt, daß die CD83 mRNA über einen spezifischen RNA Exportweg aus dem Kern exportiert wird, in dem auch eIF-5A involviert sein soll. Eine Behandlung von Dendritischen Zellen mit Drogen, die die einzigartige Hypusinmodifikation des eIF-5A inhibieren, führte zu einer Akkumulierung der CD83 mRNA im Kern, wodurch die Oberflächenexpression des CD83 Proteins verhindert wurde (Kruse et al., 2000).

Analysen der CD83 mRNA haben zur Identifikation eines neuen, *cis*-aktiven RNA Elements geführt, das eine spezifische Zielsequenz für das Protein HuR darstellt und als HRE (HuR Response Element) bezeichnet wird (Prechtel et al., *submittet*). HuR ist ein Mitglied der ubiquitär exprimierten ELAV (embryonic lethal abnormal vision) Familie von RNA-Bindungsproteinen (Good, 1995; Ma et al., 1996). Da Mitglieder der ELAV Familie auch in *Xenopus* Oocyten exprimiert werden (Good, 1995), wurde der Export der CD83 mRNA in *Xenopus* Oocyten detailliert analysiert mit besonderem Augenmerk auf eine Beteiligung von eIF-5A an diesem Exportweg.

Es konnte gezeigt werden, daß die Bindung der CD83 mRNA an HuR zu einem Export der CD83 mRNA führt. Der Export zellulärer mRNAs und auch der Export des CTE des Mason-Pfizer Monkey Virus wird über den Exportrezeptor TAP vermittelt (Grüter et al., 1998). Durchgeführte Konkurrenzexperimente mit CTE RNA haben nun gezeigt, daß die CD83 mRNA über einen spezifischen Exportweg exportiert wird, der sich vom generellen zellulären mRNA Exportweg unterscheidet, also nicht durch TAP vermittelt wird. Im Gegensatz zum üblichen mRNA Export ist dieser HuR-vermittelte Export der CD83 mRNA Leptomycin B sensitiv. Dies bedeutet, daß der generelle Exportfaktor CRM1/exportin1 in diesen Exportweg involviert ist. Als ein weiterer Faktor in diesem Exportweg konnte der HuR-Ligand APRIL identifiziert werden. Dieser besitzt ein Rev-ähnliches, Leucin-reiches Exportsignal, das ein Ziel für den Exportrezeptor CRM1/exportin1 darstellt.

Neben HuR und APRIL konnte aber auch eIF-5A als ein essentieller Faktor in diesem Exportweg identifiziert werden. Analog zu seiner Rolle im Rev-vermittelten und TFIIIA-vermittelten Export fungiert eIF-5A auch hier als ein Adapter, der das Leucin-reiche NES von APRIL effizient mit dem Exportrezeptor CRM1/exportin1 verbindet, wodurch der Export des HuR/APRIL/CD83 mRNA Komplexes ermöglicht wird.

In letzter Zeit häufen sich die Anzeichen dafür, daß die Regulation des mRNA Kernexportes in höheren Eukaryoten komplexer ist, als ursprünglich angenommen. Während der TAP-

vermittelte Export für den generellen Export gespleißter Transkripte verantwortlich ist (Pasquinelli et al., 1997; Saavedra et al., 1997), scheinen doch auch andere, zusätzliche Exportwege für den Export ganz spezifischer mRNA Gruppen zu existieren. Die Idee, daß einige zelluläre mRNAs auch über den CRM1/exportin1 Exportweg exportiert werden können, wird auch unterstützt durch Experimente in denen gezeigt werden konnte, daß Leptomycin B zu einer Akkumulation der *c-fos* mRNA in HeLa-Zellen führt, während der generelle mRNA Exportweg davon nicht betroffen zu sein scheint (Brennan et al., 2000).

HuR wurde ursprünglich als ein spezifischer RNA Stabilisierungsfaktor beschrieben, der an AU-reiche Elemente (AREs) bindet, die in den höchst instabilen ERG (early response gene) mRNAs vorliegen (Brennan & Steitz, 2001). Bindung des HuR an diese spezifische RNA Sequenz, schützt die RNA vor Degradation (Peng et al., 1998; Ford et al., 1999). Bindung des HuR an das HRE der CD83 mRNA, einem neuen RNA Element ohne Ähnlichkeiten mit früher identifizierten RNA Elementen, hat dagegen keinen Einfluß auf die Stabilität der RNA (Prechtel et al., submittet), sondern führt, wie die durchgeführten Experimente zeigen, zu einem Export der RNA aus dem Kern. Diese Rolle des Shuttle-Proteins HuR im Kernexport von mRNAs, zusätzlich zu seiner Funktion als RNA-Stabilisierungsfaktor, wurde bereits in anderen Studien gezeigt. Es wurde gezeigt, daß ARE-enthaltende mRNAs nach Hitzeschock stabilisiert werden (Andrews et al., 1987; Laroia et al., 1999). Auffallend dabei ist, daß Hitzeschock ebenfalls zu einer Anreicherung des normalerweise nucleären Proteins HuR im Cytoplasma führt. Unter diesen Bedingungen kann außerdem der Kernexport des HuR sowie der hsp70 mRNA durch Leptomycin B inhibiert werden (Gallouzi et al., 2000; Gallouzi et al., 2001). Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß unter solchen besonderen Umständen, wie etwa Hitzeschock, HuR eine bedeutende Rolle hat, indem es den Export von Hitzeschock mRNAs über den CRM1/exportin1 Exportweg vermittelt. In diesem Zusammenhang würde die nucleocytoplasmatische Translokation von einer zellulären Ausnahmesituation abhängen, wie etwa Hitzeschock, oder aber auch, der Eintritt eines Fremdantigens in eine Dendritische Zelle, wodurch die Expression des CD83 Moleküls eingeleitet wird.

Nun ist beschrieben, daß die Interaktion eines Exportsubstrates mit dem Exportrezeptor CRM1/exportin1 durch die Interaktion mit einem Leucin-reichen NES stattfindet (Stade et al., 1997; Fornerod et al., 1997a). HuR selbst, besitzt jedoch keine solche NES Domäne und ist daher nicht in der Lage selbst mit CRM1/exportin1 zu interagieren. Kürzlich konnten jedoch zwei Protein-Liganden von HuR identifiziert werden, pp32 und APRIL, die beide solch ein NES besitzen (Brennan et al., 2000). HuR scheint daher durch eine Bindung an pp32 oder

APRIL mRNAs über den CRM1/exportin1 Exportweg aus dem Kern zu transportieren (Brennan & Steitz, 2001). Während am Export der Hitzeschock mRNAs sowohl APRIL als auch pp32 beteiligt zu sein scheinen (Gallouzi et al., 2001), konnte beim Export der CD83 mRNA in *Xenopus* Oocyten lediglich eine Beteiligung von APRIL, nicht aber von pp32 gezeigt werden. Obwohl beide Faktoren in den Bindungsstudien in Oocyten mit CRM1/exportin1 interagieren, könnte die Beteiligung von entweder APRIL oder pp32 an bestimmten Exportwegen auf eine zusätzliche Form der Exportregulation schließen lassen. Eine detaillierte Analyse der entsprechenden Expressions-Levels in verschiedenen Zellen und Geweben, sowie eine Analyse der Exportkinetiken von APRIL und pp32 könnte genaueren Aufschluß über die Beteiligung des jeweiligen Faktors an Exportwegen geben.

Als ein zusätzlicher Faktor, der an diesem spezifischen Exportweg der CD83 mRNA beteiligt ist, konnte eIF-5A identifiziert werden. eIF-5A interagiert hier nicht direkt mit HuR sondern bindet, an das Leucin-reiche NES von APRIL und vermittelt eine effiziente Bindung des NES an den Exportrezeptor CRM1/exportin1, wie auch beim Rev-vermittelten RNA Export und beim TFIIIA-vermittelten RNA Export. Diese Wirkungsweise von eIF-5A erklärt auch die Daten aus Dendritischen Zellen, in denen eine Inkubation dieser Zellen mit einer spezifischen Droge (GC7), die die Hypusinmodifikation des eIF-5A inhibiert, zu einer Akkumulation der CD83 mRNA im Kern führt (Kruse et al., 2000). Ausgehend von diesen Ergebnissen läßt sich das folgende Modell für den Export der CD83 mRNA in Dendritischen Zellen aufstellen. Demnach interagiert HuR mit dem *cis*-aktiven RNA Element (HRE) der CD83 mRNA. An diesen Komplex bindet der HuR Ligand APRIL, an dessen Leucin-reiches NES wiederum eIF-5A bindet und den RNA/Protein Komplex mit dem Exportrezeptor CRM1/exportin1 verbindet, was zu einem Export des Komplexes aus dem Kern führt.

eIF-5A scheint also in der Tat ein Faktor zu sein, der den Export ganz spezifischer RNAs, vermutlich sogar Gewebe-spezifischer RNAs aus dem Kern vermittelt, indem er die Leucin-reichen Kernexportsignale RNA-bindender Proteine mit dem Exportrezeptor CRM1/exportin1 verbindet, wodurch der Export des RNA/Protein Komplexes eingeleitet wird.

Nicht bekannt ist zur Zeit, warum eIF-5A so spezifisch an die Leucin-reichen Kernexportsignale von Rev, TFIIIA und APRIL bindet, da es keine eindeutigen Gemeinsamkeiten dieser drei Kernexportsignal-Sequenzen gibt, die diese von anderen Leucin-reichen Kernexportsignalen unterscheidet.

Unklar ist auch, welche genaue Funktion die Hypusinmodifikation des eIF-5A hat, die jedoch essentiell für eIF-5A zu sein scheint, wie unter anderem die Versuche in Dentritischen Zellen gezeigt haben, wo eine Inhibition der Hypusinmodifikation durch bestimmte Drogen zu einer Akkumulation der CD83 mRNA im Kern führten (Kruse et al., 2000). eIF-5A ist das einzige, bisher bekannte Protein, das die ungewöhnliche Aminosäure Hypusin besitzt (Park et al., 1993). Bei dieser Modifikation handelt es sich um eine Spermidin-abhängige posttranslationelle Reaktion, die durch 2 Enzyme katalysiert wird, durch die Deoxyhypusin-Synthase und die Deoxyhypusin Hydroxylase (Park et al., 1993).

Untersuchungen des Exportverhaltens von eIF-5A mit und ohne Hypusinmodifikation in *Xenopus* Oocyten und somatischen Zellen haben gezeigt, daß eIF-5A ohne Modifikation aus dem Kern exportiert wird und auch den Export von Substraten vermitteln kann (Rosorius et al., 1999b; Lipowsky et al., 2000; Hofmann et al., 2001). In dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen des Importverhaltens in *Xenopus* Oocyten haben gezeigt, daß im Gegensatz zum Export, eIF-5A nur in den Kern importiert werden kann, wenn es eine Hypusinmodifikation besitzt. Dies würde bedeuten, daß die Hypusinmodifikation essentiell für den Import des eIF-5A ist. Dadurch könnte auch erklärt werden, warum die eIF-5A Mutante M14 die Rev Funktion inhibiert, wenn sie konstitutiv in menschlichen Zellen exprimiert wird (Bevec et al., 1996; Junker et al., 1996), jedoch keinen Einfluß auf die Rev Funktion hat, wenn sie in transienten Assays überexprimiert wird (Hauber, 2001). Im Falle einer Überexpression könnte aufgrund einer Überbelastung der beiden Enzyme, die die Hypusin-modifikation katalysieren, nicht genügend eIF-5A modifiziert werden. Dies würde dazu führen, daß nicht mehr genug eIF-5A-M14 in den Kern importiert werden würde, so daß hier kein Einfluß des eIF-5A-M14 mehr beobachtet werden kann.

Von Bedeutung könnte hier auch die im Overlay Blot Assay beobachtete Interaktion von eIF-5A mit der Tissue-Transglutaminase (TGase) sein. Aufgrund der beschriebenen enzymatischen Funktion der Tissue Transglutaminase (Greenberg et al., 1991), könnte ihr eine Funktion bei der Hypusinmodifikation des eIF-5A zukommen. Untersuchungen der Lokalisation haben gezeigt, daß dieses hauptsächlich cytoplasmatische Protein auch an der Kernhülle akkumuliert und mit eIF-5A an den Kernporenkomplex-assoziierten Fibrillen colokalisiert.

Neben dem Exportverhalten des Rev-NES und des TFIIIA-NES wurden auch das Exportverhalten mehrerer anderer Rev-ähnlicher, Leucin-reicher Kernexportsignale in



*Xenopus* Oocyten untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß im Gegensatz zu somatischen Zellen (Heger et al., 2001), die Leucin-reichen Kernexportsignale der zellulären Proteine PKI und p53, sowie des viralen Proteins Rex in *Xenopus* Oocyten nicht exportiert werden. Besonders interessant ist dabei die Beobachtung, daß das NES des PKI nicht in Oocyten exportiert wird, die aus nicht hormonal behandelten Fröschen stammen, jedoch in Oocyten die aus Fröschen stammten, die mit Gonadotropin behandelt wurden. Diese Unterschiede zwischen somatischen Zellen und *Xenopus* Oocyten deuten auf das Vorhandensein zusätzlicher Faktoren hin, die im Gegensatz zu somatischen Zellen in *Xenopus* Oocyten nicht, oder nur unter besonderen Umständen vorhanden oder aktiv sind. Da die Interaktion des für diese Exportsignale generellen Exportrezeptors downstream der Bildung des Exportkomplexes, d.h. während des Transportes des Komplexes über den Kernporenkomplex in somatische Zellen und *Xenopus* Oocyten gleich ist, müssen dies Faktoren sein, die upstream von CRM1/exportin1 wirken. Faktoren wie eIF-5A, die eine Adapterfunktion besitzen und die Bindung des jeweiligen NES an CRM1/exportin1 vermitteln. Solch eine Regulation des Exportes über verschiedene Adapter, die die Bindung an CRM1/exportin1 vermitteln wäre auch anzunehmen, wenn man die immer größer werdende Liste von Proteinen mit solch verschiedenen zellulären Funktionen wie etwa RNA-Transportfaktor, Transkriptionsfaktoren und ihre Inhibitoren, Protein-Kinasen und ihre Inhibitoren betrachtet, die alle über den generellen Exportrezeptor CRM1/exportin1 werden.

Durch Overlay Blot Assays und Bindungsstudien in Lösung konnte auch Aktin als ein Interaktionspartner von eIF-5A identifiziert werden. Durch Immunogold Elektronenmikroskopie konnte eindeutig gezeigt werden, daß es sich um Kernaktin und nicht um eine cytoplasmatische Kontamination handelt, da Aktin spezifisch an den nucleoplasmatischen Kernporenkomplex assoziierten Filamenten lokalisiert.

Kerne von Amphibienoocyten enthalten große Mengen an  $\beta$ - und  $\gamma$ -Aktin, hauptsächlich in einer löslichen, d.h. unpolymerisierten oder oligomeren Form (Scheer et al., 1984; Ankenbauer et al., 1989; Gonsior et al., 1999). Es ist mittlerweile akzeptiert, daß Aktin nicht nur in Oocytenkernen sondern auch in Interphasekernen somatischer Zellen vorkommt (Scheer et al., 1984; Sahlas et al., 1993; Gonsior et al., 1999; Rando et al., 2000). Aufgrund seiner Menge und seines weitverbreiteten Vorkommens ist es sehr wahrscheinlich, daß Kernaktin in spezifische Kernprozesse involviert ist, die jedoch nicht notwendigerweise von einer Filamentbildung abhängen. Neben anderen Funktionen (Gonsior et al., 1999; Rando et

al., 2000) wurde Kernaktin eine Rolle bei der Transkription zellulärer und viraler Proteine (Egly et al., 1984; Scheer et al., 1984; Burke et al., 1998) sowie bei der Chromatinbildung (Zhao et al., 1998) zugesprochen. Basierend auf den Mikroinjektionsexperimenten, die in dieser Arbeit mit Antikörpern gegen Aktin, sowie verschiedenen Aktin-bindenden Proteinen durchgeführt wurden, scheint sich eine neue Rolle von Kernaktin bei Kernexportprozessen abzuzeichnen. Diese Daten werden auch unterstützt durch eine Studie, in denen die Autoren ebenfalls eine Rolle von Kernaktin beim Rev-vermittelten Export von HIV-1 prä-mRNA aufzeigen (Kimura et al., 2000). Allerdings wurde in dieser Studie eine filamentäre Form von Aktin gefunden, die an Kernexportprozessen beteiligt sein soll, während in der vorliegenden Arbeit eine oligomere Form identifiziert wurde (s.u.). Im Moment ist noch nicht ersichtlich ob Kernaktin ein genereller Faktor ist, der am zellulären Export beteiligt ist. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß Kernaktin zumindest in zwei unabhängigen Exportwegen involviert ist. Zum einen im Rev-vermittelten RNA Export und im Kernexport des PKI-NES, die beide über den generellen Exportrezeptor CRM1/exportin1 gehen und zum anderen im CRM1/exportin1 unabhängigen Export der CTE RNA, der von TAP vermittelt wird. Da der TAP-abhängige Exportweg auch von den meisten zellulären mRNAs benutzt wird (Grüter et al., 1998; Braun et al., 1999; Görlich & Kutay, 1999; Nakielny & Dreyfuss, 1999), ist es sehr wahrscheinlich, daß Aktin auch eine Rolle im zellulären mRNA Exportweg spielt.

Da der Effekt einer Exportinhibition sowohl in *Xenopus* Oocyten als auch in somatischen Zellen und mit zwei verschiedenen Ansätzen, d.h. zum einen mit Aktin-Antikörpern und mit Aktin-bindenden Proteinen beobachtet wurde, kann man davon ausgehen, daß der Effekt durch eine direkte Inaktivierung des Kernaktins entstanden ist und nicht etwa durch indirekte Effekte wie etwa Präzipitation des Kernaktins. Da der Kernimport nicht beeinflusst wurde, kann man auch davon ausgehen, daß der injizierte Antikörper keine unspezifische sterische Inhibition des Transportkomplexes verursacht hat.

Es gibt verschiedene Hinweise darauf, daß eine unpolymerisierte oder oligomere Form von Kernaktin anstelle von Aktinfilamenten in den Kernexport involviert ist. Zum einen liegt, wie schon erwähnt, das meiste Kernaktin in einer löslichen Form vor. Zum anderen kann man Kerne von Amphibien Oocyten und somatischen Zellen unter normalen Bedingungen, d.h. ohne experimentelle Manipulationen, nicht mit Phalloidin, einem spezifischen Marker für Aktin-Filamente, anfärben (Sahlas et al., 1993; Gonsior et al., 1999). Des Weiteren wurde für die Experimente der anti-Aktin Antikörper 2G2 benutzt, der keine nativen Aktinfilamente

erkennt, sondern selektiv für ein spezifisches Konformationsstadium von Aktin ist (vermutlich Aktin-Dimere), das hauptsächlich im Kern vorliegt (Gonsior et al., 1999).

Deutliche Hinweise darauf, daß nicht Aktinfilamente involviert sind, liefern vor allem die Experimente mit den beiden Aktin-bindenden Drogen Swinholide A und Latrunculin B. Swinholide A zerstört Aktin-Filamente und stabilisiert Aktin-Dimere (Bubb et al., 1995). Mikroinjektion von Swinholide A hat keinen Einfluß auf den Kernexport der untersuchten Substrate. Diese Ergebnisse beweisen, daß weder die Abwesenheit von Aktin-Filamenten noch ein Anstieg des G-Aktin Levels die Exportwege beeinflusst. Mikroinjektion von Latrunculin B dagegen, daß Aktin-Monomere blockiert und ihre Polymerisation verhindert (Coue et al., 1987), führt zu einer Inhibition des Kernexportes. Diese gegensätzlichen Effekte von Swinholide A und Latrunculin B beweisen, daß Aktin-Dimere funktionell im Kernexport involviert sind.

Um die Rolle des Kernaktin bei Kernexportprozessen besser zu verstehen, ist es von großer Bedeutung Kernaktin-bindende Proteine zu identifizieren. Immunpräzipitations-Analysen haben bereits zur Identifikation der beiden Nucleoporine CAN/Nup214 und Nup62 geführt, von denen bereits bekannt ist, daß sie funktionell an Exportprozessen beteiligt sind (Fornerod et al., 1997b; Ullman et al., 1999; Nakielny et al., 1999). Diese Analysen haben jedoch auch zu einer weiteren interessanten Entdeckung geführt. In Anwesenheit der Droge Latrunculin B, durch die bereits der Export inhibiert werden konnte, ließ sich ein Aktin-bindendes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 98kDa nicht mehr präzipitieren. Dies läßt die Vermutung zu, daß dieses Protein funktionell an den Aktin-abhängigen Kernexportprozessen beteiligt ist. Zur Zeit werden dieses und weitere, nicht identifizierte Kernaktin-bindende Proteine sequenziert, um näheren Aufschluß über die Rolle von Kernaktin zu erhalten.

Auch wenn noch viele Fragen bezüglich der Funktion von Kernaktin offen sind, zeigen die Ergebnisse doch eindeutig, daß Kernaktin und zwar eine monomere oder oligomere Form von Kernaktin funktionell in Kernexportprozessen involviert ist.

## 6. Zusammenfassung

Der bidirektionale Transport von Makromolekülen zwischen Kern und Cytoplasma ist ein hoch selektiver, Energie-abhängiger Prozeß. Eine Familie von Transporterproteinen, die als Importine oder Exportine bezeichnet werden, vermitteln die Translokation von Proteinen und RNAs über den Kernporenkomplex. Im Gegensatz zum Kernimport, ist der Kernexport bis heute noch kaum verstanden. Der zur Zeit am Besten untersuchte, spezifische mRNA Exportfaktor ist das Rev Protein von HIV-1. Rev ist ein nucleocytoplasmatisches Shuttle-Protein, welches direkt an die Rev Response Element (RRE) RNA-Zielsequenz bindet, die in allen ungespleißten oder teilweise gespleißten viralen mRNAs vorhanden ist. Der Kernexport von Rev wird durch eine Aktivierungsdomäne vermittelt, die aus 4 spezifisch angeordneten Leucinen besteht und damit ein prototypisches Kernexportsignal (NES) bildet. Es konnte gezeigt werden, daß der Exportrezeptor CRM1/exportin1 generell den Export solcher Rev-ähnlichen, Leucin-reichen Kernexportsignale vermittelt. Untersuchungen der Rev Funktion haben jedoch zur Identifikation eines weiteren zellulären Proteins geführt, dem eukaryotischen Initiationsfaktor 5A (eIF-5A).

In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, daß eIF-5A ein essentieller Faktor für den Rev-vermittelten RNA Export, nicht jedoch für den CTE-vermittelten RNA Export des Mason-Pfizer Monkey Virus ist. Mikroinjektionen von eIF-5A-Antikörpern und der eIF-5A-M14 Mutante in Kerne von *Xenopus* Oocyten, sowie Bindungsstudien in Lösung haben gezeigt, daß eIF-5A als ein Adapterprotein fungiert, das upstream des generellen Exportrezeptors CRM1/exportin1 wirkt. eIF-5A bindet dabei an das Rev-NES und vermittelt dadurch eine effiziente Bindung des Rev/RNA Komplexes an CRM1/exportin1, wodurch der effiziente Export dieses Komplexes ermöglicht wird.

Da die zelluläre Funktion von eIF-5A noch unbekannt war, wurden Overlay Blot Assays auf *Xenopus* Oocytenkernen durchgeführt, um Kernproteine zu finden, die mit eIF-5A interagieren. Dies führte zur Identifikation des Transkriptionsfaktors TFIIIA als einen Bindungspartner von eIF-5A. TFIIIA ist ein Exportfaktor für die Oocyten-Typ 5S rRNA in Amphibien Oocyten. Aufgrund einer Analyse dieses RNA Exportweges konnte nun gezeigt werden, daß eIF-5A auch in diesem TFIIIA-vermittelten Exportweg der 5S rRNA als Adapter wirkt. Dabei verbindet eIF-5A das Leucin-reiche NES des TFIIIA mit dem Exportrezeptor CRM1/exportin1, wodurch der Export des TFIIIA/5S rRNA-Komplexes vermittelt wird.

Eine weitere zelluläre Funktion von eIF-5A konnte beim Export der CD83 mRNA in Dendritischen Zellen gefunden werden. Es konnte gezeigt werden, daß der Export der CD83 mRNA durch das RNA-bindende Protein HuR vermittelt wird und über den generellen Exportrezeptor CRM1/exportin1 vermittelt wird. Durch APRIL, einem Liganden von HuR, der ein Rev-ähnliches, Leucin-reiches NES besitzt, wird dabei die Bindung an CRM1/exportin1 vermittelt. Des weiteren konnte gezeigt werden, daß eIF-5A an diesem RNA Export beteiligt ist. Wie auch beim Rev-vermittelten RRE RNA Export und dem TFIIIA-vermittelten 5S rRNA Export wirkt eIF-5A auch hier als ein Adapter, der das NES des HuR-Liganden APRIL mit CRM1/exportin1 verbindet, wodurch der Export des CD83 mRNA/HuR/APRIL Komplexes stattfinden kann.

eIF-5A scheint also in der Tat ein Exportfaktor zu sein, der spezifisch, vielleicht sogar Gewebe-spezifisch am Export ganz bestimmter RNAs beteiligt ist, wie am Export der Oocyten-Typ 5S rRNA, der für Amphibien Oocyten spezifisch ist, oder am Export der CD83 mRNA, der für Dendritische Zellen spezifisch ist.

Neben TFIIIA und verschiedenen Nucleoporinen, konnte Kernaktin als ein weiterer Bindungspartner von eIF-5A identifiziert werden. Es wurde bereits gezeigt, daß Kernaktin an den Kernporenkomplex-assoziierten, nucleoplasmatischen Filamenten angereichert und an mehreren Exportwegen beteiligt ist.

In dieser Arbeit durchgeführte Mikroinjektionsexperimente mit Antikörpern gegen Aktin sowie verschiedenen Aktin-bindenden Drogen konnten zeigen, daß Kernaktin scheinbar generell in Exportprozesse involviert ist. In den Kern injizierte Antikörper gegen Aktin haben sowohl den Rev-vermittelten und den CTE-vermittelten viralen RNA Export, als auch den Export des zellulären Proteins PKI inhibiert. Mit Hilfe verschiedener Aktin-bindender Proteine (Latrunculin B und Swinholide A) konnte gezeigt werden, daß eine lösliche oder oligomere Form, nicht jedoch Aktinfilamente, funktionell an Kernexportprozessen beteiligt ist. Durch die Analyse Kernaktin-bindender Proteine konnten bereits die beiden Nucleopore CAN/Nup214 und p62 als Bindungspartner identifiziert werden. Beide sind dafür bekannt, an Exportprozessen beteiligt zu sein. Außerdem ergaben sich höchst interessante Hinweise auf die Beteiligung eines, bis jetzt noch nicht identifizierten, Kernproteins mit einem Molekulargewicht von 98kDa am Aktin-vermittelten Kernexport. Die Identifikation weiterer Kernaktin-bindender Proteine ist daher von enormer Bedeutung, um die funktionelle Rolle von Kernaktin im Export zu klären.

## Summary

The bidirectional transport of macromolecules between nucleus and cytoplasm is an energy-dependent and highly selective process. A family of transporter proteins known as importins or exportins mediates the movement of proteins and RNAs across the NPCs. In contrast to nuclear import processes, the export of macromolecules is less well understood. To date, the most extensively investigated specific mRNA export factor is the Rev protein of HIV-1. Rev is a nucleocytoplasmic shuttle protein that directly binds to its RNA target sequence, the Rev response element (RRE) that is part of all unspliced or incompletely spliced viral mRNAs. The nuclear export of Rev is mediated by a distinct activation domain that contains 4 critically spaced leucine residues and constitutes a prototypic nuclear export signal (NES). It has been shown, that a target of such Rev-like, leucine-rich nuclear export signals is the general export receptor CRM1/exportin1. However, investigation of Rev function also led to the identification of another cellular protein, the eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A).

By microinjection of antibodies directed against eIF-5A and the eIF-5A mutant protein M14, as well as binding studies in solution, it was now demonstrated that eIF-5A is critically involved in the specific Rev mediated export of the RRE RNA but not in the CTE mediated export of Mason-Pfizer Monkey Virus. In fact, eIF-5A acts upstream of CRM1/exportin1 as an adapter by binding to the Rev-NES and mediating thereby efficient binding of this NES to CRM1/exportin1 leading to the export of the Rev/RNA complex.

Since the cellular function of eIF-5A was still unknown Overlay Blot Assays on *Xenopus* oocyte nuclei have been performed to identify nuclear proteins that interact with eIF-5A. This led to the identification of Transkription Factor IIIA (TFIIIA) as an eIF-5A binding partner. In amphibian oocytes TFIIIA is an export factor that mediates export of oocyte-type 5S rRNA. Analysis of this export pathway has now shown, that eIF-5A acts again as an adapter in this specific export pathway by mediating efficient binding of the TFIIIA-NES to the export receptor CRM1/exportin1 and thereby mediating efficient export of the TFIIIA/5S rRNA complex.

Another cellular function of eIF-5A could be identified in nuclear export of CD83 mRNA in Dendritic cells. It could be shown, that nuclear export of CD83 mRNA is mediated by the RNA-binding protein HuR and takes part via the general export receptor CRM1/exportin1. APRIL, a HuR ligand that contains a Rev-like, leucine-rich nuclear export signal is mediating the interaction of HuR with CRM1/exportin1. Here again eIF-5A is involved in this export

pathway by binding to APRIL and mediating efficient binding of the CD83 mRNA/HuR/APRIL complex to CRM1/exportin1.

Apparently eIF-5A is an export factor that is involved in a very specific, maybe tissue specific, RNA export pathway of very special RNAs like the export of oocyte-type 5S rRNA that is specific for amphibian oocytes or like the export of CD83 mRNA that is specific for Dendritic cells.

Beside TFIIIA and several nucleoporins, actin has been identified as another eIF-5A binding partner. It has already been shown, that nuclear actin accumulates at the nuclear pore complex associated nucleoplasmic fibrils and is involved in several nuclear export processes. By microinjection of antibodies directed against actin and several actin-binding drugs it was now shown that nuclear actin seems to be a general export factor. Microinjection of actin-antibodies into nuclei of *Xenopus* oocytes clearly inhibited not only Rev mediated RRE RNA export and CTE mediated RNA export but also export of PKI. By using different actin binding drugs (Latrunculin B and Swinholide A) evidence has been presented that a soluble or oligomeric form of nuclear actin rather than actin filaments participate in several nuclear export processes.

By analysis of nuclear actin binding proteins the nucleoporins CAN/Nup214 and p62, both known to be involved in nuclear export, have been identified as interaction partners of nuclear actin.

This experiment also presented very interesting indications about another not yet identified protein that could be involved in the actin mediated nuclear export.

Identification of other nuclear actin binding partners is of course of high priority to clarify the mode of action of nuclear actin especially regarding its role in nuclear export.

## 7. Abkürzungen

®	registered
™	Trademark
∅	Durchmesser
A	Ampère
Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
APRIL	acidic protein rich in leucin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARE	Au-rich element
ATP	Adenosin-Triphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
Bis	N,N'-Methylendiacylamid
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
bzw	beziehungsweise
ca	circa
CAS	cellular apoptosis susceptibility protein
CBC	Cap-bindender Komplex (cap binding complex)
CBP	Cap binding protein
cDNA	copy DNA
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
CRM1	chromosome maintenance region protein
CTE	constitutive transport element
DC	Dendritische Zellen
ddNTP	Dideoxy-Nukleosid-Triphosphat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
dNTP	Deoxy-Nukleosid-Triphosphat



---

ds	double stranded
DTT	Dithiotreitol
E	Extinktion
E.coli	Escherichia coli
ECL	enhanced chemical luminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF-5A	eucaryotic translation initiation factor 5A
ELAV	embryonic lethal abnormal vision
EM	Elektronenmikroskop
ERG	early response gene
FCS	Fötale Kälberserum (fetal calf serum)
g	Gramm
GAP	GTPase activating protein
GDP	Guanosin-Diphosphat
GEF	GDP-GTP exchange factor
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunde
HIV-1	human immunodeficiency virus type 1
HMG	high mobility group
hnRNP	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein
HNS	HuR nucleocytoplasmic shuttling sequence
HuR	Hu RNA binding protein
IBB	importin $\beta$ binding
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP	Isoelektrischer Punkt
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
Kap.	Kapitel
Kap	Karyopherin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KNS	hnRNP K nucleocytoplasmic shuttling sequence
L/l	Liter

---

Lap	lamina associated polypeptide
M	Mol
M <sub>r</sub>	relative Molekularmasse
m <sub>3</sub> G	Trimethyl-Guanosin
m <sup>7</sup> G	7-Monomethyl-Guanosin
mA	Milliampére
mAb	monoklonaler Antikörper (monoclonal antibody)
MDa	Megadalton
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
mM	Millimolar
MPMV	Mason-Pfizer monkey virus
mRNA	messenger RNA
µm	Mikrometer
µg	Mikrogramm
N-Terminus	Amino-Terminus
NBT	p-Nitrotetrazoliumblau
NES	Kernexportsignal (nuclear export signal)
NLS	Kernlokalisierungssignal (nuclear localization signal)
nm	Nanometer
NPC	Kernporenkomplex (nuclear pore complex)
NS-Signale	nucleocytoplasmic shuttle signal
NTF	nuclear transport factor
NTP	Nukleosid-Triphosphat
Nup	Nucleoporin
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyd
PKI	Protein Kinase Inhibitor
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

---

Pol	Polymerase
Pom	Porenmembran Proteine (pore membrane proteins)
Ran	Ras-related nuclear protein
RanBP	Ran binding protein
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNAsin	RNase-Inhibitor
RRE (HIV-1)	Rev response element
RRE (HuR)	RNA recognition element
rRNA	ribosomale RNA
tRNA	transfer RNA
RHA	RNA helicase A
RNP	Ribonukloprotein Partikel
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription PCR
S	Svedberg-Einheit
sec	Sekunde
ss	single stranded
SDS	Natriumdodecylsulfat
snRNA	siehe U snRNA
Stat	signal transducer and activator of transcription
SV	Simian Virus
Tab	Tabelle
TAP	Tip associated protein
TBE	Tris-Bor-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween-20
TBST++	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween-20 und Triton X-100
TEMED	N,N,N',N',Tetramethyldiamin
TFIIIA	Transkriptions Faktor IIIA
TKM	Tris-Kalium-Magnesium-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	Transformation and storage solution

Tween-20	Polyoxyethylen-Sorbitan Monolaurat
U	Einheit
ÜNK	Übernachtkultur
U snRNA	Uracil-reiche kleine nukleäre RNA (small nuclear RNA)
UTR	untranslated region
UV	Ultraviolett
V	Volt
WGA	wheat germ agglutinin
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
xg	fache Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel

Aminosäuren wurden im Ein-Buchstaben- oder Drei-Buchstaben-Code abgekürzt:

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Iso	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

## 8. Literatur

- Allen, T.D., Cronshaw, J.M., Bagley, S., Kiseleva, E. and Goldberg, M.W.** (2000). The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. *J Cell Sci* **113**, 1651-1659.
- Allison, L.A., North, M.T. and Neville, L.A.** (1995). Differential binding of oocyte-type and somatic-type 5S rRNA to TFIIIA and ribosomal protein L5 in *Xenopus* oocytes: Specialization for storage versus mobilization. *Dev Biol* **168**, 284-295.
- Allison, L.A., North, M.T., Murdoch, K.J., Romaiuk, P.J., Deschamps, S. and Le Marie, M.** (1993). Structural requirements of 5S rRNA for nuclear transport, 7S ribonucleoprotein particle assembly, and 60S ribosomal subunit assembly in *Xenopus* oocytes. *Mol Cell Biol* **13**, 6819-6831.
- Allison, L.A., Romaniuk, P.J. and Bakken, A.H.** (1991). RNA-protein interactions of stored 5S RNA with TFIIIA and ribosomal protein L5 during *Xenopus* oogenesis. *Dev Biol* **144**, 129-144.
- Antic, D. and Keene, J.D.** (1997). Embryonic lethal abnormal visual RNA-binding proteins involved in growth, differentiation, and posttranscriptional gene expression. *Am J Hum Genet* **61**, 273-278.
- Arts, G.J. Kuersten, S., Romby, P., Ehresmann, B. and Mattaj, I.W.** (1998b). The role of exportin-t in selective nuclear export of mature tRNAs. *EMBO J* **17**, 7430-7441.
- Arts, G.J., Fornerod, M. and Mattaj, I.W.** (1998a). Identification of a nuclear export receptor for tRNA. *Curr Biol* **8**, 305-314.
- Askjaer, P., Bachi, A., Wilm, M., Bischoff, F.R., Weeks, D., Ogniewski, V., Ohno, M., Niehrs, C., Kjems, J., Mattaj, I.W. and Fornerod, M.** (1999). RanGTP-regulated interactions of Crm1 with nucleoporins and a shuttling DEAD-box helicase. *Mol Cell Biol* **19**, 6276-6285.
- Austyn, J.M.** (1998). Dendritic cells. *Curr Opin Hematol* **5**, 3-15.
- Bachi, A., Braun, I.C., Rodrigues, J.P., Pante, N., Ribbeck, K., Von Kobbe, C., Kutay, U., Wilm, M., Görlich, D., Carmo-Fonseca, M. and Izaurralde, E.** (2000). The C-terminal domain of TAP interacts with the nuclear pore complex and promotes export of specific CTE-bearing RNA substrates. *RNA J* **6**, 136-158.
- Banchereau, J. and Steinman, R.M.** (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature (Lond)* **392**, 245-252.
- Banerjee, A.K.** (1980). 5'-terminal cap structure in eukaryotic messenger ribonucleic acids. *Microbiol Rev* **44**, 175-205.
- Banerji, S.S., Berg, L. and Morimoto, R.I.** (1986). Transcription and post-transcriptional regulation of avian HSP70 gene expression. *J Biol Chem* **261**, 15740-15745.
- Bangs, P., Burke, B., Powers, C., Craig, R., Purohit, A. and Doxsey, S.** (1998). Functional analysis of Tpr: identification of nuclear pore complex association and nuclear localization domain and a role in mRNA export. *J Cell Biol* **143**, 1801-1812.
- Bastos, R., de Pouplana, L.R., Enarson, M., Bodoor, K. and Burke, B.** (1997). Nup84, a novel nucleoporin that is associated with CAN/Nup214 on the cytoplasmic face of the nuclear pore complex. *J Cell Biol* **137**, 989-1000.
- Bataille, N., Helser, T. and Fried, H.M.** (1990). Cytoplasmic transport of ribosomal subunits microinjected into the *Xenopus laevis* oocyte nucleus: a generalized, facilitated process. *J Cell Biol* **111**, 1571-1582.
- Bayliss, R., Corbett, A.H. and Stewart, M.** (2000). The molecular mechanism of transport of macromolecules through nuclear pore complexes. *Traffic* **1**, 448-456.

- Bayliss, R., Ribbeck, K., Akin, D., Kent, H.M., Feldherr, C.M., Görlich, D. and Stewart, M.** (1999). Interaction between NTF2 and xFxFG-containing nucleoporins is required to mediate nuclear import of RanGDP. *J Mol Biol* **293**, 579-593.
- Bear, J., Tan, W., Zolotukhin, A.S., Taberner, C., Hudson, E.A. and Felber, B.K.** (1999). Identification of novel import and export signals of human TAP, the protein that binds to the constitutive transport element of the type D retrovirus mRNAs. *Mol Cell Biol* **19**, 6306-6317.
- Begitt, A., Meyer, T., van Rossum, M. and Vinkemeier, U.** (2000). Nucleocytoplasmic translocation of Stat1 is regulated by a leucine-rich export signal in the coiled-coil domain. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 10418-10423.
- Benne, R. and Hershey, J.W.** (1978). The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. *J Biol Chem* **253**, 3078-3087.
- Bevec, D., Jaksche, H., Oft, M., Wöhl, T., Himmelspach, M., Pacher, A., Schebesta, M., Koettnitz, K., Dobrovnik, M., Csonga, R., Lottspeich, F. and Hauber, J.** (1996). *Science* **271**, 1858-1860.
- Bevec, D., Klier, H., Holter, W., Tschachler, E., Valent, P., Lottspeich, F., Baumruker, T. and Hauber, J.** (1994). Induced gene expression of the hypusine-containing protein eukaryotic initiation factor 5A in activated human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 10829-10833.
- Birckbichler, P.J., Orr, G.R., Patterson Jr., M.K., Conway, E. and Carter, H.A.** (1981). Enhanced transglutaminase activity in transformed human lung fibroblast cells after exposure to sodium butyrate. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**, 5005-5008.
- Blum H., Beier, H. and Gross, H.J.** (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNAs and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- Boer, J.M., van Deursen, J.M.A., Huib, H.C., Franssen, J.A.M. and Grosveld, G.C.** (1997). The nucleoporin CAN/Nup214 binds to both the cytoplasmic and the nucleoplasmic sides of the nuclear pore complex in overexpressing cells. *Exp Cell Res* **232**, 182-185.
- Bogerd, H.P., Echarri, A., Ross, T.M. and Cullen, B.R.** (1998). Inhibition of human immunodeficiency virus Rev and human T-cell leukemia virus Rex function, but not Mason-Pfizer monkey virus constitutive transport element activity, by a mutant human nucleoporin targeted to CRM1. *J Virol* **72**, 8627-8635.
- Bonifaci, N., Moroianu, J., Radu, A. and Blobel, G.** (1995). Karyopherin beta2 mediates nuclear import of a mRNA binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 5055-5060.
- Bonner, W.M.** (1978). Protein migration and accumulation in nuclei. In *The Cell nucleus* **4**, ed. Busch H., New York: Academic Press, 97-148.
- Bray, M., Prasad, S., Dubay, J.W., Hunter, E. and Jeang, K.-T.** (1994). A small element from the Mason-Pfizer monkey virus genome makes human immunodeficiency virus type 1 expression and replication Rev-independent. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 1256-1260.
- Brennan, C.M. and Steitz, J.A.** (2001). HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci* **58**, 266-277.
- Brennan, C.M., Gallouzi, I.E. and Steitz, J.A.** (2000). Protein ligands to HuR modulate its interaction with target mRNAs in vivo. *J Cell Biol* **151**, 1-14.
- Brice, P.C., Kelley, A.C. and Butler, P.J.** (1999). Sensitive in vitro analysis of HIV-1 Rev multimerization. *Nucleic Acids Res* **27**, 2080-2085.
- Bubb, M.R., Spector, I., Bershadsky, A.D. and Korn, E.D.** (1995). Swinholide A is a microfilament disrupting marine toxin that stabilizes actin dimers and severs actin filaments. *J Biol Chem* **270**, 3463-3466.

- Chang, D.D. and Sharp, P.A.** (1989). Regulation by HIV Rev depends upon recognition of splice sites. *Cell* **59**, 789-795.
- Chen, C.Y. and Shyu, A.B.** (1995). AU-rich elements: Characterisation and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci* **20**, 465-470.
- Chen, T.H., Brody, J.R., Romantsev, F.E., Yu, J.G., Kayler, A.E., Voneiff, E., Kuhajda, F.P. and Pasternack, G.R.** (1996). Structure of pp32, an acidic nuclear protein which inhibits oncogene-induced formation of transformed foci. *Mol Biol Cell* **7**, 2045-2056.
- Chi, N.C., Adam, E.J. and Adam, S.A.** (1995). Sequence and characterization of cytoplasmic nuclear import factor p97. *J Cell Biol* **130**, 265-274.
- Chung, C.T., Niemela, S.L. and Miller, R.H.** (1989). One-step preparation of competent E.coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 2172-2175.
- Clark, T.G. and Merriam, R.W.** (1977). Diffusible and bound actin in nuclei of *Xenopus laevis* oocytes. *Cell* **12**, 883-891.
- Clark, T.G. and Rosenbaum, J.L.** (1979). An actin filament matrix in hand-isolated nuclei of *X. laevis* oocytes. *Cell* **18**, 1101-1108.
- Cochrane, A.W., Kramer, R., Ruben, S., Levine, J. and Rosen, C.A.** (1989). The human immunodeficiency virus rev protein is a nuclear phosphoprotein. *Virology* **171**, 264-266.
- Cole, J.L., Gehman, J.D., Shafer, J.A. and Kuo, L.C.** (1993). Solution oligomerization of the Rev protein of HIV-1: Implications for function. *Biochemistry* **32**, 11769-11775.
- Cordes, V.C., Hase, M.E. and Müller, L.** (1998). Molecular segments of protein Tpr that confer nuclear targeting and association with the nuclear pore complex. *Exp Cell Res* **245**, 43-56.
- Cordes, V.K., Reidenbach, S., Rackwitz, H.R. and Franke, W.W.** (1997). Identification of protein p270/Tpr as a constitutive component of the nuclear pore complex-attached intranuclear filaments. *J Cell Biol* **136**, 515-529.
- Coue, M., Brenner, S.L., Spector, I. and Korn, E.D.** (1987). Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Lett* **213**, 316-318.
- Csonga, R., Ettmayer, P., Auer, M., Eckerskorn, C., Eder, J. and Klier, H.** (1996). Evaluation of the metal ion requirement of the human deoxyhypusylase from HeLa cells using a novel enzyme assay. *FEBS Lett* **380**, 209-214.
- Cullen, B.R.** (1998). Retroviruses as model systems for the study of nuclear RNA export pathways. *Virology* **249**, 203-210.
- Dabauvalle, M.-C., Benavente, R. and Chaly, N.** (1988). Monoclonal antibodies to a Mr 68000 pore complex glycoprotein interfere with nuclear protein uptake in *Xenopus* oocytes. *Chromosoma* **97**, 193-197.
- Dabauvalle, M.-C., Loos, K., Merkert, H. and Scheer, U.** (1991). Spontaneous assembly of pore complex-containing membranes ("annulate lamellae") in *Xenopus* egg extract in the absence of chromatin. *J Cell Biol* **112**, 1073-1082.
- Daigle, N., Beaudouin, J., Hartnell, L., Imreh, G., Hallberg, E., Lippincott-Schwartz, J. and Ellenberg, J.** (2001). Nuclear pore complexes form immobile networks and have a very low turnover in live mammalian cells. *J Cell Biol* **154**, 71-84.
- Daly, T.J., Cooks, K.S., Gray, G.S., Maione, T.E. and Rusche, J.R.** (1989). Specific binding of HIV-1 recombinant Rev protein to the Rev-responsive element in vitro. *Nature (Lond)* **342**, 816-819.
- Daly, T.J., Doten, R.C., Rennert, P., Auer, M., Jaksche, H., Donner, A., Fisk, G. and Rusche, J.R.** (1993a). Biochemical characterization of binding of multiple HIV-1 Rev monomeric proteins to the Rev responsive element. *Biochemistry* **32**, 10497-10505.

- Davis, L.I. and Blobel, G.** (1986). Identification and characterization of a nuclear pore complex protein. *Cell* **45**, 699-709.
- Davis, L.I. and Blobel, G.** (1987). Nuclear pore complex contains a family of glycoproteins that includes p62: Glycosylation through a previously unidentified cellular pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 7552-7556.
- DeBoni, U.** (1994). The interphase nucleus as a dynamic structure. *Int Rev Cytol* **150**, 149-171.
- Delphin, C., Guan, T., Melchior, F. and Gerace, L.** (1997). RanGTP targets p97 to RanBP2, a filamentous protein localized at the cytoplasmic periphery of the nuclear pore complex. *Mol Biol Cell* **8**, 2379-2390.
- DeMaria, C.T. and Brewer, G.** (1996). AUF1 binding affinity to A+U-rich elements correlates with rapid mRNA degradation. *J Biol Chem* **271**, 12179-12184.
- Denis, H. and le Maire, M.** (1983). Thesaurisomes, a novel kind of nucleoprotein particle. In *Subcellular Biochemistry* ed, D.B. Roodyn, 263-267, Plenum, N.Y.
- DeRobertis, E.M.** (1983). Nucleoplasmic segregation of proteins and RNAs. *Cell* **32**, 1021-1025.
- Deutscher, M.P.** (1995). tRNA processing nucleases. In *tRNA Structure, Biosynthesis, and Function*, ed D. Söll, U.L. RajBhandary, 5,51-65, Washington, DC: ASM Press.
- Dixon, L.K. and Ford, P.J.** (1982). Regulation of protein synthesis and accumulation during oogenesis in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* **93**, 478-497.
- Dono, R., James, D. and Zeller, R.** (1998). A GR-motif functions in nuclear accumulation of the large FGF-2 isoforms and interferes with mitogenic signalling. *Oncogene* **16**, 2151-2158.
- Doye, V. and Hurt, E.** (1997). From Nucleoporins to nuclear pore complexes. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 401-411.
- Dreyfuss, G., Matunis, M.J., Pinol-Roma, S. and Burd, C.G.** (1993). hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem* **62**, 289-321.
- Dworetzky, S.I. and Feldherr, C.M.** (1988). Translocation of RNA coated gold particles through the nuclear pores of oocytes. *J Cell Biol* **106**, 575-584.
- Egly, J.M., Miyamoto, N.G., Mancollin, V. and Chambon, P.** (1984). Is actin a transcription factor for RNA polymerase B? *EMBO J* **3**, 2363-2371.
- Elfgang, C., Rosorius, O., Hofer, L., Jaksche, H., Hauber, J. and Bevec, D.** (1999). Evidence for specific nucleocytoplasmic transport pathways used by leucine-rich nuclear export signals. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 6229-6234. *EMBO J* **20** (6), 1320-1330.
- Emermann, M., Vazeux, R. and Peden, K.** (1989). The *rev* gene product of the human immunodeficiency virus affects envelope-specific RNA localisation. *Cell* **57**, 1155-1165.
- Enarson, P., Enarson, M., Bastos, R. and Burke, B.** (1998). Amino-terminal sequences that direct nucleoporin Nup153 to the inner surface of the nuclear envelope. *Chromosoma* **107**, 228-236.
- Enekel, C., Blobel, G. and Rexach, M.** (1995). Identification of a yeast karyopherin heterodimer that targets import substrate to mammalian nuclear pore complexes. *J Biol Chem* **270**, 16499-16502.
- Engel, K., Kotlyarov, A. and Gaestel, M.** (1998). Leptomycin B-sensitive nuclear export of MAP-KAP kinase 2 is regulated by phosphorylation. *EMBO J* **17**, 3363-3371.
- Engelke, D.R., Ng, S.-Y., Shastry, B.S. and Roeder, R.** (1980). Specific interaction of a purified transcription factor with an internal control region of 5S RNA genes. *Cell* **19**, 717-728.



- Englmeier, L., Olivo, J.C. and Mattaj, I.W.** (1999). Receptor-mediated substrate localization through the nuclear pore complex without nucleotide triphosphate hydrolysis. *Curr Biol* **9**, 30-41.
- Ernst, R.K., Bray, M., Rekosh, D. and Hammarskjöld, M.L.** (1997b). Secondary structure and mutational analysis of the Mason-Pfizer monkey virus RNA constitutive transport element. *RNA* **3**, 210-222.
- Fahrenkrog, B., Aris, J.P., Hurt, E.C., Pante, N. and Aebi, U.** (2000a). Comparative localization of protein A tagged and endogenous yeast nuclear pore complex proteins by immunoelectron microscopy. *J Struct Biol* **129**, 295-305.
- Fahrenkrog, B., Hurt, E.C., Aebi, U. and Pante, N.** (1998). Molecular architecture of the yeast nuclear pore complex: localization of Nsp1p subcomplexes. *J Cell Biol* **143**, 577-588.
- Fahrenkrog, B., Stoffler, D. and Aebi, U.** (2001). Nuclear pore complex architecture and functional dynamics. *Curr Top Microbiol Immunol* **259**, 95-117.
- Fan, X.C. and Steitz, J.A.** (1998a). HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 15293-15298.
- Fan, X.C. and Steitz, J.A.** (1998). HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 15293-15298.
- Fan, X.C. and Steitz, J.A.** (1998b). Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. *EMBO J* **17**, 3448-3460.
- Felber, B.K., Hadzopoulou-Cladaras, M., Cladaras, C., Copeland, T. and Pavlakis, G.N.** (1989). Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 1495-1499.
- Feldherr, C.M., Kallenbach, E. and Schultz, N.** (1984). Movement of a karyophilic protein through the nuclear pores of oocytes. *J Cell Biol* **99**, 2216-2222.
- Fesus, L.** (1993). Biochemical events in naturally occurring forms of cell death. *FEBS Lett* **328**, 1-5.
- Finlay, D.R., Newmeyer, D.D., Price, T.M. and Forbes, D.J.** (1987). Inhibition of in vitro nuclear transport by a lectin that binds to nuclear pores. *J Cell Biol* **104**, 189-200.
- Finlay, D.R., Newmeyer, D.D., Price, T.M. and Forbes, D.J.** (1987). Inhibition of in vitro nuclear transport by a lectin that binds to nuclear pores. *J Cell Biol* **104**, 189-200.
- Fischer, R., Cordes, V.C. and Franke, W.W.** (1997). Sequence analysis of the nuclear pore complex protein in a lower metazoan: nucleoporin p62 of the coelenterate *Hydra vulgaris*. *Gene* **195**, 285-293.
- Fischer, U., Huber, J., Boelens, W.C., Mattaj, I.W. and Lührmann, R.** (1995). The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway that is used by specific cellular RNAs. *Cell* **82**, 475-483.
- Fischer, U., Meyer, S., Teufel, M., Heckel, C., Lührmann, R. and Rautmann, G.** (1994). Evidence that HIV-1 Rev directly promotes the nuclear export of unspliced RNA. *EMBO J* **13**, 4105-4112.
- Fischer, U., Pollard, V.W., Lührmann, R., Teufel, M., Michael, W.M., Dreyfuss, G. and Malim, M.H.** (1999). Rev-mediated nuclear export of RNA is dominant over nuclear retention and is coupled to the Ran-GTPase cycle. *Nucleic Acids Res* **27**, 4128-4134.
- Fornerod, M., Boer, J., Van Baal, S., Morreau, H. and Grosveld, G.** (1996). Interaction of cellular proteins with the leukemia specific fusion proteins DEK-CAN and SET-CAN and their normal counterpart, the nucleoporin CAN. *Oncogene* **13**, 1801-1808.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., Mattaj, I.W.** (1997b). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* **90**, 1051-1060.

- Fornerod, M., van Deursen, J., van Baal, S., Reynolds, A., Davis, D., Murti, K.G., Fransen, J. and Grosveld, G.** (1997a). The human homologue of yeast CRM1 is in a dynamic subcomplex with CAN/Nup214 and a novel nuclear pore component Nup88. *EMBO J* **16**, 807-816.
- Fridell, R.A., Fischer, U., Lührmann, R., Meyer, B.E., Meinkoth, J.L., Malim, M.H. and Cullen, B.R.** (1996). Amphibian transcription factor IIIA proteins contain a sequence element functionally equivalent to the nuclear export signal of human immunodeficiency virus type 1 Rev. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 2936-2940.
- Fröhlich, T., Risau, W. and Flamme, I.J.** (1998). Characterization of novel nuclear targeting and apoptosis-inducing domains in FAS associated factor 1. *J Cell Sci* **111**, 2352-2363.
- Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M. and Nishida, E.** (1997). CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* **390**, 308-311.
- Fukuda, M., Gotho, I., Gotho, Y. and Nishida, E.** (1996). Cytoplasmic localization of mitogen-activated protein kinase kinase directed by its NH<sub>2</sub>-terminal, leucine-rich short amino acid sequence, which acts as a nuclear export signal. *J Biol Chem* **271**, 20024-20028.
- Gajewski, A., Lourim, D. and Krohne, G.** (1996). An antibody against a glycosylated integral membrane protein of the *Xenopus laevis* nuclear pore complex: a tool for the study of pore complex membranes. *Eur J Cell Biol* **71**, 14-21.
- Gallouzi, I.-E., Brennan, C.M. and Steitz, J.A.** (2001). Protein ligands mediate the CRM1-dependent export of HuR in response to heat shock. *RNA* **7**, 1348-1361.
- Gallouzi, I.E., Brennan, C.M., Stenberg, M.G., Swanson, M.S., Eversole, A., Maizels, N. and Steitz, J.A.** (2000). HuR binding to cytoplasmic mRNA is perturbed by heat shock. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 3073-3078.
- Georgatos, S.D.** (1994). Towards an understanding of nuclear morphogenesis. *J Cell Biochem* **55**, 69-76.
- Gerase, I. and Foisner, R.** (1994). Integral membrane proteins and dynamic organisation of the nuclear envelope. *TIBS* **4**, 127-131.
- Gigliotti, S., Callaini, G., Andone, S., Riparbelli, M.G., Pernas-Alonso, R., Hoffmann, G., Grazani, F. and Malva, C.** (1998). Nup154, a new *Drosophila* gene essential for male and female gametogenesis is related to the Nup155 vertebrate nucleoporin gene. *J Cell Biol* **142**, 1195-1207.
- Ginsberg, A.M., King, B.O. and Roeder, R.G.** (1984). *Xenopus* 5S gene transcription factor, TFIIIA: Characterization of a cDNA clone and measurement of RNA levels throughout development. *Cell* **39**, 479-489.
- Gonsior, S.M., Platz, S., Buchmeier, S., Scheer, U., Jockusch, B.M. and Hinssen, H.** (1999). Conformational difference between nuclear and cytoplasmic actin as detected by monoclonal antibody. *J Cell Sci* **112**, 797-809.
- Good, P.J.** (1995). A conserved family of elav-like genes in vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 4557-4561.
- Görlich, D., Dabrowski, M., Bischoff, F.R., Kutay, U., Bork, P., Hartmann, E., Prehn, S. and Izaurralde, E.** (1997). A novel class of RanGTP binding proteins. *J Cell Biol* **138**, 65-80.
- Görlich, D., Henklein, P., Laskey, R.A. and Hartmann, E.** (1996). A 41 amino acid motif in importin- $\alpha$  confers binding to importin- $\beta$  and hence transit into the nucleus. *EMBO J* **15**, 1810-1817.

- Görlich, D., Kostka, S., Kraft, R., Dingwall, C., Laskey, R.A., Hartmann, E. and Prehn, S.** (1995). Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. *Curr Biol* **5**, 383-392.
- Görlich, D., Pante, N., Kutay, U., Aebi, U. and Bischoff, F.R.** (1996). Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *EMBO J* **15**, 5584-5594.
- Görlich, D., Prehn, S., Laskey, R.A. and Hartmann, E.** (1994). Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. *Cell* **79**, 767-778.
- Görlich, G. and Kutay, U.** (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Biol* **15**, 607-660.
- Gottlieb, E. and Steitz, J.A.** (1989). Function of the mammalian La protein: evidence for its action in transcription termination by RNA polymerase III. *EMBO J* **8**, 851-861.
- Gounon, P. and Karsenti, E.** (1981). Involvement of contractile proteins in the changes in consistency of oocyte nucleoplasm of the newt *Pleurodeles waltlii*. *J Cell Biol* **88**, 410-421.
- Grandi, P., Dang, T., Pante, N., Shevchenko, A., Mann, M., Forbes, D. and Hurt, E.** (1997). Nup93, a vertebrate homologue of yeast Nic96p, forms a complex with a novel 205-kDa protein and is required for correct nuclear pore assembly. *Mol Biol Cell* **8**, 2017-2038.
- Greber, U.F., Senior, A. and Gerace, L.** (1990). A major glycoprotein of the nuclear pore complex is a membrane-spanning polypeptide with a large luminal domain and a small cytoplasmic tail. *EMBO J* **9**, 1495-1502.
- Greenberg, C.S., Birckbichler, P.J. and Rice, R.H.** (1991). Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *FASEB J* **5**, 3071-3077.
- Grüter, P., Taberner, C., von Kobbe, K.C., Schmitt, C., Saavedra, C., Bachi, A., Wilm, M., Felber, B.K. and Izaurralde, E.** (1998). TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus. *Mol Cell* **1**, 649-659.
- Guan, T., Muller, S., Klier, G., Pante, N., Blevitt, J.M., Haner, M., Paschal, B., Aebi, U. and Gerace, L.** (1995). Structural analysis of the p62 complex, an assembly of O-linked glycoproteins that localizes near the central gated channel of the nuclear pore complex. *Mol Biol Cell* **6**, 1591-1603.
- Guddat, U., Bakken, A.H. and Pieler, T.** (1990). Protein-mediated nuclear export of RNA: 5S rRNA containing small RNPs in *Xenopus* oocytes. *Cell* **60**, 619-628.
- Hallberg, E., Wozniak, R.W. and Blobel, G.** (1993). An integral membrane protein of the pore membrane domain of the nuclear envelope contains a nucleoporin-like region. *J Cell Biol* **122**, 513-521.
- Hamm, J. and Mattaj, I.W.** (1990). Monomethylated cap structures facilitate RNA export from the nucleus. *Cell* **63**, 109-118.
- Hammarskjöld, M.-L.** (1997). Regulation of retroviral RNA export. *Semin Cell Dev Biol* **8**, 83-90.
- Hammarskjöld, M.-L., Heimer, J., Hammarskjöld, B., Sangwan, I., Albert, L. and Rekosh, D.** (1989). Regulation of human immunodeficiency virus *env* expression by the *rev* gene product. *J Virol* **63**, 1959-1966.
- Hammerschmid, M., Palmeri, D., Ruhl, M., Jacksche, H., Weichselbraun, I., Böhnlein, E., Malim, M.H. and Hauber, J.** (1994). Scanning mutagenesis of the arginine-rich region of human immunodeficiency virus type 1 Rev trans activator. *J Virol* **68**, 7329-7335.
- Hauber, J.** (2001). Nuclear export mediated by the Rev/Rex class of retroviral Trans-activator proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* **259**, 55-76.

- Heaphy, S., Dingwall, C., Ernberg, I., Gait, M.J., Green, S.M., Karn, J., Lowe, A.D., Singh, M. and Skinner, M.A.** (1990). HIV-1 regulator of virion expression (Rev) protein binds to an RNA stem-loop structure located within the Rev response element region. *Cell* **60**, 685-693.
- Heger, P., Lohmaier, J., Schneider, G., Schweimer, K. and Stauber, R.H.** (2001). Qualitative highly divergent nuclear export signals can regulate export by the competition for transport cofactors *in vivo*. *Traffic* **2**, 544-555.
- Herold, A., Truant, R., Wiegand, H. and Cullen, B.R.** (1998). Determination of the functional domain organization of the importin a nuclear import factor. *J Cell Biol* **143**, 309-318.
- Hock, R., Scheer, U. and Bustin, M.** (1998). Chromosomal proteins HMG-14 and HMG-17 are released from mitotic chromosomes and imported into the nucleus by active transport. *J Cell Biol* **143**, 1427-1436.
- Hodge, C.A., Colot, H.V., Stafford, P. and Cole, C.N.** (1999). Rat8p/Dbp5p is a shuttling transport factor that interacts with Rat7p/Nup159p and Gle1p and suppresses the mRNA export defect of xpo1-1 cells. *EMBO J* **18**, 5778-5788.
- Hofmann, W.** (1999) Kernexport von Proteinen mit Leucin-reichen NES *in vivo* und *in vitro*. *Diplomarbeit, Universität Würzburg*
- Hofmann, W., Reichart, B., Ewald, A., Müller, E., Schmitt, I., Stauber, R.H., Lottspeich, F., Jockusch, B.M., Scheer, U., Hauber, J. and Dabauvalle, M.-C.** (2001). Cofactor requirements for nuclear export of Rev Response element (RRE-) and Constitutive Transport Element (CTE-)containing retroviral RNAs: an unexpected role for actin. *J Cell Biol* **5**, 895-910.
- Honda, B.M. and Roeder, R.G.** (1980). Association of a 5S gene transcription factor with 5S rRNA and altered levels of the factor during cell differentiation, *Cell* **22**, 119-126.
- Hope, T.J., Huang, X., McDonald, D. and Parslow, T.G.** (1990). Steroid-receptor fusion of the human immunodeficiency virus type 1 Rev transactivator: mapping cryptic functions of the arginine rich motif. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 7787-7791.
- Hu, T. and Gerace, L.** (1998). cDNA cloning and analysis of the expression of nucleoporin p45. *Gene* **221**, 245-253.
- Hu, T., Guan, T. and Gerace, L.** (1996). Molecular and functional characterization of the p62 complex, an assembly of nuclear pore complex glycoproteins. *J Cell Biol* **134**, 589-601.
- Huber, J., Cronshagen, U., Kadokura, M., Marshallsay, C., Wada, T., Sekine, M., and Lührmann, R.** (1998). Snurportin 1, an m3G-cap-specific nuclear import receptor with a novel domain structure. *EMBO J* **17**, 4114-4126.
- Ikura, K., Suto, N. and Sasaki, R.** (1990). Activity and gene expression of transglutaminase in guinea pig liver during the postnatal growing phase. *FEBS Lett* **268**, 203-205.
- Imamoto, N., Shimamoto, T., Kose, S., Takao, T., Tachibana, T., Matsubae, M., Sekimoto, T., Shimonishi, Y. and Yoneda, Y.** (1995a). The nuclear pore-targeting complex binds to nuclear pores after association with a karyophile. *FEBS Lett* **368**, 415-419.
- Imamoto, N., Shimamoto, T., Takao, T., Tachibana, T., Kose, S., Matsubae, M., Sekimoto, T., Shimonishi, Y. and Yoneda, Y.** (1995b). In vivo evidence for involvement of a 58 kDa component of nuclear pore-targeting complex in nuclear protein import. *EMBO J* **14**, 3617-3626.
- Iovine, M.K., Watkins, L. and Wente, S.R.** (1995). The GLFG repetitive region of the nucleoporin Nup116p interacts with Kap95p, an essential yeast nuclear import factor. *J Cell Biol* **131**, 1699-1713.

- Ishidate, T., Yoshihara, S., Kawasaki, Y., Chandra Roy, B., Toyoshima, K. and Akiyama, T. (1997). Identification of a novel nuclear localization signal in Sam68. *FEBS Lett* **409**, 237-241.
- Izaurrealde, E. and Mattaj, I.W. (1992). Transport of RNA between nucleus and cytoplasm. *Semin Cell Biol* **3**, 279-288.
- Izaurrealde, E. and Mattaj, I.W. (1995). RNA export. *Cell* **81**, 153-159.
- Izaurrealde, E., Kutay, U., von Kobbe, C., Mattaj, I.W. and Görlich, D. (1997). The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *EMBO J* **16**, 6535-6547.
- Izaurrealde, E., Lewis, J., Gamberi, C., Jarmolowski, A., McGulgan, C. and Mattaj, I.W. (1995). A cap-binding protein complex mediating U snRNA export. *Nature* **376**, 709-712.
- Izaurrealde, E., Stepinski, J., Darzynkiewicz, E. and Mattaj, I.W. (1992). A cap binding protein that may mediate nuclear export of RNA polymerase II-transcribed RNAs. *J Cell Biol* **118**, 1287-1295.
- Jäkel, S. and Görlich, D. (1998). Importin b, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells. *EMBO J* **17**, 4491-4502.
- Jäkel, S., Albig, W., Kutay, U., Bischoff, F.R., Schwamborn, K., Doenecke, D. and Görlich, G. (1999). The importin b/importin7 heterodimer is a functional nuclear import receptor for histone H1. *EMBO J* **18**, 2411-2423.
- Jarmolowski, A., Boelens, W.C., Izaurrealde, E. and Mattaj, I.W. (1994). Nuclear export of different classes of RNA is mediated by specific factors. *J Cell Biol* **124**, 627-635.
- Joe, Y.A., Wolff, E.C. and Park, M.H. (1995). Cloning and expression of human deoxyhypusyl synthase cDNA. Structure-function studies with the recombinant enzyme and mutant proteins. *J Biol Chem* **270**, 22368-22392.
- Jullien, D., Görlich, D., Laemmli, U.K. and Adachi, Y. (1999). Nuclear import of RPA in *Xenopus* egg extract requires a novel protein XRIPalpha but not importin alpha. *EMBO J* **18**, 4348-4358.
- Junker, U., Bevec, D., Barske, C., Kalfoglou, C., Escaich, S., Dobrovnik, M., Hauber, J. and Böhnlein, E. (1996). Intracellular expression of cellular eIF-5A mutants inhibits HIV-1 replication in human T cells: a feasibility study. *Hum Gene Ther* **7**, 1861-1869.
- Kalderon, D., Richardson, W.D., Markham, A.F. and Smith, A.E. (1984). Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* **311**, 33-38.
- Kang, H.A. and Hershey, J.W.B. (1994). Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **269**, 3934-3940.
- Kang, H.A., Schwelberger, H.G. and Hershey, J.W.B. (1993). Effect of initiation factor eIF-5A depletion on cell proliferation and protein synthesis. In *Protein Synthesis and Targeting in Yeast*. NATO Series H: Cell Biol, ed. Brown, A.J.P., Tuite, M.F. and McCarthy, J.E.G., 123, Berlin, Germany: Springer Verlag.
- Kang, Y. and Cullen, B.R. (1999). The human TAP protein is a nuclear mRNA export factor that contains novel RNA-binding and nucleocytoplasmic transport sequences. *Genes Dev* **13**, 1126-1139.
- Kannagi, R., Teshigawara, K., Noro, N. and Masuda, T. (1982). Transglutaminase activity during the differentiation of macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **105**, 164-171.
- Kasper, L.H., Brindle, P.K., Schnabel, C.A., Pritchard, C.E.J., Cleary, M.L. and van Deursen, J.M.A. (1999). CREB binding protein interacts with nucleoporin-specific FG

- repeats that activate transcription and mediate NUP98-HOAX9 oncogenicity. *Mol Cell Biol* **19**, 764-776.
- Katahira, J., Strässer, K., Podtelejnikov, A., Mann, M., Jung, J.U. and Hurt, E.** (1999). The Mex67p-mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human. *EMBO J* **18**, 2593-2609.
- Kataoka, N., Ohno, M., Kangawa, K., Tokoro, Y. and Shimura, Y.** (1994). Cloning of a complementary DNA encoding an 80 kilodalton nuclear cap binding protein. *Nucleic Acids Res* **22**, 3861-3865.
- Kehlenbach, R.H., Dickmanns, A. Kehlenbach, A., Guan, T. and Gerace, L.** (1999). A role for Ran BP1 in the release of CRM1 from the nuclear pore complex in a terminal step of nuclear export. *J Cell Biol* **145**, 645-657.
- Kessel, R.G.** (1992). Annulate lamellae: a last frontier in cellular organelles. *Int Rev Cytol* **133**, 43-120.
- Khanna-Gupta, A. and Ware, V.C.** (1989). Nucleocytoplasmic transport of ribosomes in a eukaryotic system: Is there a facilitated transport process? *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 1791-1795.
- Kjems, J., Calnan, B.J., Frankel, A.D. and Sharp, P.A.** (1992). Specific binding of a basic peptide from HIV-1 Rev. *EMBO J* **11**, 1119-1129.
- Kleinschmidt, J.A. and Franke, W.W.** (1982). Soluble acidic complexes containing histones H3 and H4 in nuclei of *Xenopus laevis* oocytes. *Cell* **29**, 799-809.
- Klier, H., Csonga, R., JoAo, H.C., Eckerskorn, C., Auer, M., Lottspeich, F. and Eder, J.** (1995). Isolation and characterization of different isoforms of the hypusine-containing protein eIF-5A from HeLa cells. *Biochemistry* **34**, 14693-14702.
- Krämer, A. and Roeder, R.G.** (1983). The use of monoclonal antibodies for the characterization of a 5S gene-specific transcription factor (IIIa) from *Xenopus laevis*. *J Biol Chem* **258**, 11915-11923.
- Krämer, A., and Roeder, R.G.** (1983). The use of monoklonal antibodies for the characterization of a 5S gene-specific transcription factor (IIIa) from *Xenopus laevis*. *J Biol Chem* **258**, 11915-11923.
- Krohne, G. and Franke, W.W.** (1983). Proteins of pore complex-lamina structures form nuclei and nuclear membranes. *Methods Enzymol* **96J**, 597-608.
- Kruse, M., Rosorius, O., Krätzer, F., Bevec, D., Kuhnt, C., Steinkasserer, A., Schuler, G. and Hauber, J.** (2000). Inhibition of CD83 cell surface expression during dendritic cell maturation by interference with nuclear export of CD83 mRNA. *J Exp Med* **191**, 1581-1589.
- Kudo, N., Khochbin, S., Nishi, K., Kitano, K., Yanagida, M., Yoshida, M. and Horinouchi, S.** (1997). Molecular cloning and cell cycle-dependent expression of mammalian CRM1, a protein involved in nuclear export of proteins. *J Biol Chem* **272**, 29742-29751.
- Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E.P., Wolff, B., Yoshida, M. and Horinouchi, S.** (1999). Leptomycin B inactivates CRM1/exportin1 by covalent modification at a cystein residue in the central conserved region. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 9112-9117.
- Kudo, N., Wolff, B., Sekimoto, T., Schreiner, E.P., Yoneda, Y., Yanagida, M., Horinouchi, S. and Yoshida, M.** (1998). Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Exp Cell Res* **242**, 540-547.
- Kudo, N.S., Khochbin, K., Nishi, K., Kitano, M., Yanagida, M., Yoshida, M. and Horinouchi, S.** (1997). Molecular cloning and cell cycle-dependent expression of

- mammalian CRM1, a protein involved in nuclear export of proteins. *J Biol Chem* **272**, 29742-29751.
- Kutay, U., Lipowsky, G., Izaurralde, E., Bischoff, F.R., Schwarzmaier, P., Hartmann, E. and Görlich, D.** (1998). Identification of a tRNA-specific nuclear export receptor. *Mol Cell* **1**, 359-369.
- Kyhse-Anderson, J.** (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffertank for rapid transfer of proteins from polyacrylamid to nitrocellulose. *J Biochem Biophys* **10**, 203-209.
- Landford, R.E. and Butel, J.S.** (1984). Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen. *Cell* **37**, 801-813.
- Lechmann, M., Krooshoop, D.J.E.B., Dudziak, D., Kremmer, E., Kuhnt, C., Figdor, C.G., Schuler, G. and Steinkasserer, A.** (2001). The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell-mediated T-cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells. *J Exp Med*, in press.
- Legrain, P. and Rosbash, M.** (1989). Some cis- and trans-actin mutants for splicing target pre-mRNA to the cytoplasm. *Cell* **57**, 573-583.
- Lipowski, G., Bischoff, F.R., Izaurralde, E., Kutay, U. and Schafer, S.** (1999). Coordination of tRNA nuclear export with processing of tRNA. *RNA* **5**, 539-549.
- Lipowsky, G., Bischoff, F.R., Izaurralde, E., Kutay, U., Schafer, S., Gross, H.J., Beier, H. and Görlich, D.** (1999). Coordination of tRNA nuclear export with processing of tRNA. *RNA* **5**, 539-549.
- Lipowsky, G., Bischoff, F.R., Schwarzmaier, P., Kraft, R., Kostka, S., Hartmann, E., Kutay, U. and Görlich, D.** (2000). Exportin4: a mediator of a novel nuclear export pathway in higher eukaryotes. *EMBO J* **19**, 4362-4371.
- Lohka, M.J. and Masui, Y.** (1983). Formation in vitro of sperm pronuclei and mitotic chromosomes induced by amphibian ooplasmic components. *Science* **220**, 719-721.
- Lounsbury, K.M., Beddow, A.L. and Macara, I.G.** (1994). A family of proteins that stabilize the Ran/TC4 GTPase in its GTP-bound conformation. *J Biol Chem* **269**, 11285-11290.
- Lührmann, R., Kastner, B. and Bach, M.** (1990). Structure of spliceosomal snRNPs and their role in pre-mRNA splicing. *Biochim Biophys Acta Gene Struct Express* **1087**, 265-292.
- Ma, W.J., Cheng, S., Campbell, C., Wright, A. and Fureaux, H.** (1996). Cloning and characterization of HuR, a ubiquitously expressed Elav-like protein. *J Biol Chem* **271**, 8144-8151.
- Macara, I.G.** (2001). Transport into and out of the nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**, 570-594.
- Madore, S.J., Tiley, L.S., Malim, M.H. and Cullen, B.R.** (1994). Sequence requirements for Rev multimerization in vivo. *Virology* **202**, 186-194.
- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L. Melchior, F.** (1997). A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* **88**, 97-107.
- Mairy, M. and Denis, H.** (1971). Recherches biochimiques sur l'oogenese.1. Synthese et accumulation du RNA pendant l'oogenese du crapaud sud-africain *Xenopus laevis*. *Dev Biol* **24**, 143-165.
- Malim, M.H., Hauber, J., Le, S.-Y., Maizel, J.V. and Cullen, B.R.** (1989a). The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* **338**, 254-257.

- Malim, M.H., Tiley, L.S., McCarn, D.F., Rusche, J.R., Hauber, J. and Cullen, B.R.** (1990). HIV-1 structural gene expression requires binding of the Rev trans-activator to its RNA target sequence. *Cell* **60**, 675-683.
- Marshallsay, C. and Lührmann, R.** (1994). In vitro nuclear import of snRNPs: cytosolic factors mediate m3G-cap dependence of U1 and U2 snRNP transport. *EMBO J* **13**, 222-231.
- Mattaj, I.W.** (1986). Cap trimethylation of UsnRNA is cytoplasmic and dependent on U snRNP protein binding. *Cell* **46**, 905-911.
- Mattaj, I.W.** (1988). U snRNP assembly and transport. In *structure and function of Major and Minor Small Nuclear Ribonucleoprotein Particles*, ed ML Birnstiel, pp 100-114, Berlin/Heidelberg/New York: Springer-Verlag.
- Mattaj, I.W. and Englmeier, L.** (1998). Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem* **67**, 265-306.
- Matunis, M.J., Couvatas, E. and Blobel, G.** (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of Ran-GTPase-activating protein between cytosol and nuclear pore complex. *J Cell Biol* **135**, 1457-1470.
- Maul, G.G.** (1977). The nuclear and the cytoplasmic pore complex: structure, dynamics, distribution, and evolution. *Int Rev Cytol* **6**, 75-186.
- Melchior, F. and Gerace, L.** (1998). Two-way trafficking with Ran. *Trends Cell Biol* **8**, 175-179.
- Mencinger, M., Panagopoulos, I., Contreras, J.A., Mitelman, F. and Aman, P.** (1998). Expression analysis and chromosomal mapping of a novel human gene, APRIL, encoding an acidic protein rich in leucines. *Biochim Biophys Acta* **1395**, 176-180.
- Michael, W.M.** (2000). Nucleocytoplasmic shuttling signals: two for the price of one. *Trends Cell Biol* **10**, 46-50.
- Michael, W.M. and Dreyfuss, G.** (1996). Distinct domains in ribosomal protein L5 mediate 5S rRNA binding and nucleolar localization. *J Biol Chem* **271**, 11571-11574.
- Michael, W.M., Choi, M. and Dreyfuss, G.** (1995). A nuclear export signal in hnRNP A1: A signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway. *Cell* **83**, 415-422.
- Michael, W.M., Eder, P.S. and Dreyfuss, G.** (1997). The K nuclear shuttling domain: A novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein. *EMBO J* **12**, 3587-3598.
- Moore, M.J., Query, C.C. and Sharp, P.A.** (1993). Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosome. In *The RNA World*, ed R.F. Gesteland, J.F. Atkins, **13**, 303-357. Plainview, N.Y., Cold Spring Harbor Lab.
- Moore, M.S. and Blobel, G.** (1993). The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature* **365**, 661-663.
- Moorefield, B. and Roeder, R.G.** (1994). Purification and characterization of human transcription factor IIIA. *J Biol Chem* **269**, 20857-20865.
- Moroianu, J., Blobel, G. and Radu, A.** (1997). RanGTP-mediated nuclear export of karyopherin  $\alpha$  involves its interaction with the nucleoporin Nup153. *Proc Natl Acad Sci* **94**, 9699-9704.
- Moroianu, J., Hijikata, M., Blobel, G. and Radu, A.** (1995). Mammalian karyopherin  $\alpha$  1 beta and  $\alpha$  2 beta heterodimers:  $\alpha$  1 or  $\alpha$  2 subunits binds nuclear localization signal and  $\beta$  subunit interacts with peptide repeat-containing nucleoporins. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 6532-6536.
- Murtaugh, M.P., Arend, W.P. and Davies, P.J.** (1984). Induction of tissue transglutaminase in human peripheral blood monocytes. *J Exp Med* **159**, 114-125.



- Nagoshi, E., Imamoto, N., Sato, R. and Yoneda, Y.** (1999). Nuclear import of sterol regulatory element-binding protein-2, a basic helix-loop-helix-leucine zipper (bHLH-Zip)-containing transcription factor, occurs through the direct interaction of importin b with HLH-Zip. *Mol Biol Cell* **10**, 2221-2233.
- Nakaoka, H., Perez, D.M., Baek, K.J., Das, T., Husain, A., Misono, K., Im, M. and Graham, R.M.** (1994). GH. a GTP-binding protein with transglutaminase activity and receptor signaling function. *Science* **264**, 1593-1596.
- Nakielny, S., Shaikh, S., Burke, B. and Dreyfuss, G.** (1999). Nup153 is an M9-containing mobile nucleoporin with a novel Ran-binding domain. *EMBO J* **18**, 1982-1995.
- Nakielny, S. and Dreyfuss, G.** (1998). Import and export of the nuclear protein import receptor transportin by a mechanism independent of GTP hydrolysis. *Curr Biol* **8**, 89-95.
- Nakielny, S., Fischer, U., Michael, W.M. and Dreyfuss, G.** (1997). RNA transport. *Annu Rev Neurosci* **20**, 269-301.
- Nehrbass, U., Rout, M.P., Maguire, G., Blobel, G. and Wozniak, R.W.** (1996). The yeast nucleoporin Nup188p interacts genetically and physically with the core structures of the nuclear pore complex. *J Cell Biol* **133**, 1153-1162.
- Newmeyer, D.D. and Forbes, D.J.** (1988). Nuclear import can be separated into distinct steps in vitro: nuclear pore binding and translocation. *Cell* **52**, 641-653.
- Newmeyer, D.D., Lucocq, J.M., Bürglin, T.R. and de Robertis, E.M.** (1986). Assembly in vitro of nuclei active in nuclear protein transport: ATP is required for nucleoplasmic accumulation. *EMBO J* **5**, 501-510.
- Newport, J.** (1987). Nuclear reconstitution in vitro: stages of assembly around protein-free DNA. *Cell* **48**, 205-217.
- O'Farrell, P.Z., Goodman, H.M. and O'Farrell, P.H.** (1977). High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* **12**, 1133-1141.
- Ohno, M., Fornerod, M. and Mattaj, I.W.** (1998). Nucleocytoplasmic transport: the last 200 nanometers. *Cell* **92**, 327-336.
- Ohno, M., Kataoka, N. and Shimura, Y.** (1990). A nuclear cap binding protein from HeLa cells. *Nucleic Acids Res* **18**, 6989-6995.
- Ohno, M., Segref, A., Bachi, A., Wilm, M. and Mattaj, I.W.** (2000). PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation. *Cell* **101**, 187-198.
- Ohtsubo, M., Okazaki, H. and Nishimoto, T.** (1989). The RCC1 protein, a regulator for the onset of chromosome condensation locates in the nucleus and binds to DNA. *J Cell Biol* **109**, 1389-1397.
- Ouchterlony Ö. and Nilsson, L.-A.** (1978). Immundiffusion and immunoelectrophoresis. In *Handbook of experimental immunology* ed. Weir, D.M., **1**, 19.1-19.44, Blackwell Sci Publ Lond.
- Ouchterlony, Ö. and Nilsson, L.-A.** (1978). Immundiffusion and immunoelectrophoresis. In *Handbook of experimental immunology* ed. Weir, D.M., Blackwell Sci Publ London, **1**, 19.1-19.44.
- Paine, P.L., Moore, L.C. and Horowitz, S.B.** (1975). Nuclear envelope permeability. *Nature* **13**, 109-114.
- Pante, N. and Aebi, U.** (1996). Molecular dissection of the nuclear pore complex. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **31**, 153-199.
- Parfenov, V.N., Davis, D.S., Pochukalina, G.N., Sample, C.E., Bugaeva, E.A. and Murti, K.G.** (1995). Nuclear actin filaments and their topological changes in frog oocytes. *Exp Cell Res* **217**, 385-394.

- Park, M.H.** (1989). The essential role of hypusine in eukaryotic translation initiation factor 4D (eIF-4D). *J Biol Chem* **264**, 18531-18535.
- Park, M.H., Wolff, E.C. and Folk, J.E.** (1993a). Hypusine: its posttranslational formation in eukaryotic initiation factor 5A and its potential role in cellular regulation. *BioFactors* **4**, 95-104.
- Park, M.H., Wolff, E.C. and Folk, J.E.** (1993b). Is hypusin essential for eukaryotic cell proliferation? *Trend Biochem Sci* **18**, 475-479.
- Park, M.K., D'Onofrio, M., Willingham, M.C. and Hanover, J.A.** (1987). A monoclonal antibody against a family of nuclear pore proteins (nucleoporins): O-linked *N*-acetylglucosamine is part of the immunodeterminant. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 6462-6466.
- Paschal, B.M. and Gerace, L.** (1995). Identification of NTF2, a cytosolic factor for nuclear import that interacts with nuclear pore complex protein p62. *J Cell Biol* **129**, 925-937.
- Pasquinelli, A.E., Ernst, R.K., Lund, E., Grimm, C., Zapp, M.L., Rekosh, D., Hammarskjöld, M.L. and Dahlberg, J.E.** (1997). The constitutive transport element (CTE) of Mason-Pfizer monkey virus (MPMV) accesses a cellular mRNA export pathway. *EMBO J* **16**, 7500-7510.
- Peng, S.S., Chen, C.Y., Xu, N. and Shyu, A.B.** (1998). RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein. *EMBO J* **17**, 3461-3470.
- Peng, X., Zhang, Y., Zhang, H., Graner, S., Williams, J.F., Levitt, M.L. and Lokshin, A.** (1999). Interactions of tissue transglutaminase with nuclear transport protein importin- $\alpha$ 3. *FEBS Lett* **446**, 35-39.
- Percipalle, P., Clarkson, W.D., Kent, H.M., Rhodes, D. and Stewart, M.** (1997). Molecular interactions between the importin alpha/beta heterodimer proteins involved in vertebrate nuclear protein import. *J Mol Biol* **266**, 722-732.
- Percipalle, P., Zhao, J., Pope, B., Weeds, A., Lindberg, U. and Daneholt, B.** (2001). Actin bound to the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein hrp36 is associated with Balbiani ring mRNA from the gene to polysomes. *J Cell Biol* **153**, 229-236.
- Piacentini, M.** (1995). Tissue transglutaminase: a candidate effector element of physiological cell death. *Curr Top Microbiol Immunol* **200**, 163-175.
- Picard, B. and Wegnez, M.** (1979). Isolation of a 7S particle from *Xenopus laevis* oocytes: A 5S RNA protein complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 241-245.
- Pinol-Roma, S. and Dreyfuss, G.** (1992). Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. *Nature* **355**, 730-732.
- Pinol-Roma, S. and Dreyfuss, G.** (1993). hnRNP proteins: localization and transport between the nucleus and the cytoplasm. *Trends Cell Biol* **3**, 151-155.
- Pinol-Roma, S., Choi, Y.D., Matunis, M.J. and Dreyfuss, G.** (1988). Immunopurification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles reveals an assortment of RNA-binding proteins. *Genes Dev* **2**, 215-227.
- Pollard, V.W. and Malim, M.H.** (1998). The HIV-1 Rev protein. *Annu Rev Microbiol* **52**, 491-532.
- Pollard, V.W., Michael, W.M., Nakielny, S., Siomi, M.C., Wang, F. and Dreyfuss, G.** (1996). A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. *Cell* **86**, 985-994.
- Powers, M.A., Forbes, D.J., Dahlberg, J.E. and Lund, E.** (1997). The vertebrate GLFG nucleoporin, Nup98, is an essential component of multiple RNA export pathways. *J Cell Biol* **136**, 241-250.
- Prechtel, A., Hofmann, W., Studtrucker, N., Langbein, I., Stülke, J., Dabauvalle, M.-C. and Hauber, J.** (2001). Identification of a novel HuR Response Element in the Coding Region of Human CD83 mRNA. (submitted)

- Pritchard, C.E.J., Fornerod, M., Kasper, L.H. and van Deursen, J.M.A.** (1999). RAE1 is a shuttling mRNA export factor that binds to a GLEBS-like NUP98 motif at the nuclear pore complex through multiple domains. *J Cell Biol* **145**, 237-253.
- Radu, A., Blobel, G. and Moore, M.S.** (1995). Identification of a protein complex that is required for nuclear protein import and mediates docking of import substrate to distinct nucleoporins. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 1769-1773.
- Rando, O.J., Zhao, K. and Crabtree, G.R.** (2000). Searching for a function for nuclear actin. *Trends Cell Biol* **10**, 92-97.
- Reichart, B.** (1998). Das Protein eIF-5A akkumuliert an den nucleoplasmatische Filamenten des Kernporenkomplexes und wird aktiv ins Cytoplasma exportiert. *Diplomarbeit, Universität Würzburg*
- Reis e Sousa, Sher, A. and Kaye, P.** (1999). The role of dendritic cells in induction and regulation of immunity to microbial infection. *Curr Opin Immunol* **11**, 392-399.
- Rexach, M. and Blobel, G.** (1995). Protein import into the nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell* **83**, 683-692.
- Ribbeck, K. and Görlich, G.** (2001). Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes.
- Rinke, J. and Steitz, J.A.** (1982). Precursor molecules of both human 5S ribosomal RNA and transfer RNAs are bound by cellular protein reactive with anti-La lupus antibodies. *Cell* **29**, 711-720.
- Robbins, J., Dilworth, S.M., Laskey, R.A. and Dingwall, C.** (1991). Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* **64**, 615-623.
- Rosorius, O., Heger, P., Stelz, G., Hirschmann, N., Hauber, J. and Stauber, R.H.** (1999a). Direct observation of nucleocytoplasmic transport by microinjection of GFP tagged proteins in living cells. *Biotechniques* **27**, 350-355.
- Rosorius, O., Reichart, B., Krätzer, F., Heger, P., Dabauvalle, M.-C. and Hauber, J.** (1999b). Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF-5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1. *J Cell Sci* **112**, 2369-2380.
- Rout, M.P., Aitchison, J.D., Suprapto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y. and Chait, B.T.** (2000). The yeast nuclear pore complex. Composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol* **148**, 635-652.
- Rout, M.P. and Wentz, S.R.** (1994). Pores for thought: nuclear pore complex proteins. *Trend Cell Biol* **4**, 357-365.
- Rudt, R. and Pieler, T.** (1996). Cytoplasmic retention and nuclear import of 5S ribosomal RNA containing RNPs. *EMBO J* **15**, 1383-1391.
- Ruhl, M., Himmelspach, M., Bahr, G.M., Hammerschmid, F., Jaksche, H., Wolff, B., Aschauer, H., Farrington, G.K., Probst, H., Bevec, D. and Hauber, J.** (1993). Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating trans-activation. *J Cell Biol* **123**, 1309-1320.
- Ryan, K.J. and Wentz, S.R.** (2000). The nuclear pore complex: a protein machine bridging the nucleus and cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 361-371.
- Saavedra, C., Felber, B.K. and Izaurralde, E.** (1997). The simian retrovirus-1 constitutive transport element, unlike the HIV-1 RRE, uses factors required for cellular mRNA export. *Curr Biol* **7**, 619-628.
- Sachdev, S., Hoffmann, A. and Hannink, M.** (1998). Nuclear localization of IkappaB alpha is mediated by the second ankyrin repeat: the IkappaB alpha ankyrin repeats define a novel class of cis-acting nuclear import sequences. *Mol Cell Biol* **18**, 2524-2534.

- Sadis, S., Hickey, E. and Weber, L.A.** (1988). Effect of heat shock on RNA metabolism in HeLa cells. *J Cell Physiol* **135**, 377-386.
- Sahlas, D.J., Milankov, K., Park, P.C. and DeBoni, U.** (1993). Distribution of snRNPs, splicing factor SC-35 and actin in interphase nuclei: immunocytochemical evidence for differential distribution during changes in functional states. *J Cell Sci* **105**, 347-357.
- Saitoh, H., Cooke, C.A., Burgess, W.H., Earnshaw, W.C. and Dasso, M.** (1996). Direct and indirect association of small GTPase ran with nuclear pore proteins and soluble transport factors: studies in *Xenopus laevis* egg extracts. *Mol Biol Cell* **7**, 1319-1334.
- Sandri-Goldin, R.M.** (1998). ICP27 mediates HSV RNA export by shuttling through a leucine-rich nuclear export signal and binding viral intronless RNAs through an RGG motif. *Genes Dev* **12**, 868-879.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5463-5467.
- Scalenghe, F., Buscaglia, M., Steinheil, C. and Crippa, M.** (1978). Large scale isolation of nuclei and nucleoli from vitellogenic oocytes of *Xenopus laevis*. *Chromosoma* **66**, 299-308.
- Schatz, O., Oft, M., Dascher, C., Schebesta, M., Rosorius, O., Jaksche, J., Dobrovnic, M., Bevec, D. and Hauber, J.** (1998). Interaction of the HIV-1 Rev cofactor eukaryotic initiation factor 5A with ribosomal protein L5. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 1607-1612.
- Scheer, U. and Weisenberger, D.** (1994). The nucleolus. *Curr Opin Cell Biol* **6**, 354-359.
- Scheer, U., Hinssen, H., Franke, W.W. and Jockusch, B.M.** (1984). Microinjection of actin-binding proteins and actin-antibodies demonstrates involvement of nuclear actin in transcription of lampbrush chromosomes. *Cell* **39**, 111-122.
- Schmitt, C., Von Kobbe, C., Bachi, A., Pante, N., Rodrigues, J.P., Boscheron, C., Rigaut, G., Wilm, M., Seraphin, B., Carmo-Fonseca, M. and Izaurralde, E.** (1999). Dbp5, a DEAD-box protein required for mRNA export, is recruited to the cytoplasmic fibrils of nuclear pore complex via a conserved interaction with CAN/Nup214. *EMBO J* **18**, 4332-4347.
- Schwoebel, E.D., Talcott, B., Cushman, I. and Moore, M.S.** (1998). Ran-dependent signal-mediated nuclear import does not require GTP hydrolysis by Ran. *J Biol Chem* **273**, 35170-35175.
- Sekimoto, T., Imamoto, N., Nakajima, K., Hirano, T. and Yoneda, Y.** (1997). Extracellular signal-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by nuclear pore-targeting complex formation with NPI1, but not Rch1. *EMBO J* **16**, 7076-7077.
- Shah, S. and Forbes, D.J.** (1998). Separate nuclear import pathways converge on the nucleoporin nup153 and can be dissected with dominant-negative inhibitors. *Curr Biol* **8**, 1376-1386.
- Shah, S., Tugendreich, S. and Forbes, D.** (1998). Major binding sites for the nuclear import receptor are the integral nucleoporin Nup153 and the adjacent nuclear filament protein Tpr. *J Cell Biol* **141**, 31-49.
- Shaw, P.J. and Jordan, E.G.** (1995). The nucleolus. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**, 93-121.
- Shulga, N., Mosammaparast, N., Wozniak, R. and Goldfarb, D.** (2000). Yeast nucleoporins involved in passive nuclear envelope permeability. *J Cell Biol* **149**, 1027-1038.
- Siomi, H. and Dreyfuss, G.** (1995). A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein. *J Cell Biol* **129**, 551-560.
- Smit-McBride, Z., Dever, T.E., Hershey, J.W.B. and Merrick, W.C.** (1989a). Sequence determination and cDNA cloning of eukaryotic initiation factor 4D, the hypusine-containing protein. *J Biol Chem* **264**, 1578-1583.

- Smit-McBride, Z., Schnier, J., Kaufman, R.J. and Hershey, J.W.B.** (1989b). Protein synthesis initiation factor eIF-4D. *J Biol Chem* **264**, 18527-18530.
- Söderqvist, H., Imreh, G., Kihlmark, M., Linnmann, C., Ringertz, N. and Hallberg, E.** (1997). Intracellular distribution of an integral nuclear pore membrane protein fused to green fluorescent protein. *Eur J Biochem* **250**, 808-813.
- Stade, K., Ford, C.S., Guthrie, C. and Weis, K.** (1997). Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* **90**, 1041-1050.
- Steinman, R.M.** (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* **9**, 271-296.
- Steitz, J.A., Berg, C., Hendrick, J.P., La Branche-Chabot, H., Metspalu, A., Rinke, J. and Yario, T.** (1988). A 5S rRNA/L5 complex is a precursor to ribosome assembly in mammalian cells. *J Cell Biol* **106**, 545-556.
- Stewart, M.** (2000). Insights into the molecular mechanism of nuclear trafficking of nuclear transport factor 2 (NTF2). *Cell Struct Funct* **25**, 217-225.
- Stoffler, D., Fahrenkrog, B. and Aebi, U.** (1999). The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 391-401.
- Strahm, Y., Fahrenkrog, B., Zenklusen, D., Rycher, E., Kantor, J., Rosbach, M. and Stutz, F.** (1999). The RNA export factor Gle1p is located on the cytoplasmic fibrils of the NPC and physically interacts with the FG-nucleoporin Rip1p, the DEAD-box protein Rat8p/Dbp5p and a new protein Ymr255p. *EMBO J* **18**, 5761-5777.
- Stutz, F. and Rosbash, M.** (1998). Nuclear RNA export. *Genes Dev* **12**, 3303-3319.
- Sukegawa, J. and Blobel, G.** (1993). A nuclear pore complex protein that contains zinc finger motifs, binds DNA, and faces the nucleoplasm. *Cell* **72**, 29-38.
- Tafari, S.R. and Wolffe, A.P.** (1993). Dual roles for transcription and translation factors in the RNA storage particles of *Xenopus* oocytes. *Trends Cell Biol* **3**, 94-98.
- Takei, Y., Yamamoto, K. and Tsujimoto, G.** (1999). Identification of the sequence responsible for the nuclear localization of human Cdc6... *FEBS Lett* **447**, 292-296.
- Tang, H., McDonald, D., Middlesworth, T., Hope, T.J. and Wong-Staal, F.** (1999). The carboxyl terminus of RNA helicase A contains a bidirectional nuclear transport domain. *Mol Cell Biol* **19**, 3540-3550.
- Thomas, J.O. and Kornberg, R.D.** (1975). An octamer of histones in chromatin and free in solution. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**, 2626-2630.
- Towbin, H., Staehlin, T. and Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 4350-4354.
- Toyoshima, F., Moriguchi, T., Wada, A., Fukuda, M. and Nishida, E.** (1998). Nuclear export of cyclin B1 and its possible role in the DNA damage-induced G2 checkpoint. *EMBO J* **17**, 2728-2735.
- Truant, R. and Cullen, B.R.** (1999). The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin b-dependent nuclear localization signals. *Mol Cell Biol* **19**, 1210-1217.
- Truant, R., Fridell, R.A., Benson, R.E., Bogerd, H. and Cullen, B.R.** (1998). Identification and functional characterization of a novel nuclear localization signal present in the yeast Nab2 poly (A)<sup>+</sup> RNA binding protein. *Mol Cell Biol* **18**, 1449-1458.
- Ueyama, H., Nakayasu, H. and Ueda, K.** (1987). Nuclear actin and transport of RNA. *Cell Biol Int Rep* **11**, 671-677.
- Ullman, K.S., Shah, S., Powers, M.A. and Forbes, D.J.** (1999). The nucleoporin nup153 plays a critical role in multiple types of nuclear export. *Cell* **10**, 649-664.

- Visa, N., Alzhanova-Ericsson, A.T., Sun, X., Kiseleva, E., Bjorkroth, B., Wurtz, T. and Daneholt, B.** (1996a). A pre-mRNA-binding protein accompanies the RNA from the gene through the nuclear pores and into polysomes. *Cell* **84**, 253-264.
- Visa, N., Izaurralde, E., Ferreira, J., Daneholt, B. and Mattaj, I.W.** (1996b). A nuclear cap-binding complex binds Balbiani ring pre-mRNA cotranscriptionally and accompanies the ribonucleoprotein particle during nuclear export. *J Cell Biol* **133**, 5-14.
- Wada, A., Fukuda, M., Mishima, M. and Nishida, E.** (1998). Nuclear export of actin: a novel mechanism regulating the subcellular localization of a major cytoskeletal protein. *EMBO J* **17**, 1635-1641.
- Warner, J.R.** (1990). The nucleolus and ribosome formation. *Curr Opin Cell Biol* **2**, 521-527.
- Weis, K.** (1998). Importins and exportins: how to get in and out of the nucleus. *Trends Biochem Sci* **23**, 185-189.
- Weis, K., Mattaj, I.W. and Lamond, A.I.** (1995). Identification of hSRP1 $\alpha$  as a functional receptor for nuclear localization sequences. *Science* **268**, 1049-1053.
- Weis, K., Ryder, U. and Lamond, A.L.** (1996). The conserved amino-terminal domain of hSRP1 $\alpha$  is essential for nuclear protein import. *EMBO J* **15**, 1818-1825.
- Wen, W., Meinkoth, J.L., Tsien, R.Y., Taylor, S.S.** (1995). Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* **82**, 463-473.
- Westaway, S.K. and Abelson, J.** (1995). Splicing of tRNA precursors. In *tRNA Structure, Biosynthesis, and Function*, ed D. Söll, U.L. RajBhandary, **7**, 79-92, Washington, DC: ASM Press.
- Wilken, N., Senecal, J.-L., Scheer, U. and Dabauvalle, M.-C.** (1995). Localization of the Ran-GTP binding protein RanBP2 at the nucleocytoplasmic side of the nuclear pore complex. *Eur J Cell Biol* **68**, 211-219.
- Wolff, B., Sanglier, J.J. and Wang, Y.** (1997). Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleo-cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA. *Chem Biol* **4**, 139-147.
- Wolffe, A.P. and Brown, D.D.** (1988). Developmental regulation of two 5S ribosomal RNA genes. *Science* **241**, 1626-1631.
- Wozniak, R.W., Bartnik, E. and Blobel, G.** (1989). Primary structure analysis of an integral membrane glycoprotein of the nuclear pore. *J Cell Biol* **108**, 2083-2092.
- Wu, J., Matunis, M.J., Kraemer, D., Blobel, G. and Coutavas, E.** (1995). Nup358, a cytoplasmically exposed nucleoporin with peptide repeats, Ran-GTP binding sites, zinc fingers, a cyclophilin A homologous domain and a leucin-rich region. *J Biol Chem* **270**, 14209-14213.
- Yan, Y.P., Tao, Y. and Chen, K.Y.** (1996). Molecular cloning and functional expression of human deoxyhypusine synthase cDNA based on expressed sequence tag information. *Biochem J* **15**, 429-434.
- Yang, J., Bardes, E.S.G., Moore, J.D., Brennan, J., Powers, M.A. and Kornbluth, S.** (1998). Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes Dev* **12**, 2131-2143.
- Yang, Q., Rout, M.P. and Akey, C.W.** (1998). Three-dimensional architecture of the isolated yeast nuclear pore complex: functional and evolutionary considerations. *Mol Cell* **1**, 223-234.
- Yaseen, N.R. and Blobel, G.** (1997). Cloning and characterization of human karyopherin  $\beta$ 3. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 4451-4456.
- Yaseen, N.R. and Blobel, G.** (1999). GTP hydrolysis links initiation and termination of nuclear import on the nucleoporin nup358. *J Biol Chem* **274**, 26493-26502.

- Yoneda, Y., Imamoto-Sonobe, N., Yamaizumi, M. and Uchida, T.** (1987). Reversible inhibition of protein import into the nucleus by wheat germ agglutinin injected into cultured cells. *Exp Cell Res* **173**, 586-595.
- Zapp, M.L. and Green, M.R.** (1989). Sequence-specific RNA binding by the HIV-1 Rev protein. *Nature* **342**, 714-716.
- Zapp, M.L., Hope, T.J., Parslow, T.G. and Green, M.R.** (1991) Oligomerization and RNA binding domains of the type 1 human immunodeficiency virus Rev protein: A dual function for an arginine-rich binding motif. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 7734-7738.
- Zhou, L.J. and Tedder, T.F.** (1995). Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* **154**, 3821-3835.
- Zhou, L.J., Swarting, R., Schmith, H.M. and Tedder, T.F.** (1992). A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily. *J Immunol* **149**, 735-742.
- Zolotukhin, A.S. and Felber, B.K.** (1999). Nucleoporins Nup98 and Nup214 participate in nuclear export of human immunodeficiency virus type 1 Rev. *J Virol* **73**, 120-127.

**• Publikationen**

**Hofmann, W., Reichart, B., Ewald, A., Müller, E., Schmitt, I., Stauber, R.H., Lottspeich, F., Jockusch, B.M., Scheer, U., Hauber, J. and Dabauvalle, M.-C.** (2001). Cofactor Requirements for Nuclear Export of Rev Response Element (RRE-) and Constitutive Transport Element (CTE-) containing Retroviral RNAs: an unexpected role for Actin. *J Cell Biol* **152**, 895-910.

**Prechtel, A., Hofmann, W., Studtrucker, N., Langbein, I., Stülke, J., Dabauvalle, M.-C. and Hauber, J.** (2001). Identification of a novel HuR Response Element in the Coding Region of Human CD83 mRNA. (submitted)

**• Abstracts und Posterpräsentationen**

**Rdest, U., Engelbrecht, F., Sandgathe, A., Simon, V. and Hofmann, W.** (23.-25-03.1999): Studien zum Virulenzmechanismus von *Paenibacillus larvae larvae*.  
46. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V., Marburg, (Deutschland).

**Hofmann, W., Reichart, B., Hauber, J. and Dabauvalle, M.-C.** (26-30.03.2000): The cellular protein eIF-5A is required for nuclear export of HIV-1 Rev, but not for Mason-Pfizer monkey virus constitutive transport element (CTE) function.  
24. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Karlsruhe (Deutschland).

**Hofmann, W., Müller, E., Jockusch, B.M., Scheer, U., Hauber, J. and Dabauvalle, M.-C.** (April, 2000): Nuclear export of HIV-1 Rev and Mason-Pfizer monkey virus (MPMV) CTE in *Xenopus* oocyte.  
Tagung des Graduiertenkollegs der deutschen Forschungsgemeinschaft "Membranproteine: Signalerkennung, Signaltransfer und Stofftransport", Münster (Deutschland).

**Hofmann, W., Reichart, B., Hauber, J. and Dabauvalle, M.-C.** (26.-29.04.2000): The Hypusine-containing protein eIF-5A is required for HIV-1 Rev function, but not for Mason-Pfizer monkey virus constitutive transport element activity.  
Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Wien (Österreich).

**Hofmann, W., Müller, E., Jockusch, B.M., Scheer, U., Hauber, J. and Dabauvalle, M.-C.** (Juni, 2000): Nuclear export of HIV-1 Rev and Mason Pfizer monkey virus (MPMV) CTE in *Xenopus* oocyte.  
Wenner-Gren Foundations International Symposium "The Nuclear Pore", Stockholm (Schweden).



**Hofmann, W., Reichart, B., Hauber, J. and Dabauvalle, M.-C.** (02.-06.09.2000). The cellular protein eIF-5A is required for nuclear export of HIV-1 Rev, but not for Mason-Pfizer monkey virus (MPMV) constitutive transport element (CTE) function.  
*European Life Scientist Organization (ELSO 2000) Meeting*, Genf (Schweiz).

**Prechtel, A.T., Hofmann, W., Studtrucker, N., Langbein, I., Stülke, J., Dabauvalle, M.-C. and Hauber, J.** (November, 2001).  
Identification of a HuR binding site in CD83 mRNA that mediates rapid nuclear export via the CRM1 pathway.  
*26. Jahrestagung der Gesellschaft für Zellbiologie*, Straßburg (Frankreich).

### • Vorträge

Nuclear export of proteins with leucine-rich nuclear export signals in vivo and in vitro.  
*Schwerpunktprogramm der DFG: "Functional Architecture of the cell nucleus"* (25.11.1999),  
Sommerhausen (Deutschland).

Involvement of eIF-5A and nuclear actin in nuclear export.  
*International Symposium of the Priority Program of Deutsche Forschungsgemeinschaft* (09.-10.03.2001), DKFZ, Heidelberg (Deutschland).

The role of eIF-5A and nuclear actin in nuclear export processes.  
University of Massachusetts, Medical School, Worcester (USA) (13.11.2001).

**Lebenslauf**

Name: Wilma Antje Hofmann  
 Geburtsdatum: 24.05.1972  
 Geburtsort: Meiningen  
 Familienstand: ledig  
 Staatsangehörigkeit: deutsch

**Ausbildung**

September	1978 - Juli	1983	Julius Fujik Oberschule, Wasungen
September	1983 - Mai	1992	Gymnasium Bayreuther Straße, Wuppertal
Mai	1992		Abitur
September	1992 - Juli	1994	Ausbildung zur Biologisch Technischen Assistentin (BTA), Rheinische Akademie e.V., Köln
Juli	1994		Staatlich geprüftes Examen zur BTA
Oktober	1994 - Oktober	1999	Studium der Biologie an der Universität Würzburg
August	1996		Vordiplomsprüfung
März	1999		Diplomprüfung in den Fächern Zell- und Entwicklungsbiologie, Biochemie und Mikrobiologie
März	1999 - Oktober	1999	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie, Universität Würzburg mit dem Thema: "Kernexport von Proteinen mit Leucin-reichen NES in vivo und in vitro".
seit November	1999		Promotionsstudium am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie, Universität Würzburg. Anfertigung der Dissertation mit dem Thema: "Die Rolle von eIF-5A und Kernaktin bei Kernexportprozesses".

**Zusätzliche Praktische Erfahrung**

01.02.1994 - 01.03.1994	Studentische Hilfskraft am Institut für Immunbiologie, Universität Köln
01.01.1996 - 31.12.1996	Studentische Hilfskraft am Institut für Humangenetik, Universität Würzburg
01.01.1997 - 31.12.1997	Studentische Hilfskraft am Institut für Mikrobiologie, Universität Würzburg
01.01.1998 - 31.04.1998	Studentische Hilfskraft am Department of cellular and structural Biology, Health Sciences Center, University of Colorado, Denver, USA

Würzburg, 31.01.2002

**Erklärung:**

Die vorliegende Arbeit wurde selbständig und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt,

Würzburg, 31.01.2002

Wilma Hofmann