

**Zur funktionellen Architektur des Nukleolus in lebenden Zellen:
Untersuchungen der Dynamik nukleolärer Proteine.**

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

**vorgelegt von
Timothy Krüger
aus Hannover**

Würzburg, 2002

Eingereicht am: 19. September 2002

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. R. Hedrich

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

Gutachter: Prof. Dr. F. Grummt

Tag des Promotionskolloquiums: 27 November 2002

Doktorurkunde ausgehändigt am: 3 Dezember 2002



Credits

Executive Producer	Prof. Dr. M.-C. Dabauvalle
Associate Producer	Prof. Dr. F. Grummt
Director.....	Prof. Dr. Dr. U. Scheer
Art Director	Silke Hofbauer
Production Caterer.....	Beate Reichart
Continuity Person	Antje Schneider
Atmospheric Effects Specialist	Corinna Züнкler
Swashbuckler	Dr. N. Wilken
Dialogue Coach.....	Dr. W. Hofmann
Production Office Coordinator.....	Rosie Rudd
Production Assistant.....	Dr. A. Ewald
Visual Effects Director.....	Dr. R. Hock
Stunt Coordinator	Dr. M. Alsheimer
Special Effects.....	Dr. C. Mais
Post Production Supervisor	Prof. Dr. R. Benavente
Key Grip.....	Manfred Kess
Assistant Director.....	Alan Smithee
Craft Services	Moni, Wolfgang, Uli, Ingo, Rupert, Ufuk
♥♥♥☺	Elina Müller

Bei den Dreharbeiten kamen keine Professor(inn)en, Postdocs, Doktorand(inn)en, Diplomant(inn)en, Assistent(inn)en, Praktikant(inn)en, Sekretär(inn)en oder sonstiges Personal zu signifikantem Schaden.

Ich danke allen Beteiligten und natürlich meinen Eltern für die Unterstützung, Geduld und gutgemeinte Ratschläge!

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Ribosomensynthese im Nukleolus	1
1.1.1	Die rDNA-Transkription durch RNA-Polymerase I	1
1.1.2	Die Modifikation und Prozessierung der prä-rRNA	4
1.1.3	Der Zusammenbau und die Prozessierung der präribosomalen Partikel	5
1.2	Transportprozesse bei der Ribosomenbiogenese	6
1.2.1	Der Export der prä-ribosomalen Untereinheiten aus dem Zellkern	7
1.2.2	Der Import nukleolärer Proteine	8
1.3	Die dynamische Struktur des Nukleolus	9
1.3.1	Der Nukleolus im Verlauf des Zellzyklus	9
1.3.2	Die kinetischen Eigenschaften nukleolärer Proteine	10
1.3.3	Der Nukleolus und die Struktur des Zellkerns	12
1.4	Ein neues nukleoläres Protein	13
1.4.1	P52	13
1.4.2	Cytokeratine im Zellkern	15
1.5	Zielsetzung der Arbeit	16
2	Material	17
2.1	Biologisches Material	17
2.1.1	Zelllinien	17
2.1.2	Tiere	17
2.1.3	Bakterienstämme	17
2.1.4	Antikörper	18
2.2	Molekularbiologisches Material	19
2.2.1	Plasmidvektoren	19
2.2.1.1	Klonierungsvektor	19
2.2.1.2	Bakterielle Expressionsvektoren	20
2.2.1.3	Eukaryotische Expressionsvektoren	21
2.2.2	Expressionsklone	22
2.2.3	Enzyme	22
2.2.4	Oligonukleotide	22
2.2.5	Kits	23
2.3	Chemikalien	23
2.4	Material für die Zellkultur	23
2.5	Geräte	23
3	Methoden	25
3.1	Mikrobiologische Methoden	25
3.1.1	Flüssigkultur von Bakterien	25
3.1.1.1	In vitro Expression in Bakterien	25
3.1.2	Glycerinkultur	26
3.1.3	Bakterienkultur auf Agarplatten	26
3.1.4	Herstellen kompetenter Bakterien	26
3.1.5	Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien	27
3.2	Molekularbiologische Methoden	27
3.2.1	Isolierung von RNA aus Zellen und Geweben	27
3.2.2	RT-PCR	28
3.2.3	PCR	29

3.2.4	RACE.....	31
3.2.5	Auftrennung von DNA-Molekülen durch Agarose-Gelelektrophorese	33
3.2.6	Gelextraktion von DNA-Fragmenten	34
3.2.7	Klonierung von PCR-Fragmenten in den pCR [®] 2.1-Vektor	34
3.2.8	Umklonierung von DNA-Fragmenten in Expressionsvektoren	35
3.2.8.1	Gewinnung des Inserts	35
3.2.8.2	Dephosphorylierung des Vektors	36
3.2.8.3	Ligation und Transformation	36
3.2.8.4	Überprüfung der erhaltenen Klone.....	36
3.2.9	Gewinnung von Plasmid-DNA.....	37
3.2.9.1	GTE-System (alkalische Lyse).....	37
3.2.9.2	Qiagen Plasmid Mini-Prep	37
3.2.10	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	38
3.2.11	Restriktionsverdau	38
3.2.12	Fällung von Nukleinsäuren (DNA und RNA).....	39
3.2.13	DNA-Sequenzierung.....	39
3.3	Proteinbiochemische Methoden	40
3.3.1	<i>In vitro</i> Expression im Retikulozytenlysat	40
3.3.2	Aufreinigung von Fusionsproteinen	41
3.3.2.1	GST-Fusionsproteine	41
3.3.2.2	His-tag Fusionsproteine.....	42
3.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	42
3.3.4	„Pull down“	42
3.3.5	Isolierung von Zellkernen aus Kulturzellen	43
3.3.5.1	Mengenbestimmung von Zellkernen in der Neubauer-Kammer.....	44
3.3.6	Dephosphorylierung von Proteinen	44
3.3.7	Eindimensionale SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	44
3.3.8	Zweidimensionale Gelelektrophorese	47
3.3.8.1	Erste Dimension: NEPHGE	47
3.3.8.2	Vorbereitung der Proben	48
3.3.8.3	Zweite Dimension: SDS-Polyacrylamid-Flachgele	49
3.3.9	Elution von Proteinen aus Polyacrylamidgelen.....	49
3.3.10	Immunblot-Methode („semidry“-Elektroblot).....	49
3.3.10.1	Entfernung der gebundenen Antikörper	51
3.3.11	Nachweis glykosylierter Proteine mit Weizenkeim-Lektin (WGA)	51
3.4	Zellbiologische Methoden	52
3.4.1	Präparation von Oocyten	52
3.4.2	Manuelle Trennung von Kern und Cytoplasma von Oocyten	52
3.4.3	Manuelle Isolierung von Kernhüllen	52
3.4.4	Mikroinjektion	53
3.5	Proteinanalyse durch Massenspektrometrie	53
3.6	Mikroskopie	54
3.6.1	Zellkultur	54
3.6.2	Immunfluoreszenz	54
3.6.2.1	Fixierung	54
3.6.2.2	Inkubation mit Antikörpern.....	54
3.6.3	Epifluoreszenzmikroskop	55
3.6.4	Konfokales Laserscanning Fluoreszenzmikroskop (CLSM).....	55
3.6.4.1	Mikroskopie lebender Zellen und FRAP-Analyse.....	55
4	Abkürzungen	56

5	Ergebnisse	59
5.1	Untersuchung nukleolärer Proteine in lebenden Zellen	59
5.1.1	Fibrilläres Zentrum: RNA Polymerase I	59
5.1.1.1	In vivo Expression von RPA194 und RPA53	59
5.1.1.2	FRAP-Analyse	66
5.1.1.3	Koexpression von pol I und Fibrillarin	71
5.1.2	Dichte fibrilläre und granuläre Komponente: Fibrillarin, B23 und ribosomale Proteine	73
5.1.2.1	Koexpression von Fibrillarin und B23	73
5.1.2.2	Ribosomale Proteine	74
5.2	Charakterisierung des nukleolären Proteins p52	82
5.2.1	cDNA-Klonierung	82
5.2.1.1	RT-PCR mit degenerierten Primern	82
5.2.1.2	Klonierung der vollständigen cDNA	83
5.2.2	<i>Xenopus laevis</i> Cytokeratin 19	83
5.2.3	Expression der Cytokeratin 19 Isoformen	89
5.2.3.1	In vitro Expression im Retikulozytenlysat von Kaninchen	89
5.2.3.2	In vivo Expression in Kulturzellen	90
5.2.3.3	Koexpression von xCK19-GFP und nukleolären Fusionsproteinen	94
5.2.4	Injektion in Kulturzellen und Oocyten	99
5.2.4.1	Isolierung des in vitro exprimierten xCK19 aus Bakterien	99
5.2.4.2	Isolierung von xCK19 aus Proteingelen	100
5.2.5	Identifikation der xCK19 Isoformen im Immunblot	100
6	Diskussion	104
6.1	Lokalisation und Mobilität von RNA Polymerase I	104
6.2	Darstellung der nukleolären Komponenten in der lebenden Zelle	108
6.3	Ribosomale Proteine	109
6.4	Cytokeratin 19 im Nukleolus?	111
7	Zusammenfassung	114
	Summary	115
8	Literaturverzeichnis	117
9	Abbildungsverzeichnis	132

1 Einleitung

Eine fundamentale Aufgabe von Zellen ist die Produktion von Ribosomen, also die Aufrechterhaltung ihrer Translationsmaschinerie. Im Zellkern beginnt der komplexe Prozeß der Ribosomenbiogenese mit der Transkription von ribosomaler DNA (rDNA), wodurch die Bildung des Nukleolus eingeleitet wird. Dessen auffällige und komplexe Struktur spiegelt den vektoriellen Fortschritt von rRNA-Prozessierung und Zusammenbau von ribosomalen Untereinheiten wider.

1.1 Die Ribosomensynthese im Nukleolus

Die tandemrepetierten rRNA-Gene sind zusammen mit der sie transkribierenden RNA-Polymerase I (pol I) und Transkriptionsfaktoren in fibrillären Zentren (FCs) lokalisiert. Die ribosomalen RNA-Transkripte reichen in die umgebende dichte fibrilläre Komponente (DFC) hinein und dort beginnt bereits an den naszierenden Transkripten deren Prozessierung und Modifikation. Die prä-rRNAs verlassen radial den Transkriptionsort, während die 18S, 5,8S und 28S rRNAs herausgeschnitten und mit ribosomalen Proteinen sowie der importierten 5S rRNA zu den ribosomalen Untereinheiten zusammengesetzt werden (Abb. 1.1). Durch die entstehenden Ribonukleoproteinpartikel (RNPs) erhält die äußere granuläre Komponente (GC) ihre bezeichnende, elektronenmikroskopisch sichtbare Struktur (Abb. 1.2).

1.1.1 Die rDNA-Transkription durch RNA-Polymerase I

In Eukaryoten ist die rDNA für die 18S, 5,8S und 28S rRNAs in gemeinsamen Transkriptionseinheiten organisiert. Pol I ist ausschließlich für deren Transkription in ribosomale RNA-Vorläufer-Moleküle verantwortlich (Nogi et al., 1991). Bei den meisten Spezies sind mehrere hundert Kopien der Transkriptionseinheiten in einigen chromosomalen Loci aufeinanderfolgend (tandemrepetiert) angeordnet (Long und Dawid, 1980). Die

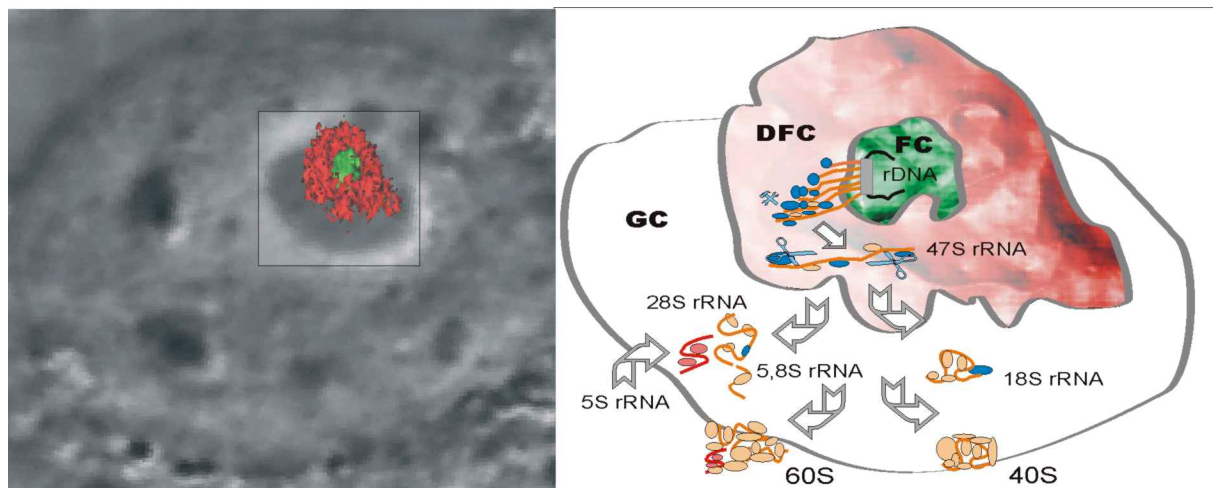


Abb. 1.1: 3D-Modell des Nukleolus und Schema der Ribosomenbiogenese. *Links:* Das 3D-Modell von FC und DFC wurde aus 50 CLSM-Fluoreszenzaufnahmen (siehe Abb. 5.12) aus verschiedenen Ebenen einer lebenden Cos-Zelle erstellt. Das FC ist durch GFP-Pol I grün markiert, das DFC durch RFP-Fibrillarin rot (siehe 5.1.1.3). Die entsprechende Phasenkontrastaufnahme einer mittleren Ebene der Zelle ist gezeigt.

Rechts: Das Schema des Nukleolus zeigt die Transkription der rDNA zu 47S rRNA-Vorläufermolekülen (orange). Diese assoziieren mit Prozessierungsfaktoren (blau) und ribosomalen Proteinen (hellorange). Im Verlauf der Prozessierung entsteht die 18S rRNA, die Bestandteil der kleinen ribosomalen Untereinheit (40S) wird, sowie die 28S und 5,8S rRNAs, die zusammen mit der importierten 5S rRNA (rot) in die große Untereinheit (60S) integriert werden. Diese Präribosomen werden in das Cytoplasma exportiert und dort zu funktionellen Ribosomen zusammengesetzt.

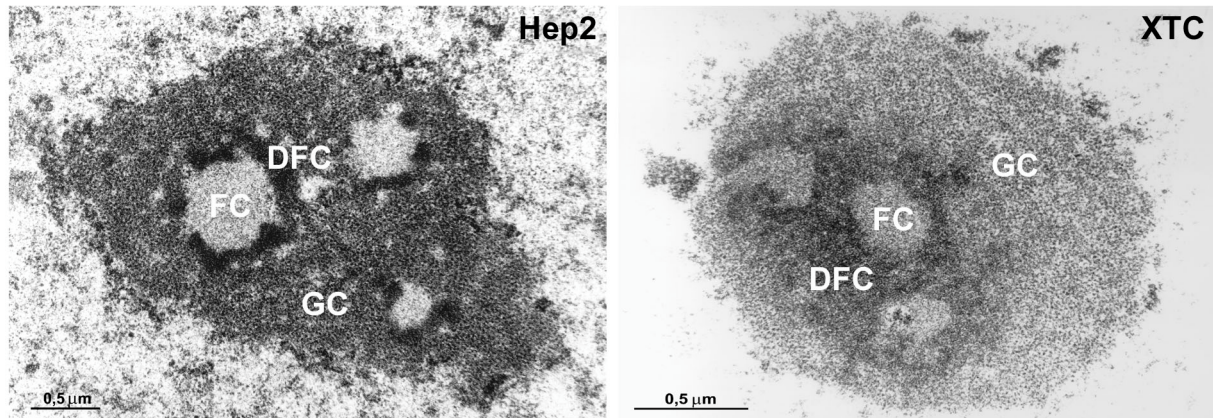


Abb. 1.2: Struktur des Nukleolus. Elektronenmikroskopische Darstellung der nukleolären Komponenten in verschiedenen Zelllinien (Hep2: Mensch, XTC: *Xenopus laevis*). FC: fibrilläres Zentrum, DFC: dichte fibrilläre Komponente, GC: granuläre Komponente (siehe Abb. 1.1, zur Verfügung gestellt von Ulrich Scheer).

Transkriptionseinheiten sind durch intergenische Spacer (IGS) getrennt. Die für die einzelnen rRNAs kodierenden Sequenzen sind durch transkribierte Spacer getrennt (Abb. 1.3). Die 5S rRNA wird extranukleolär von Polymerase III transkribiert.

Der intergenische Spacer enthält charakteristisch angeordnete Promoter und Enhancer Elemente (siehe Moss und Stefanovsky, 1995, Paule, 1998b). Am „core“-promoter, unmittelbar vor der transkribierten Sequenz, binden generelle Transkriptionsfaktoren, die den pol I-Komplex rekrutieren. Dazu gehören UBF (upstream binding factor) und TIFs (transcription initiation factors), darunter der als SL1 (selectivity factor 1) bezeichnete Komplex aus TBP (TATA binding protein) und TBP assoziierten Faktoren (TAFs). Durch die Bindung von TTF-I (transcription termination factor) an Terminationselemente hinter der transkribierten Sequenz wird die pol-I Transkription beendet (Abb. 1.3, siehe Paule, 1998b, Grummt, 1999).

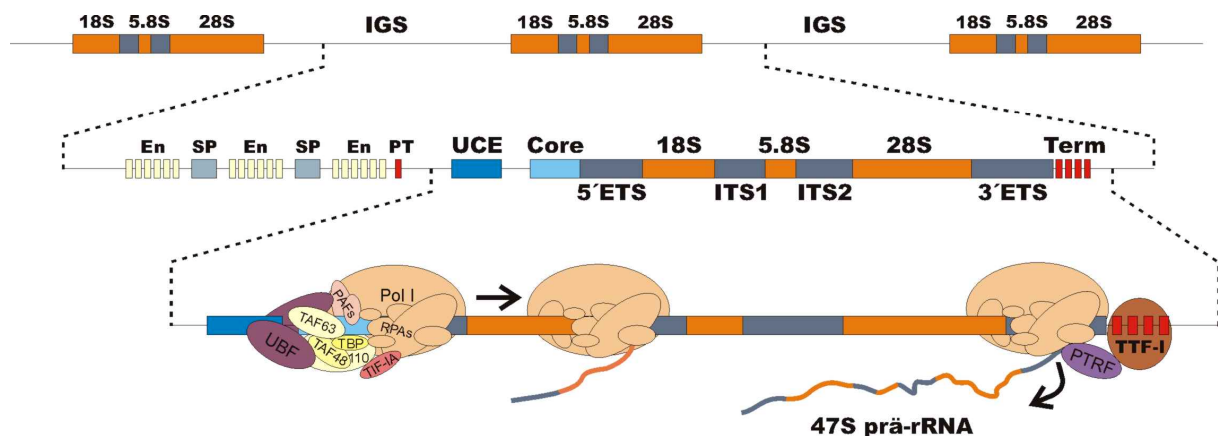


Abb. 1.3: Schema der rDNA-Gene und Transkription. Die tandemrepetierte Anordnung von drei Transkriptionseinheiten ist dargestellt. Diese sind durch intergenische Spacer (IGS) getrennt. Dieser enthält Enhancer (En), spacer promoter (SP) und einen proximalen Terminator (nach Paule, 1998a). Weiterhin liegen kurz vor der transkribierten Sequenz das „upstream core element“ (UCE) und der „core promoter“, an denen der Initiationskomplex durch kooperativ an die DNA gebundene Transkriptionsfaktoren rekrutiert wird. Die Transkription wird durch den Terminationsfaktor (TTF-I) beendet und das prä-rRNA Vorläufermolekül wird freigesetzt (siehe Grummt, 1999 und Text). In den Transkriptionseinheiten sind die Sequenzen für 18S, 5,8S und 28S rRNA durch interne transkribierte spacer (ITS) getrennt. Am 5' sowie am 3' Ende befinden sich externe transkribierte spacer (ETS). ETS und ITS werden im Verlauf der Prozessierung entfernt (siehe 1.1.2).

Der pol I-Enzymkomplex aus 14 Polypeptiden ist bisher bei der Hefe am besten untersucht worden. Vermutlich repräsentieren konservierte Domänen in den beiden größten Untereinheiten den aktiven Bereich des Enzyms (Carles und Riva, 1998). Ansonsten ist die komplette Zusammensetzung von pol I nur bei der Maus bekannt, wobei von den 14 oder 15 Untereinheiten (bezeichnet als RPA) drei als Polymerase-assoziierte Faktoren (PAFs) gelten (Seither et al., 1997, 1998; Jones et al., 2000).

Aufgrund der Regulation der Ribosomen-Produktion stellt die Transkription ribosomaler RNA einen limitierenden Schritt des Zellwachstums dar (siehe Moss und Stefanovsky, 1995). Die auf verschiedene externe Stimuli reagierende Transkriptionsaktivität wird hauptsächlich durch die Anzahl der Initiations-kompetenten RNA-Polymerasen reguliert (siehe Lucchini und Sogo, 1998 und Referenzen darin).

In proliferierenden HeLa-Zellen werden $\sim 3,5 \times 10^6$ Ribosomen pro Zellzyklus benötigt (Duncan und Hershey, 1983). Um diese Menge zu gewährleisten, transkribieren ~ 15000 pol I-Komplexe die 120-150 aktiven rRNA-Gene (von insgesamt ca. 400 Kopien, Jackson et al., 1998). In „Miller-Spreitungen“ sind die pol I-Enzymkomplexe dicht aufeinanderfolgend an der rDNA gebunden sichtbar (Miller und Beatty, 1969). Durch die von ihnen ausgehenden, naszierenden Transkripte wachsender Länge entsteht die in diesen elektronenmikroskopischen Aufnahmen sichtbare sogenannte „Tannenbaum-Struktur“ (Abb. 1.4). Pro Transkriptionseinheit sind $\sim 100-120$ pol I-Moleküle engagiert (Miller und Bakken, 1972, Osheim und Beyer, 1989). Die Transkriptionsgeschwindigkeit wurde mit $\sim 2,5$ kbp/min bestimmt (Greenberg und Penman, 1966, Emerson, 1971), daraus errechnet sich die Transkriptionsdauer für ein rRNA-Gen von ca. 5 min. Durch Immunfluoreszenz nach kurzem BrUTP-Einbau lassen sich die naszierenden prä-rRNA-Transkripte in mehreren subnukleolären Foci nachweisen, die vermutlich fibrillären Zentren entsprechen. (Wansink et al., 1993, Jackson et al., 1998, Thiry et al., 2000).

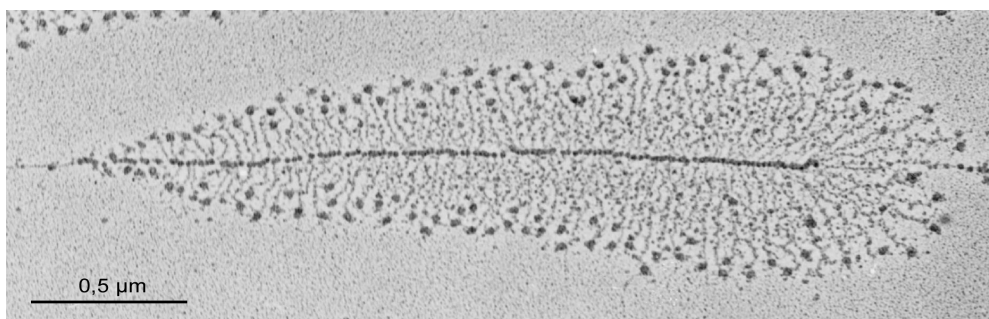


Abb. 1.4: „Miller Spreitung“ eines transkriptionell aktiven rRNA-Gens. Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Transkriptionseinheit mit assoziierten pol I-Komplexen nach Spreitung. Die Anordnung der dicht gepackten naszierenden Transkripte ergibt die für diese Präparate charakteristische Tannenbaumstruktur (Bild zur Verfügung gestellt von Ulrich Scheer).

Pol I ist zusammen mit UBF und rDNA in FCs lokalisiert (Scheer und Rose, 1984; Scheer et al., 1993; Roussel et al., 1993; Zatssepina et al., 1993; Mais und Scheer, 2000). Beim Nachweis der naszierenden rRNA-Transkripte durch BrUTP-Einbau zeigte sich, daß alle pol I enthaltenden Strukturen auch transkriptionell aktive rRNA-Gene enthalten und die prä-rRNA sich rasch radial von dem Transkriptionsort entfernt und durch DFC und GC wandert (Thiry et al., 2000; Mais und Scheer, 2000). Die Struktur des Nukleolus ist jedoch sehr variabel; abhängig von Organismus, Zelltyp, Transkriptionsaktivität und Zellzyklus ist die Anzahl und Größe der FCs und die Verteilung von DFC und GC unterschiedlich (Scheer und Hock, 1999; Shaw und Jordan, 1995; Junéra et al., 1995). Zusammen mit der äußerst kompakten Struktur des Nukleolus ergeben sich so interpretative Schwierigkeiten und manche differierende

Ergebnisse bei der Identifizierung des genauen rDNA-Transkriptionsorts dürften sich so erklären (siehe Lazdins et al., 1997; Cmarko et al., 2000; Thiry et al., 2000 und Referenzen darin). Strukturen, die möglicherweise den Transkriptionseinheiten entsprechen, wurden in situ sowohl im FC (Scheer et al., 1997) als auch im DFC (González-Melendi et al., 2001) gefunden.

Die Transkription ist jedenfalls auf spezielle Foci innerhalb der fibrillären Region des Nukleolus beschränkt, wobei die Natur des Übergangs zwischen FC und DFC, sowie die Verteilung von aktiver und inaktiver rDNA und aktiven/inaktiven pol I-Molekülen noch aufgeklärt werden muß. Ergebnisse aus in situ Hybridisierungen mit geeigneten rRNA-Sonden (Lazdins et al., 1997) und Markierungen der naszierenden rRNA mit BrUTP (Thiry et al., 2000) ergaben Einsichten über die räumliche Ausdehnung der entstehenden Transkripte, sowie über die dynamische Verteilung der prä-rRNA in spezifischen nukleolären Regionen. Demnach erstrecken sich die noch mit dem Transkriptionsort assoziierten rRNA-Moleküle mindestens über eine lichtmikroskopisch auflösbare Distanz von ~0,2-0,5 µm.

Aufgrund der Möglichkeiten der lichtmikroskopischen Untersuchung der oben beschriebenen Prozesse und der Expression von relevanten Proteinen als GFP-Fusionsproteine (siehe 1.3.2 und 5.1) sollte in dieser Arbeit u.a. ein Beitrag zur Untersuchung des dynamischen Verhaltens und der Lokalisation von pol I geleistet werden.

1.1.2 Die Modifikation und Prozessierung der prä-rRNA

Pol I synthetisiert ein rRNA-Vorläufer-Molekül (prä-rRNA), das in menschlichen Zellen aus ~13500 Nukleotiden besteht (47S rRNA; bei Hefe: 35S rRNA). Das entstehende rRNA-Transkript wird im DFC rasch an spezifischen Nukleotiden modifiziert. In Form von snoRNP (small nucleolar ribonucleoprotein) Komplexen, die entsprechende Enzyme beinhalten, dirigieren snoRNAs (small nucleolar RNAs) ca. 115 Methylierungen und die Umwandlung von ca. 95 Uridine in Pseudouridine (Maden und Hughes, 1997; Weinstein und Steitz, 1999; Tollervey und Kiss, 1997).

Die snoRNAs werden in zwei Klassen eingeteilt (Balakin et al., 1996; Ganot et al., 1999). Die Pseudouridin-Synthase ist mit box H/ACA snoRNAs assoziiert und vermutlich als Cbf5p in Hefe identifiziert. Homologe von Cbf5p sind Dyskerin (Mensch), NAP57 (Ratte) und NOP60B (Drosophila) (siehe Weinstein und Steitz, 1999 und Referenzen darin). Fibrillarin gilt als die rRNA 2'-O-Methylase (Tollervey et al., 1993; Wang et al., 2000) und ist mit box C/D snoRNAs assoziiert. Einige weitere Proteine sind als Bestandteile der snoRNPs identifiziert worden, deren Funktionen weitgehend unbekannt sind (siehe Zusammenstellung in Weinstein und Steitz, 1999).

Einige snoRNAs sind, ebenfalls in Form von RNP-Partikeln, an der Prozessierung der Vorläufer-rRNA beteiligt. In mindestens zehn einzelnen Schnittreaktionen durch Exo- und Endonukleasen werden dabei die externen und internen transkribierten Spacer (ETS/ITS) entfernt, während die rRNA(s) sukzessiv vom DFC zum GC mit ribosomalen Proteinen zu prä-ribosomalen Untereinheiten zusammengesetzt werden (Eichler und Craig, 1994; Venema und Tollervey, 1999; Sollner-Webb et al., 1996).

Am besten untersucht ist der erste Schritt der rRNA-Prozessierung im 5' ETS. Hierbei bindet Nukleolin an die rRNA und rekrutiert u.a. U3 snoRNPs (Ginisty et al., 1998), um vermutlich die ~20S Prozessierungs-Komplexe zu bilden, die den in Miller-Spreitungen an jedem rRNA-Transkript sichtbaren „terminal balls“ entsprechen (Mougey et al., 1993a, b, siehe Abb. 1.4).

Dieser und einzelne weitere Schritte wurden durch Fluoreszenz- in situ Hybridisierung (FISH) und Immunfluoreszenz den verschiedenen nukleolären Strukturen in höheren Organismen zugeordnet, wobei sich die dichte fibrilläre Komponente in mehrere funktionell distinkte Subdomänen unterteilen läßt (Cerdido und Medina, 1995; Beven et al., 1996;

Lazdins et al., 1997). Das dabei hauptsächlich untersuchte Protein Fibrillarin, das spezifisch im DFC lokalisiert ist, ist als Bestandteil vieler snoRNPs beschrieben und auch Nukleolin spielt bei mehreren Schritten der Ribosomenbiogenese eine Rolle (Ginisty et al., 1999).

Ein kompletteres Bild vom rRNA-Prozessierungsweg und dabei entstehenden Intermediärprodukten wurde bisher vor allem bei der Hefe entwickelt. Hier sind mehr als 60 Proteinfaktoren der Ribosomenbiogenese beschrieben, die eingeteilt werden als Komponenten von snoRNPs, rDNA-modifizierende Enzyme, Endo- und Exonukleasen, putative RNA-Helikasen und Proteine, die wahrscheinlich RNA-Protein und Protein-Protein Wechselwirkungen vermitteln (Kressler et al., 1999; Venema und Tollervey, 1999). Vermutlich ist das Prinzip der Ribosomensynthese zwischen Eukaryoten im wesentlichen konserviert, so daß entsprechende Faktoren auch in anderen Spezies identifiziert und charakterisiert werden sollten.

1.1.3 Der Zusammenbau und die Prozessierung der präribosomalen Partikel

Die Prozessierung der prä-rRNA ist in hoch kooperativer und koordinierter Weise mit dem Zusammenbau der prä-ribosomalen Untereinheiten verbunden, vielleicht gewährleisten die meisten Modifikationen in erster Linie die korrekte Assoziation der rRNAs mit den ~80 ribosomalen Proteinen (Venema und Tollervey, 1999).

Die genaue Reihenfolge des Zusammenbaus ribosomaler Proteine zu präribosomalen Partikel ist nicht bekannt. Viele binden zu einem frühen Zeitpunkt an die prä-rRNA und bilden so ein 80S (90S bei Hefe) Partikel (Kruiswijk et al., 1978; Auger-Buendia et al., 1979; Todorov et al., 1983). Die Proteine S14 und L4 (S [small] bezeichnet Proteine der kleinen Untereinheit, L [large] diejenigen der großen) von *Drosophila* wurden durch Immunlokalisation elektronenmikroskopisch an entstehenden rRNA-Transkripten nachgewiesen (Chooi und Leiby, 1981). Es gibt Hinweise darauf, daß das „Assembly“ obligatorisch an der prä-rRNA beginnt. Hefe-L4 bindet in vitro ausschließlich an 35S prä-rRNA (Yeh und Lee, 1998) und die in vitro Rekonstitution von ribosomalen Untereinheiten bei *Dictyostelium discoideum* verläuft mit Vorläufer-rRNA deutlich effizienter als mit cytoplasmatischen rRNAs (Mangiarotti und Chiaberge, 1997).

Die 18S rRNA wird im Laufe der Prozessierung vom Primärtranskript abgespalten, so daß die Vorläufer der großen (60S) und kleinen (40S) ribosomalen Untereinheiten entstehen. Die rRNAs werden hier fertig prozessiert und assoziieren mit spät bindenden ribosomalen Proteinen. Die 40S Untereinheit enthält die 18S rRNA. In der 60S Untereinheit sind 28S (25S bei Hefe) und 5,8S rRNA lokalisiert und zu einem relativ frühen Zeitpunkt wird zusätzlich die 5S rRNA integriert, die zusammen mit dem ribosomalen Protein L5 in einem RNP in den Nukleolus importiert wird (Deshmukh et al., 1993).

Die Reifung der prä-rRNA wird in der Struktur der nukleolären Kompartimente deutlich. Frühe Prozessierungsschritte und damit noch fibrilläre prä-rRNAs sind der dichten fibrillären Komponente zuzuordnen, während die Struktur der granulären Komponente auf prä-ribosomale Partikel zurückzuführen ist, die sich in späteren Reifungsprozessen befinden. Zu welchem Zeitpunkt der Übergang von DFC zu GC erfolgt, ist nicht bekannt (siehe Lazdins et al., 1997 und Referenzen darin). Vermutlich entspricht er der Bindung bestimmter ribosomaler Proteine an die rRNA (Hügler et al., 1985; diese Arbeit, 5.1.2).

Wenige nicht-ribosomale Proteine, die bei späten Prozessierungsschritten im GC eine Rolle spielen, sind bei höheren Eukaryoten identifiziert worden, darunter Nop52, für dessen Hefe-Homolog RRP1 eine Rolle bei der Entfernung des ITS2 vermutet wird (Savino et al., 1999). Nop52 kolokalisiert mit B23, das als Endoribonuklease beschrieben wurde, welche bei der Prozessierung eben dieses internen Spacers beteiligt ist (Savkur und Olson, 1998). Für B23 wurde außerdem eine Chaperon-Aktivität bei der Ribosomensynthese gezeigt (Szebeni und Olson, 1999).

Die Produktionsschritte bei der prä-Ribosomen-Synthese sind zeitlich und räumlich geordnet und so auch eng mit dem Transport der prä-ribosomalen Untereinheiten verbunden. Diese werden aus dem Nukleolus in das Nukleoplasma und zu den Kernporen exportiert, währenddessen u.a. die Prozessierungsfaktoren „recycled“ werden müssen. Bei der Hefe wurden Proteine identifiziert, die mit diesen Prozessen assoziiert sind.

Ein Heterodimer aus Noc1p und Noc2p ist mit dem 90S-prä-Ribosom assoziiert. Bei dessen Reifung zum Vorläufer der großen Untereinheit (66S) wird der Noc1p/Noc2p-Komplex durch Noc2p/Noc3p ersetzt und dadurch wird der Export des Partikels in das Nukleoplasma ausgelöst (Milkereit et al., 2001). Das Protein Rix7p, eine AAA-ATPase (ATPases associated with various cellular activities), könnte unterstützend bei der Dissoziation der Prozessierungsfaktoren von den nukleoplasmatischen Untereinheiten wirken und/oder bei Konformationsänderungen des prä-60S Partikels in eine stabile exportkompetente Form eine Rolle spielen (Gadal et al., 2001a, Brown, 2001).

Ob der nukleoplasmatische Transport der Präribosomen ein aktiver Prozeß ist, ist unbekannt (siehe unten). Die beiden prä-ribosomalen Untereinheiten werden schließlich getrennt ins Cytoplasma exportiert und dort weiter modifiziert, um reife ribosomale Untereinheiten zu bilden.

1.2 Transportprozesse bei der Ribosomenbiogenese

Die prä-ribosomalen Untereinheiten müssen durch die Kernporenkomplexe (NPCs, nuclear pore complexes, siehe Wentz, 2000) in das Cytoplasma exportiert werden. Simultan werden auf dem gleichen Weg die im Cytoplasma synthetisierten und zur Ribosomensynthese benötigten Proteine in den Zellkern importiert und akkumulieren zusammen mit snoRNAs im Nukleolus.

Über den Mechanismus des Untereinheiten-Transports vom Nukleolus zu den Porenkomplexen ist wenig bekannt. Er könnte, wie für mRNPs vorgeschlagen, allein durch Diffusion erfolgen (Politz et al., 1999), es sind aber auch Transportwege entlang definierten Strecken vorgeschlagen worden (Leger-Silvestre et al., 1997, Meier und Blobel, 1992). Generell scheint der nukleoplasmatische Transport größtenteils auf Diffusion zu beruhen, wobei das Ausmaß von Interaktionen transportierter Partikel mit möglichen strukturellen Elementen des Interchromatin-Raums noch genauer untersucht werden muß (Pederson, 2000, siehe auch 1.2.2 und 1.3.2).

Bei Amphibien sind nukleoplasmatische Partikel von 65S und 40S als Transportformen prä-ribosomaler Untereinheiten identifiziert worden. Das nicht-ribosomale, nukleoläre Protein Ribocharin (NO38) ist im Nukleoplasma mit dem 65S Vorläufer-Partikel bis zum Erreichen der Kernporen assoziiert (Hügler et al., 1985). Ribocharin wurde elektronenmikroskopisch in sogenannten interchromatin granules (IGCs, Monneron und Bernhard, 1969) lokalisiert, die lichtmikroskopisch als „speckles“ bekannt sind und vorrangig als Stationen für prä-mRNA Prozessierungsfaktoren angesehen werden (Lamond, 1999, Puvion und Puvion-Dutilleul, 1996, Phair und Misteli, 2000).

Der nukleocytoplasmatische Transport wird durch Rezeptoren (Karyopherine) vermittelt. Importine und Exportine binden an Import- (NLS, nuclear localization signals) bzw. Export-Signale (NES, nuclear export sequences) der Transportsubstrate, werden mit diesen an die NPCs gebunden und fungieren als Chaperone beim Transport durch die Kernporen. Einige Transportsubstrate benötigen dabei einen oder mehrere Adapter zur Bindung an den jeweiligen Rezeptor.

Die treibende Kraft des gerichteten Transports ist ein Energiegradient entlang des NPCs, der durch die asymmetrische Verteilung der GTP- und GDP-gebundenen Formen der GTPase Ran entsteht. RanGTP ist im Zellkern konzentriert und Export-Komplexe werden in dessen Gegenwart gebildet und dissoziieren im Cytoplasma durch die GTP-Hydrolyse. In der

entgegengesetzten Richtung sind Importkomplexe nur im Cytoplasma bei Abwesenheit von Rezeptor-gebundenen RanGTP stabil und dissoziieren bei der Bindung von RanGTP im Zellkern (Mattaj und Englmeier, 1998).

1.2.1 Der Export der prä-ribosomalen Untereinheiten aus dem Zellkern

Auch der Export der ribosomalen Untereinheiten ist ein energieabhängiger und Rezeptor-vermittelter Prozeß (Bataille et al., 1990), der den Ran-GTPase Zyklus und bestimmte Nukleoporine (Proteine des NPC) benötigt (Hurt et al., 1999, Moy und Silver, 1999). Das nicht-ribosomale Protein NMD3 bindet im Zellkern an zu exportierende prä-60S Untereinheiten und als NES-enthaltender Adapter vermittelt das Protein die Bildung des Transportkomplexes mit dem Exportin CRM1 (Abb. 1.5, Ho et al., 2000a, b).

CRM1 bindet zusammen mit RanGTP an Leucin-reiche NES-Signale und transportiert seine Fracht durch den NPC ins Cytoplasma. Das Antibiotikum Leptomycin B (LMB) bindet an CRM1 und blockiert so diesen Exportweg (Fukuda et al., 1997, Fornerod et al., 1997, Kudo et al., 1999). In LMB behandelten Zellen akkumulieren so Exportsubstrate des CRM1-Exportwegs im Zellkern, wie für prä-60S Partikel und NMD3 in Hefe gezeigt wurde, genauso wie durch die Entfernung der NES von NMD3 (Ho et al., 2000a).

Im Cytoplasma, wo CRM1 und Ran durch die Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP vom exportierten RNP abgespalten werden, dissoziiert auch NMD3 vom 60S-Partikel. Dies ist einer der letzten Schritte bei der Umwandlung der 60S Untereinheit der Hefe in die reife, funktionelle Form. Diese letzten Reifungsschritte stehen wahrscheinlich im Zusammenhang mit der Translokation der Partikel durch die NPCs. Bei diesem Prozeß müssen RNPs von beträchtlicher Größe durch die Kernporen geschleust werden (Daneholt, 1997, Feldherr et al., 1984). Der Export könnte erleichtert werden, indem die Untereinheiten dabei eine Struktur besitzen, die leichter modifizierbar bzw. deformierbar ist als die der reifen Untereinheiten (Venema und Tollervey, 1999, Aitchison und Rout, 2000).

Im Cytoplasma finden letzte Schritte zur Herstellung translationskompetenter Ribosomen statt. Der letzte Prozessierungsschritt der 18S rRNA in der 40S Untereinheit scheint spezifisch bei Hefezellen cytoplasmatisch zu sein. Es wird angenommen, daß die Addition einiger ribosomaler Proteine der 60S Untereinheit im Cytoplasma erfolgt (siehe Kressler et al., 1999, Venema und Tollervey, 1999 und Referenzen darin). Dies wurde auch für das ribosomale Protein L10 (auch QM Protein, GRC5 oder QSR1) vermutet (Kruiswijk et al., 1978, Nguyen et al., 1998). L10 bindet schwach an die 60S Untereinheit (Loftus et al.,

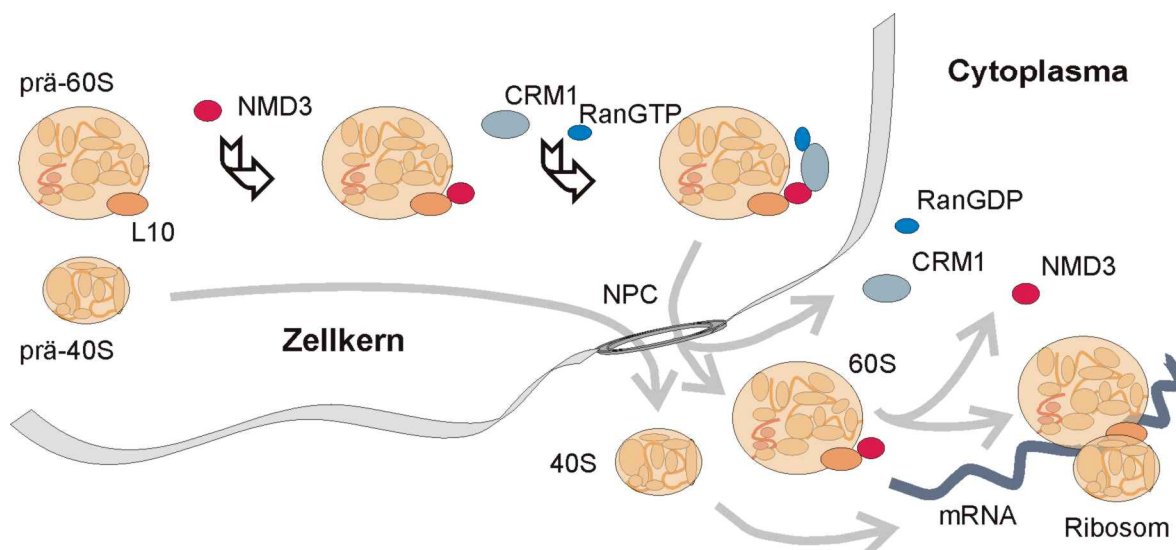


Abb. 1.5: Modell des Exports der 60S Untereinheit aus dem Zellkern bei Hefe. Einzelheiten siehe Text.

1997, Dick et al., 1997) und wird im Cytoplasma für die Assoziation der beiden Untereinheiten bei der Translation benötigt (Eisinger et al., 1997).

Bei der Hefe wurde jedoch gezeigt, daß L10 schon bei der rRNA-Prozessierung im Zellkern eine Rolle spielt. Es wurde als NMD3 bindendes Protein identifiziert, welches eine wichtige Rolle beim CRM1-abhängigen Export der 60S Untereinheit spielt (Abb. 1.5, Gadal et al., 2001b, siehe oben). Es wurde auch ein NLS identifiziert, das von einem Importin-Rezeptor für ribosomale Proteine erkannt wird und unter bestimmten Umständen kann L10 im Zellkern akkumulieren (Gadal et al., 2001b, siehe auch Karl et al., 1999).

1.2.2 Der Import nukleolärer Proteine

Wie alle Zellkernproteine müssen die ~80 ribosomalen und über 60 nicht-ribosomalen nukleolären Proteine durch die NPCs importiert werden, bevor sie im Nukleolus akkumulieren.

Es gibt bei der Hefe mindestens 14 strukturell verwandte Karyopherine, die den Import und Export verschiedener Moleküle vermitteln und wahrscheinlich deutlich mehr bei höheren Eukaryoten (Wozniak et al., 1998). Der am besten untersuchte Import-Rezeptor ist Importin β , der verschiedene NLS-bindende Adapter, Mitglieder der Importin α Familie, bindet und so mit den Transportsubstraten an die NPCs andockt. Zum energieabhängigen Transport durch die Kernporen werden zusätzlich die an Importin β bindende Ran GTPase und NTF2 (nuclear transport factor 2) benötigt (siehe Görlich, 1997, Mattaj und Englmeier, 1998).

Importin α bindet an ein einfaches oder zweigeteiltes basisches NLS. Andere Import-signale können direkt an Importin β oder an Importin β -ähnliche Rezeptoren binden, wie z.B. Transportin, das an ein „M9“-Importsignal bindet (siehe Übersicht in Mattaj und Englmeier, 1998). Die ribosomalen Proteine werden, sowohl in Hefe als auch in Säugerzellen, auf solchen Importin α -unabhängigen Wegen in den Zellkern importiert (Jäkel und Görlich, 1998, Rout et al., 1997).

Viele nicht-ribosomale Proteine besitzen putative „klassische“ basische Lokalisations-signale, von denen allerdings wenige experimentell bestätigt worden sind (Shaw und Jordan, 1995). Andere könnten durch verschiedene Rezeptoren oder huckepack durch die Bindung an NLS-haltige Proteine importiert werden (siehe Mattaj und Englmeier, 1998). Einige nukleoläre, nicht-ribosomale Proteine binden selbst an NLS-Sequenzen. Vermutlich dienen charakteristische Domänen dieser Proteine (Bereiche mit sauren Aminosäuren und Serinen) zur Bindung an die stark basischen NLS oder NLS-ähnlichen Sequenzen von ribosomalen Proteinen, um den Zusammenbau der ribosomalen Untereinheiten im Nukleolus zu unterstützen (Xue und Mélése, 1994).

Im Gegensatz zum nukleären Import gibt es keine nukleolären Konsensus-Signalsequenzen. Für einige Proteine sind verschiedene Domänen identifiziert worden, die für die nukleoläre Lokalisation notwendig sind, darunter B23 (Zirwes et al., 1997). Diese Ergebnisse deuten auf eine nukleoläre Akkumulation durch multiple Interaktionen zwischen Proteinen und Nukleinsäuren hin. So transportieren Proteine, die an box C/D Sequenzelemente in den gleichnamigen snoRNAs binden, diese vermutlich in den Nukleolus oder verankern sie dort (Samarsky et al., 1998, Xue und Mélése, 1995, Übersicht in Scheer und Hock, 1999).

Das nukleoläre Phosphoprotein Nopp140 ist als mögliches Chaperon für den nukleoplasmatischen Transport beschrieben worden. Es ist u.a. mit Fibrillarin und NAP57 im Nukleolus und in Cajal bodies (coiled bodies) lokalisiert (Meier und Blobel, 1994) und ist an dem Austausch dieser Proteine zwischen den beiden Strukturen durch das Nukleoplasma beteiligt (Isaac et al., 1998). Nopp140 könnte Fibrillarin und NAP57 als Komponenten von snoRNPs zum Nukleolus dirigieren. Eine entsprechende Funktion von Nopp140 wurde auch für den Export von Präribosomen durch das Nukleoplasma vorgeschlagen (Meier und Blobel, 1992). Das Protein könnte demnach generell als Chaperon von RNPs dienen. Die genaue Funktion bleibt jedoch noch zu klären (Isaac et al., 1998).

1.3 Die dynamische Struktur des Nukleolus

Die hier beschriebenen Prozesse der Ribosomenbiogenese erweisen sich als äußerst komplex und benötigen eine effiziente zeitliche und räumliche Organisation, um die Produktion der ribosomalen Untereinheiten und andere Funktionen des Zellkerns zu koordinieren. Der Zellkern enthält einige morphologisch identifizierbare Substrukturen, die als funktionell distinkte Kompartimente angesehen werden können (Lamond und Earnshaw, 1998, Matera, 1999, Dundr und Misteli, 2001). Der Nukleolus zählt zu den auffälligsten und am intensivsten untersuchten Kernstrukturen. Die zeitliche Abfolge von molekularen Prozessen kann, mehr oder weniger genau, mit definierten nukleolären Strukturen in Verbindung gebracht werden (siehe 1.1). Die nukleoläre Struktur ist dabei äußerst dynamisch und wird vermutlich zum großen Teil durch die molekularen Interaktionen bei der Ribosomensynthese selbst bestimmt. Besonders deutlich wird dies durch die Disintegration und Wiederaufbau des Nukleolus während der Mitose veranschaulicht.

1.3.1 Der Nukleolus im Verlauf des Zellzyklus

Während der Mitose höherer Eukaryoten wird die rDNA-Transkription eingestellt, der Nukleolus zerfällt und die nukleolären Komponenten werden auf die Tochterzellen verteilt. In der frühen Prophase beginnt die Repression der rRNA-Synthese (Weisenberger und Scheer, 1995), indem die Bildung eines prä-Initiationskomplexes durch die Phosphorylierung von SL1 und UBF verhindert wird (Heix et al., 1998, Kuhn et al., 1998, Klein und Grummt, 1999). Diese Komponenten des Transkriptionsapparats bleiben während der gesamten Mitose zusammen mit pol-I an den NORs (nucleolar organizer regions) der Chromosomen gebunden (Weisenberger und Scheer, 1995, Jordan et al., 1996, Roussel et al., 1996, Heliot et al., 1997).

Unabhängig von der Transkription wird auch die rRNA-Prozessierung während der Mitose unterdrückt, die Prozessierungsfaktoren bleiben mit der unvollständig prozessierten rRNA assoziiert und sind ab der Prometaphase in perichromosomalen Regionen lokalisiert (Hernandez-Verdun und Gautier, 1994, Dundr et al., 1997). Ab der Anaphase sind einige dieser Prozessierungskomplexe außerdem in zahlreichen cytoplasmatischen Partikeln, NDFs (nucleolus-derived foci), nachzuweisen (Dundr und Olson, 1998). Die Organisation der Prozessierungsmaschinerie wird so vermutlich erhalten, um den Wiederaufbau des Nukleolus nach der Mitose zu unterstützen (Sirri et al., 2000, Dundr et al., 2000).

In der Telophase wird die Repression der pol-I Transkription aufgehoben (Sirri et al., 2000) und rRNA-Prozessierungsfaktoren wie Fibrillarin akkumulieren an den NORs und in PNBs (prenucleolar bodies, Stevens, 1965, Bell et al., 1992). Die PNBs sind den NDFs strukturell ähnlich und enthalten vorgefertigte RNP-Komplexe, die an den aktivierten NORs zur rRNA-Prozessierung rekrutiert werden und damit den Nukleolus wieder zusammenbauen (Benavente et al., 1987, Benavente, 1991, Scheer et al., 1993, Dundr et al., 2000, Savino et al., 2001). Von unterschiedlichen PNBs, die vermutlich durch die Retention verschiedener nukleolärer Komponenten durch stabile mitotische prä-rRNAs gebildet wurden, wird im Verlauf der frühen G1-Phase das Material für die Prozessierungsmaschinerie in der benötigten Reihenfolge zum Nukleolus geliefert. So entstehen zunächst DFCs an den NORs, woraufhin GCs gebildet werden, die schließlich zu größeren Nukleoli fusionieren können, während die PNBs wieder verschwinden (Piñol-Roma, 1999, Dousset et al., 2000, Dundr et al., 2000, Verheggen et al., 2000, Savino et al., 2001, Hernandez-Verdun, 2002).

Durch Untersuchung lebender Zellen kann die Dynamik nukleolärer Bestandteile analysiert werden und so zeigt sich, daß die Bewegung der PNBs selbst gering ist. Vielmehr existiert ein gerichteter Transport nukleolären Materials zwischen PNBs und dem Nukleolus, dessen Mechanismus nicht bekannt ist, aber zum Teil vermutlich auf Diffusion beruht (Dundr et al., 2000, Savino et al., 2001, siehe auch Phair und Misteli, 2000 und 1.3.2).

Die rDNA wird, mit Schwankungen zwischen G1 und G2 Phase, während der gesamten Interphase im Nukleolus exprimiert (Hadjiolov, 1985). Die Replikation der rDNA findet in der mittleren S-Phase statt und kolokalisiert mit den Transkriptionsorten im Nukleolus (Hassan et al., 1994, Junéra et al., 1995). TTF-I spielt dabei, gleichzeitig mit der pol I Termination, eine Rolle als Barriere der Replikationsgabel (RFB, replication fork barrier), welche die Kollision zwischen Replikations- und Transkriptionsmaschinerie verhindert (Mason et al., 1998). Der Replikationsfaktor PCNA (proliferating cell nuclear antigen) wurde zusammen mit rDNA in FCs lokalisiert und entsprechend verdoppelt sich die Anzahl der FCs von G1 zu G2, wobei auch eine entspanntere Konformation der rDNA-Gene beobachtet wurde, die mit der transkriptionellen Aktivität zusammenhängen könnte (Junéra et al., 1995). Die Korrelationen zwischen nukleolärer Struktur und Aktivität müssen jedoch nach wie vor genauer untersucht werden (siehe 1.1.1).

1.3.2 Die kinetischen Eigenschaften nukleolärer Proteine

Der Nukleolus erscheint während der Interphase als stabiles Organell des Zellkerns, er wird durch seine Morphologie und durch spezifisch lokalisierte Proteine in fixierten sowie in lebenden Zellen identifiziert und kann biochemisch isoliert werden. Vor allem bei den beschriebenen Prozessen während der Mitose zeigt sich jedoch die Plastizität der nukleolären Struktur und die Untersuchung der Mobilität nukleolärer Proteine ergibt Einsichten in die dynamische Organisation der nukleolären Architektur, auch während der Interphase.

Die Möglichkeit der Beobachtung spezifischer Proteine, der Untersuchung ihrer Mobilität und Interaktionen in lebenden Zellen ergibt sich durch die Entdeckung von autofluoreszierenden Proteinen, vor allem GFP (green fluorescent protein) und DsRed (red fluorescent protein, RFP), die mit dem zu untersuchenden Protein fusioniert und von Kulturzellen exprimiert werden können (Chalfie et al., 1994, Tsien, 1998, Matz et al., 1999). Unter Beibehaltung der regulären Lokalisation und Funktion kann das Verhalten des chimären Proteins lichtmikroskopisch bei dynamischen Prozessen in der lebenden Zelle verfolgt werden, wie im Fall der in 1.3.1 beschriebenen postmitotischen Reorganisation des Nukleolus. Die Veränderungen bei PNBs, NDFs und Nukleoli wurden durch die Expression GFP-markierter nukleolärer Proteine analysiert (Dundr et al., 2000, Savino et al., 2001).

Die Mobilität eines Proteins im Fließgleichgewicht, innerhalb einer bestimmten Struktur und eines relativ kurzen Zeitraums, kann durch „Photobleaching“-Experimente untersucht werden, für die GFP hervorragend geeignet ist. Beim FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) wird die Fluoreszenz des Proteins in einem kleinem Volumen der Zelle durch einen Laserstrahl hoher Intensität irreversibel gelöscht („photobleaching“) und die Geschwindigkeit des Austauschs der gebleichten Moleküle mit fluoreszierenden aus dem umgebenden Volumen wird gemessen (Abb. 1.6). So kann die mobile Fraktion und die Diffusionsrate einer Population von Molekülen bestimmt werden (White und Stelzer, 1999, Lippincott-Schwartz et al., 2001).

Die FRAP-Analyse verschiedener Kern-Proteine und RNAs/RNPs zeigt, daß diese generell eine hohe Mobilität besitzen. So kann ein einzelnes Protein in wenigen Sekunden durch den Zellkern wandern und große Komplexe wie ribosomale Untereinheiten in wenigen Minuten vom Zentrum zur Peripherie des Zellkerns (siehe Misteli, 2001). Diese rasche und energieunabhängige Bewegung läßt darauf schließen, daß sie auf Diffusionsmechanismen beruht. Die Diffusion bietet ein schnelles ökonomisches System, um die Verfügbarkeit von Proteinen im gesamten Zellkern zu gewährleisten, wobei kein Signalerkennungssystem benötigt wird. Moleküle binden bei Begegnung an den entsprechenden Partner und die Flexibilität der Reaktionen bei regulatorischen Prozessen ist maximiert. Nach diesem stochastischen Modell spielt die Selbstorganisation die Hauptrolle bei der Architektur des Zellkerns. Stabile Kern-Kompartimente wie der Nukleolus, die im Gegensatz zu

cytoplasmatischen Organellen keine Membran besitzen, werden durch die Interaktion hoch mobiler Komponenten gebildet, die sich in Abhängigkeit ihrer Funktion und Aktivität entsprechend konzentrieren und die Morphologie der Strukturen durch das Gleichgewicht der Assoziation und Dissoziation beeinflussen (Pederson, 2000b, Phair und Misteli, 2000, Dunder und Misteli, 2001, Misteli, 2001).

So ergaben FRAP-Analysen nukleolärer Proteine hohe Austauschraten zwischen Nukleolus und Nukleoplasma. Beim Photobleichen eines im Nukleolus konzentrierten GFP-Fusionsproteins wie Fibrillarin beobachtet man eine vollständige Erholung der Fluoreszenz innerhalb einer Minute. Ergänzt wird dieser Versuch durch FLIP (fluorescence loss in photobleaching), wobei ein Volumen im Nukleoplasma wiederholt gebleicht wird und die Abnahme der Fluoreszenz außerhalb dieses Volumens im Nukleolus gemessen wird (Abb. 1.6). Anhand dieser Daten wurden kinetische Modelle entwickelt, um z.B. die mittlere Aufenthaltsdauer eines Proteins in einem Kompartiment und die Dissoziationsrate aus diesem Kompartiment zu berechnen. So ergab sich für Fibrillarin eine mittlere Aufenthaltsdauer von unter 40s und eine Austauschrate von ~12000 Fibrillarin-Molekülen pro Sekunde zwischen Nukleolus und Nukleoplasma (Phair und Misteli, 2000).

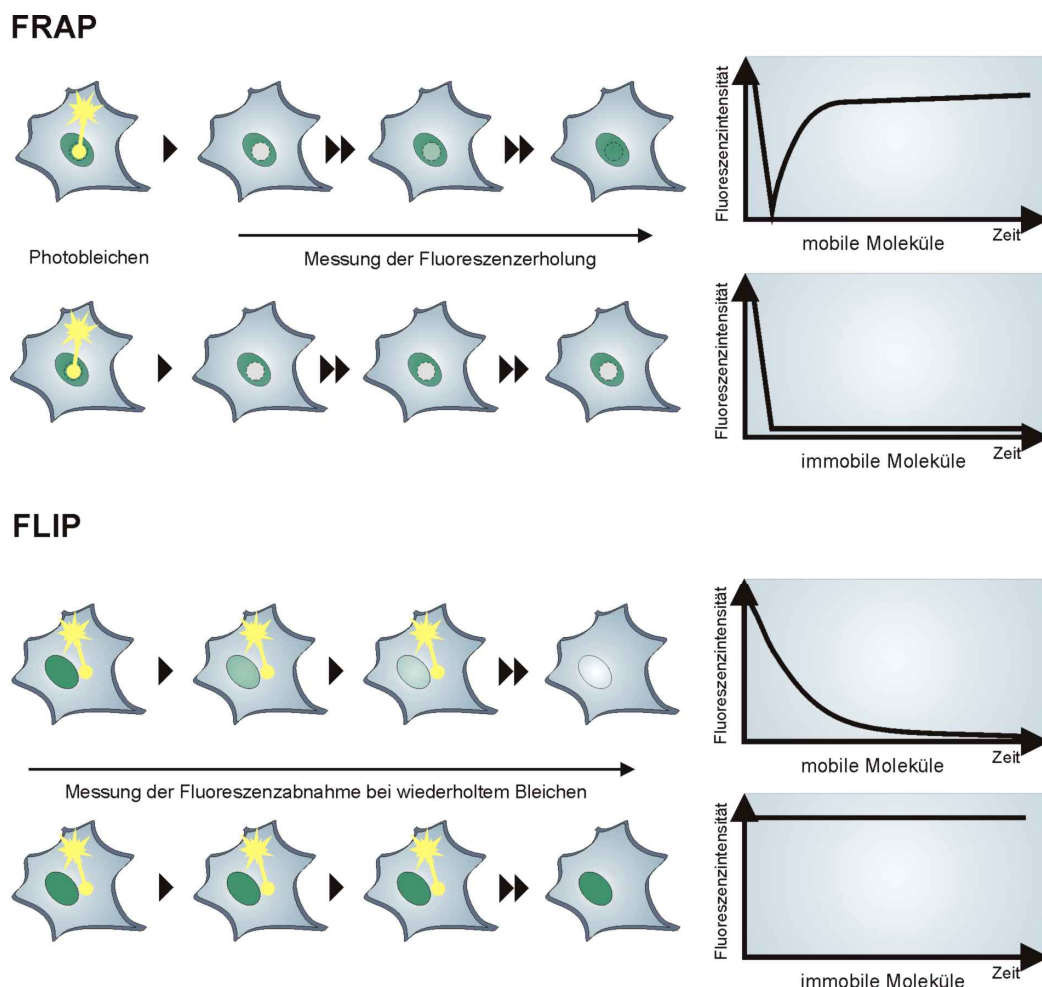


Abb. 1.6: Prinzip von FRAP und FLIP. Beim FRAP ersetzen die fluoreszierenden mobilen Moleküle aus der Umgebung schnell diejenigen in dem gebleichten Bereich. Bei weniger mobilen Molekülen ist die Fluoreszenzerholung entsprechend niedriger.

Beim FLIP werden mobile Moleküle während ihrer Bewegung zwischen verschiedenen Bereichen wiederholt gebleicht. Die Abnahme der Fluoreszenz im nicht gebleichten Gebiet verdeutlicht den Austausch der Moleküle zwischen Kompartimenten. Die Fluoreszenz immobiler Moleküle nimmt nicht ab, da sie den gebleichten Bereich nicht durchqueren.

Die gemessene Mobilität eines Proteins hängt zum einen von der Diffusionsrate des Moleküls ab, die wiederum von der Größe des Moleküls und der Bewegungsfreiheit bestimmt wird, die im Nukleoplasma unerwartet hoch zu sein scheint. Zum anderen spielen die Interaktionen mit anderen Kernbestandteilen eine Rolle. Im Vergleich zum Nukleoplasma besitzen nukleoläre Proteine innerhalb des Nukleolus eine etwa zehnfach geringere Mobilität. Diese ist von den dort ausgeübten Funktionen und damit zusammenhängenden Interaktionen der Proteine in RNPs abhängig (siehe 1.1).

So wurde für verschiedene Proteine, die bei der rRNA-Prozessierung eine Rolle spielen, eine höhere Mobilität gemessen als für ribosomale Proteine. Diese Ergebnisse wurden als Hinweis auf Unterschiede bei der Geschwindigkeit von Prozessierung und Zusammenbau der ribosomalen Untereinheiten interpretiert (Chen und Huang, 2001). Der Zusammenhang zwischen Aktivität und Mobilität wird auch durch den Vergleich von Mobilitätsmessungen nukleolärer Proteine in Transkriptions-inaktivierten Zellen deutlich. Nach der spezifischen Inhibition der pol I-Transkription durch Actinomycin D (AMD, Simard et al., 1974) erhöhte sich die Mobilität der Prozessierungsfaktoren, erklärbar durch das Fehlen der Bindung an neu synthetisierte prä-rRNAs (Phair und Misteli, 2000, Snaar et al., 2000, Chen und Huang, 2001). Im Gegensatz dazu verringert sich die Mobilität des Transkriptionsfaktors UBF. In diesem Fall ist der zugrunde liegende Mechanismus der Bildung des prä-Initiationskomplexes an der rDNA noch ungenügend aufgeklärt (Chen und Huang, 2001).

Nach der AMD induzierten pol I-Inaktivierung segregieren die einzelnen Komponenten des Nukleolus, ohne sich vollständig aufzulösen. Die nukleolären Proteine sind weiterhin in diesen Strukturen konzentriert und noch deutlich weniger mobil als im Nukleoplasma. Es wird angenommen, daß sich funktionelle Komplexe, unabhängig von der Ausübung spezifischer Funktionen, durch die Interaktion mit existierenden rRNA-Substraten bilden. Diese sind analog zu PNBs in der Telophase (1.3.1), deren Bildung durch die pol I-Inhibition nicht behindert wird, sondern nur der Transfer von PNB-Material zu entstehenden Nukleoli. (Chen und Huang, 2001, Phair und Misteli, 2000, Dundr et al., 2000, Savino et al., 2001).

1.3.3 Der Nukleolus und die Struktur des Zellkerns

Zusammengefaßt ergibt sich ein höchst dynamisches Bild des Nukleolus und nukleolärer Proteine, das mit dem Konzept der Selbstorganisation nukleärer Strukturen durch die funktionelle Interaktionen äußerst mobiler Komponenten vereinbar sein könnte (Misteli, 2001, Dundr und Misteli, 2001). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu der Vorstellung eines strukturellen Zellkerngerüsts, wie es die „nukleäre Matrix“ darstellen soll. Dieses extensive Filamentgerüst ist nach bestimmten Extraktionsmethoden im Zellkern sichtbar und wurde mit dessen Struktur und aktiven Transportprozessen in Verbindung gebracht (Berezney et al., 1995, He et al., 1995, Nickerson, 1995). Die Existenz dieser Matrix *in vivo* wird aber bezweifelt, und obwohl es möglicherweise lokal begrenzte, organisierende Filamentstrukturen gibt, wird die Struktur des Zellkerns vermutlich hauptsächlich durch das Chromatin bestimmt (Pederson, 2000a).

Nukleoli sind eng mit Heterochromatin verbunden, das durch die Mitwirkung von dort konzentrierten Repressorproteinen inaktiviert wird. Bei Hefe ist das Repressorprotein Sir2 mit Net1, das spezifisch an rDNA bindet, im Nukleolus lokalisiert und das Protein Net1 wird anscheinend für die strukturelle Integrität des Nukleolus benötigt (Straight et al., 1999). Auch andere Proteine verschiedener Organismen sind sowohl in Heterochromatin als auch im Nukleolus lokalisiert, darunter das Protein Ki-67 bei Säugern (Bridger et al., 1998). Diese Beobachtungen führen zu der Vorstellung, daß die Ansammlung von rDNA-Genen, durch deren Transkription letztlich ein Nukleolus entsteht, aus Protein-Protein Wechselwirkungen zwischen benachbarten Heterochromatin-Domänen resultiert (Carmo-Fonseca et al., 2000).

Die Frage, ob im Interchromatin-Raum lokale Strukturelemente zur Organisation nukleärer Prozesse beitragen, ist ungeklärt. Beispiele von Filament-bildenden Proteinen im

Zellkern sind Aktin, nukleoplasmatische Lamine und die NPC-assoziierten Proteine Nup153 und Tpr, die beim Export beteiligt sein könnten (zusammengefaßt in Pederson 2000a). Im Nukleolus sind ebenfalls Proteine identifiziert worden, die mit strukturellen Aufgaben in Verbindung gebracht werden, darunter ein 180 kD Protein des DFCs (Schmidt-Zachmann et al., 1984) und NO145, das Filamente von 4-12 nm Durchmesser in der nukleolären Peripherie und im Nukleoplasma bildet, deren Funktion ebenfalls noch aufzuklären bleibt (Franke et al., 1981, Benavente et al., 1984, Kneissel et al., 2001).

1.4 Ein neues nukleoläres Protein

Ein vorrangiges Ziel bleibt die Identifizierung und Lokalisation neuer nukleolärer Proteine, deren Charakterisierung zur vollständigen Aufklärung der Funktion und Struktur des Nukleolus nötig ist. Durch die genetischen Methoden, die bei der Hefe zur Verfügung stehen, sind etliche bei der Ribosomensynthese beteiligte Proteine identifiziert worden, deren Charakterisierung bei höheren Eukaryoten noch aussteht (1.1.2-1.1.3). In einer Proteomanalyse isolierter Nukleoli wurden sowohl etliche unbekannte Proteine beschrieben, als auch solche, die bisher nicht mit nukleolären Funktionen in Verbindung gebracht wurden (Andersen et al., 2002). Andererseits sind interessanterweise einige Bestandteile des Nukleolus im Zusammenhang mit zellulären Prozessen identifiziert worden, die nicht direkt mit der Ribosomenbiogenese zusammenhängen. Dazu gehören die Gen-Repression, Zellzyklus-Regulation, Seneszenz und die Prozessierung nicht-ribosomaler RNAs (siehe Pederson und Politz, 2000, Carmo-Fonseca et al., 2000, Dundr und Misteli, 2001, Pederson, 1998, Olson et al., 2000).

Im Zusammenhang mit der oben beschriebenen ungeklärten Funktion von Filamentbildenden Proteinen im Zellkern, die möglicherweise zur strukturellen Organisation beitragen, ist die Identifikation eines nukleolären Proteins interessant, das eine Homologie zu Cytokeratinen aufweist.

1.4.1 P52

Mit einem monoklonalen Antikörper (mAb56), produziert gegen Zellkernproteine von *Xenopus laevis*, wurde durch Immunfluoreszenzmikroskopie und Immungoldlokalisierung ein nukleoläres Antigen in A6-Kulturzellen und Oocyten identifiziert (Krüger, 1998). Charakteristisch für dieses Protein ist die Lokalisation in der granulären Komponente des Nukleolus und die späte Integration in den Nukleolus während der frühen G1-Phase (Abb. 1.7).

In Western Blots erkannte mAb56 ein Polypeptid von 52 kD (p52). P52 wurde durch 2D-Gelelektrophorese von isolierten Zellkernen aus *Xenopus* A6-Kulturzellen isoliert und mikrosequenziert. Die Sequenzierung einzelner tryptisch verdauter Peptide ergab eine überraschende Homologie zu stark konservierten Bereichen von Cytokeratinen (siehe 5.2). Eine kurze Peptidsequenz war spezifisch für p52 und wurde deshalb zur Herstellung von Peptid-Antisera (PS1, PS2) verwendet. Diese Peptid-Antikörper bestätigten die Ergebnisse von mAb56, indem sie das gleiche 52 kD Polypeptid im Immunblot erkannten (siehe 5.2.5) und in der Immunfluoreszenz eine identische nukleoläre Verteilung des Antigens zeigten (Abb. 1.8).

Das Epitop des monoklonalen Antikörpers konnte innerhalb der Peptidsequenzen identifiziert werden (siehe 5.2). Dadurch wurde die Identität des Antigens, das im Immunblot von mAb56 und den Peptidantikörpern erkannt wurde, bestätigt. Weiterhin wurde die Erkennung des nukleolären Antigens der Antisera in der Immunfluoreszenz durch die Konkurrenz mit dem zur Herstellung verwendeten Peptid inhibiert (Abb. 1.9). Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, daß p52 ein nukleoläres Antigen darstellt, das von allen drei verwendeten Antikörpern im Immunblot und in der Immunfluoreszenz erkannt wird.

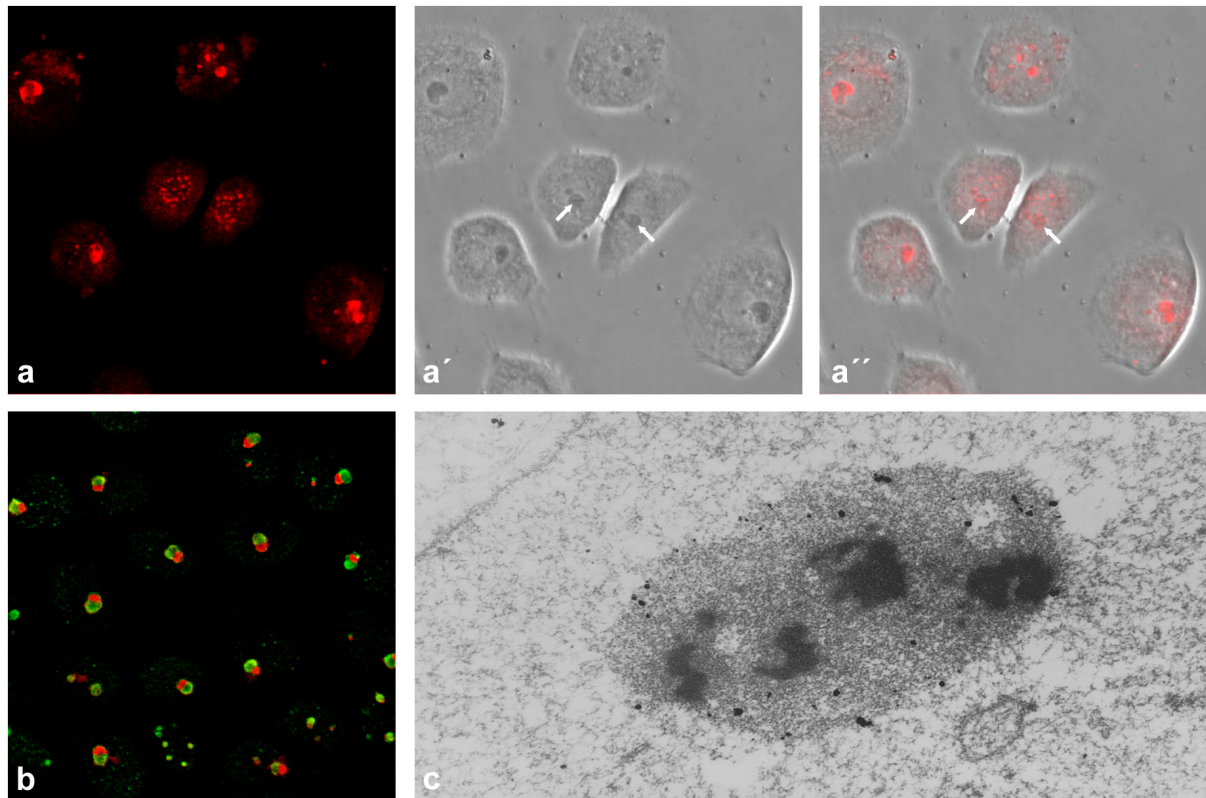


Abb. 1.7: P52-Immunlokalisationen mit mAb56. (a-a'') Immunfluoreszenz mit mAb56 auf A6-Zellen. In Interphasezellen sind die Nucleoli gefärbt. In der frühen G1-Phase sind die Nucleoli im Phasenkontrast (a', a'') Pfeile) deutlich sichtbar, p52 ist aber noch hauptsächlich in PNBs lokalisiert (a, a''), wird also sehr spät in die Nucleoli integriert. (b) Nachweis von p52 (rot) im GC und Fibrillarin (grün) im DFC in AMD-segregierten Nucleoli von A6-Zellen. (c) Immungoldlokalisation von p52 im GC mit mAb56 im Nucleolus einer A6-Zelle (siehe Krüger, 1998).

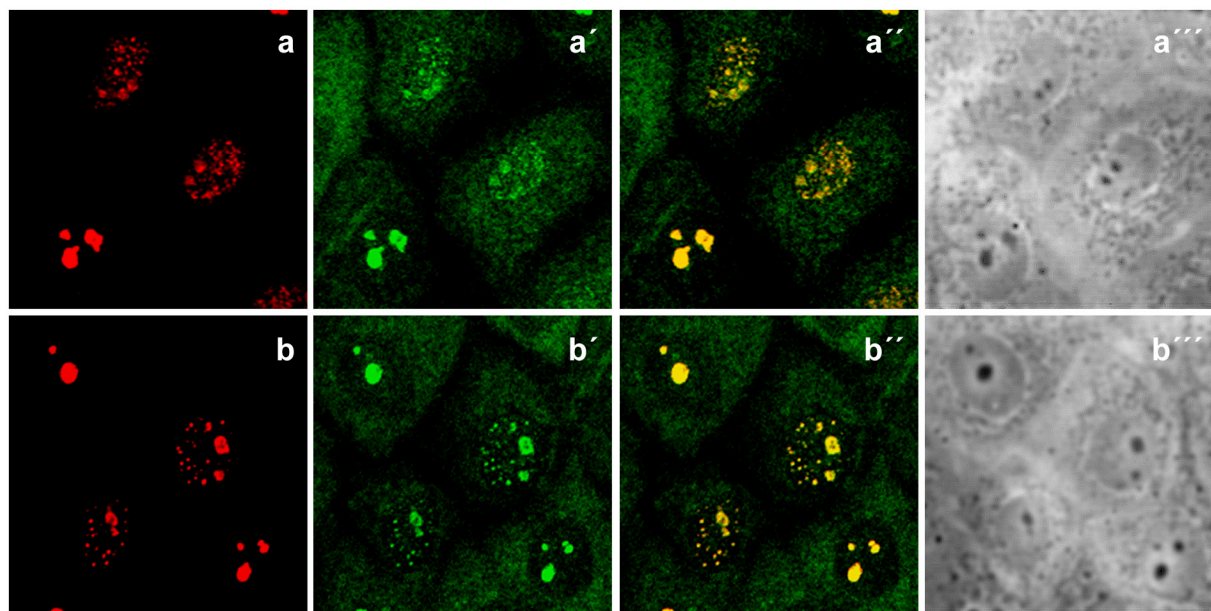


Abb. 1.8: Kolokalisation von p52 mit mAb56 und Peptid-Antikörper. (a, b) Immunfluoreszenz mit mAb56 auf A6-Zellen. (a', b') Immunfluoreszenz der Zellen mit PS2. (a'', b'') Die mit beiden Antikörpern erhaltene Fluoreszenz zeigt die gleiche Verteilung in Nucleoli und PNBs. (a''', b''') Phasenkontrastaufnahmen der Zellen in verschiedenen frühen G1-Phasen und späterer Interphasestadien.

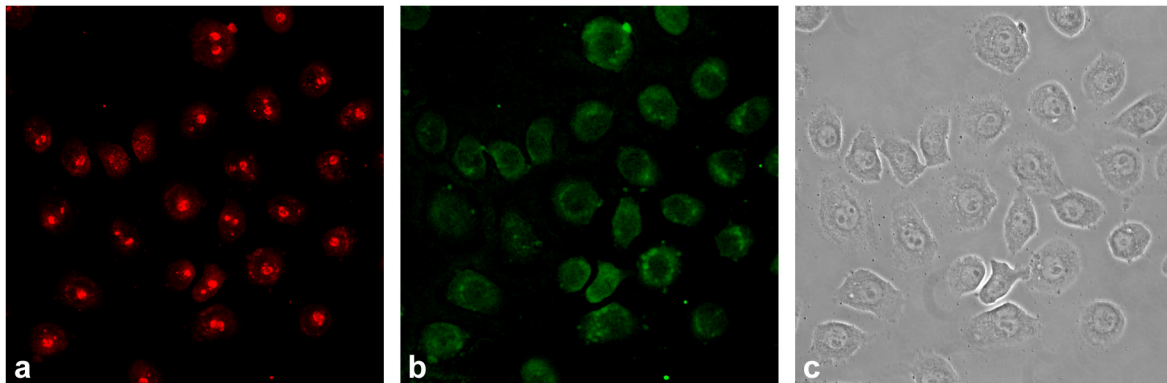


Abb. 1.9: Spezifität der Peptid-Antikörper. (a) Immunfluoreszenz mit mAb56 auf A6-Zellen. (b) Immunfluoreszenz mit PS2 nach Inkubation des Antiserums mit dem zur Immunisierung verwendeten Peptid. Durch die Peptid-Kompetition färbt PS2 die Nucleoli nicht mehr an. (c) Phasenkontrast.

Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, daß es möglicherweise Cytokeratin-verwandte nukleoläre Proteine gibt. In dieser Arbeit sollte die komplette Sequenz von p52 ermittelt werden, um weitere Einblicke in die Verwandtschaft mit der Cytokeratin-Proteinfamilie zu erhalten.

1.4.2 Cytokeratine im Zellkern

Cytokeratine sind Intermediärfilament (IF)-Proteine, die ein hoch dynamisches cytoplasmatisches Netzwerk aus 10-12 nm dicken Filamenten bilden. Die über 50 Mitglieder der Cytokeratine werden Zelltyp-spezifisch und abhängig vom Differenzierungszustand exprimiert, um epithelialen Zellen Schutz vor mechanischem und sonstigem Streß zu bieten. In Anbetracht diverser Regulationsmechanismen und Keratin-assoziiierter Proteine werden diesen IF-Proteinen verschiedene zusätzliche Funktionen zugeschrieben (Coulombe und Omary, 2002, Herrmann und Aebi, 1998, Herrmann und Aebi, 2000). Insbesondere sind Interaktionen von IF-Proteinen mit RNPs beschrieben, die auf eine unterstützende Funktion bei Transportprozessen hinweisen (Traub et al., 1998) und verschiedene Hinweise, u.a. die Bindung an DNA/RNA *in vitro*, geben Anlaß zu Hypothesen über nukleäre Funktionen (Traub und Shoeman, 1994).

Die Lokalisation von experimentell veränderten IF-Proteinen im Zellkern ist bei der Untersuchung der Rolle der C-terminalen „Schwanz“-Domäne von Cytokeratinen und Vimentin bei der Filamentbildung beschrieben worden. Nach der Transfektion von experimentell hergestellten schwanzlosen Proteinen, bzw. dem natürlich vorkommenden schwanzlosen Cytokeratin 19, wurden diese IF-Proteine häufig im Zellkern beobachtet, wo sie sowohl granuläre Aggregate als auch normale Filamente bilden können (Bader et al., 1991, Eckelt et al., 1992, Rogers et al., 1995). Es wurde vermutet, daß die C-terminale Domäne für die Verankerung von IF-Proteinen im Cytoplasma verantwortlich ist. Auf welchem Weg der nukleäre Import nach Aufhebung dieser Retention erfolgt und welche „natürliche“ Relevanz diese Translokation besitzt, bleibt unklar (siehe auch Diskussion). Die flexiblen IF meiden im Zellkern wie im Cytoplasma Organellen und Membranen (Janmey et al., 1998). Die Möglichkeit, Filamente im Zellkern zu bilden, wird sogar genutzt, um interchromosomale Domänen zu untersuchen, da die IF-Filamente in diesen frei zugänglichen „Kanälen“ gebildet werden (Reichenzeller et al., 2000).

Im Gegensatz zu diesen experimentell induzierten Kernfilamenten ist p52 ein lösliches Protein, das ausschließlich mit nukleolären Strukturen assoziiert ist. Ein solches nicht-filamentöses, Cytokeratin-verwandtes nukleoläres Protein wurde bisher nicht beschrieben.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollten verschiedene bei der Ribosomenbiogenese beteiligte Proteine in lebenden Zellen untersucht werden. Wie in 1.3.2 beschrieben, können so neue Erkenntnisse über die Eigenschaften dieser Proteine im Zusammenhang mit der dynamischen Struktur des Nukleolus und des Zellkerns gewonnen werden. Zu diesem Zweck sollten Proteine, die für bestimmte nukleoläre Kompartimente und Schritte der Ribosomensynthese spezifisch sind, als Fusionsproteine mit GFP und RFP in Kulturzellen exprimiert werden. Dazu mußten die entsprechenden cDNA-Sequenzen in geeignete Expressionsvektoren kloniert werden.

Einzelne zu untersuchende Proteine sind in dieser Einleitung beschrieben worden. Um die Dynamik der rDNA-Transkription zu beobachten, sollte die Lokalisation und Aktivität von RNA-Polymerase I im Nukleolus untersucht werden (siehe 1.1.1). Dabei sollte die Möglichkeit genutzt werden, das dynamische Verhalten verschiedener pol I-Untereinheiten zu verfolgen, deren Funktionen im Detail nicht geklärt sind.

Um einen Einblick in die Topologie von rDNA-Transkription und rRNA-Prozessierung in lebenden Zellen zu gewinnen, sollten diese Ergebnisse vor allem mit denen von Fibrillarin verglichen werden (siehe 1.1.2). Durch die Verwendung von GFP- und RFP-Fusionsproteinen können zwei Proteine gleichzeitig in einer Zelle beobachtet werden. Die Koexpression von pol I und Fibrillarin sollte die Verteilung von FC und DFC, also die Orte der Transkription bzw. früher Prozessierungsschritte, im aktiv transkribierenden Nukleolus verdeutlichen.

Weiterhin sollte das GC-spezifische Protein B23 kloniert werden, um „Marker“-Proteine für alle drei nukleolären Kompartimente zur Verfügung zu haben. Diese sollten dann vergleichend mit verschiedenen ribosomalen Proteinen lokalisiert werden, die vermutlich zu verschiedenen Zeitpunkten an die entstehenden prä-ribosomalen Untereinheiten binden (siehe 1.1.3). Die Expression des ribosomalen Proteins L10 ist von besonderem Interesse, da es als ausschließlich cytoplasmatisch beschrieben wurde und andererseits als NMD3 bindendes Protein offensichtlich beim Kernexport der ribosomalen Untereinheiten eine Rolle spielt. Diese offensichtliche Diskrepanz in der Literatur galt es aufzuklären (siehe 1.2.1).

Ein Hauptziel dieser Arbeit war schließlich die Identifizierung, Klonierung und in vivo Expression des neuen nukleolären Proteins p52, dessen anfängliche Charakterisierung einige interessante Fragen aufwarf und vermuten ließ, daß eine detaillierte molekulare Analyse einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der dynamischen Struktur des Nukleolus und der Ribosomenbiogenese liefern könnte.

2 Material

2.1 Biologisches Material

2.1.1 Zelllinien

HEp-2: (Human Epidermoid carcinoma). Die Zelllinie stammt aus epidermalem Karzinomgewebe des menschlichen Larynx. Die Zellen wurden in 90% DMEM (Dulbecco's Modified Minimum Essential Medium) mit 10% FKS, 1% Natriumpyruvat und 1% MEM-non-essential-aminoacids bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

HeLa: Die Zelllinie stammt aus dem Epithelgewebe eines menschlichen Cervix-Karzinoms. Die Zellen wurden in Eagle's MEM (Minimum Essential Medium) mit Earle's Salzen und 10% FKS bei 37°C und 5% CO₂ in Kultur gehalten.

Cos-7: (*Cercopithecus aethiops*). Fibroblasten-ähnliche Nierenzelllinie von CV-1 Zellen der grünen Meerkatze abgeleitet. Diese Zellen wurden in 90% DMEM mit 10% FKS bei 37° C und 5% CO₂ in Kultur gehalten.

3T3-F1: Diese Zelllinie wurde von embryonalen Mausfibroblasten abgeleitet (*Mus musculus*). Die Zellen wurden in DMEM mit 10% FKS und 1% L-Glutamin bei 37° C und 5% CO₂ kultiviert.

PtK 2: (*Potorous tridactylis* kidney). Die Zellen stammen aus Nierenepithelgewebe des Rattenkänguruhs ab und wurden als Monolayer-Kultur in Eagle's MEM mit Earle's Salzen und 10% FKS bei 37°C und 5% CO₂ in Kultur gehalten.

XLKE-A₆: (*Xenopus laevis* kidney epithelium, line A₆, American Type Culture Collection). Diese Zelllinie stammt aus Nierenepithelgewebe von *Xenopus laevis*. Die Zellen wurden in DMEM mit Earle's Salzen und 10% FKS bei 27°C kultiviert.

XTC: Die Zelllinie stammt aus embryonalem Gewebe von *Xenopus laevis*. Die Zellen wurden in RPMI mit 20% FKS, 2% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

2.1.2 Tiere

Weibliche Krallenfrösche (*Xenopus laevis*) wurden von einer südafrikanischen Tierfarm bezogen (South African Snake Farm, Fish Hoek, Cape Province, Südafrika) oder stammten aus institutseigener Nachzucht.

2.1.3 Bakterienstämme

Zur Transformation des pCR[®]2.1-Vektors (2.2.1.1) wurden die im „Topo-Kit“ der Firma Invitrogen (2.2.x) enthaltenen **TOP10F' One Shot[®]** kompetenten Zellen verwendet.

Zur Vermehrung sonstiger Plasmidvektoren (siehe 2.2.1) wurde der Bakterienstamm **XL1-Blue** der Firma Stratagene eingesetzt.

2.1.4 Antikörper

Antigen	Antikörper	Typ	Verwendung		Quelle
RNA-Polymerase I	JO717	Kaninchen polyklonal	IF:	1:80	(Scheer und Rose, 1984)
Fibrillarin	72B9	Maus monoklonal	IF:	1:50	Prof. Dr. Reimer (Uni Augsburg) (Reimer et al., 1987)
B23/NO38	No185	Maus monoklonal	IF:	1:100	(Schmidt-Zachmann et al., 1987)
L10	C17	Kaninchen polyklonal	IF: Blot:	1:200 1:500	Santa Cruz Biotechnology
P52	No56	Maus monoklonal	IF: Blot:	1:500 1:500	Prof Dr. Dabauvalle (Krüger, 1998)
	PS1, PS2	Meerschwein polyklonal	IF: Blot:	1:200 1:500	(Krüger, 1998)
Cytokeratin	Lu-5	Maus monoklonal	IF:	1:50	Biogenex, (Hamburg) (von Overbeck et al., 1985, Franke et al., 1987)
Tetra-His	anti-His	Maus monoklonal	Blot:	1:1000 3% BSA	Qiagen (Hilden)
Glutathion-S-Transferase	anti-GST	Kaninchen polyklonal	Blot:	1:10000 in Milch	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)

Sekundärantikörper, die entweder an Fluorochrome (Texas Red, DTAF [dichlorotriazinylaminofluorescein]) oder an Peroxidase (HRP) gekoppelt waren, wurden über die Firma Dianova (Hamburg) bezogen. Die Seren wurden aus Ziegen gewonnen und waren gegen Maus, Kaninchen oder Meerschweinchen gerichtet.

2.2 Molekularbiologisches Material

2.2.1 Plasmidvektoren

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmidvektoren sind nachfolgend einzeln graphisch dargestellt. Die Abbildungen zeigen jeweils schematisch die relevanten Charakteristika der Plasmide (insbesondere Antibiotika-Resistenzen, Promoter, fusionierte Sequenzen), sowie die Sequenz der „multiple cloning site“ (MCS), mit den Schnittstellen der für die Klonierung verwendbaren Restriktionsendonukleasen und Primer-Bindungsstellen zur Sequenzierung.

2.2.1.1 Klonierungsvektor

Der Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] ist Teil des Topo-Kits der Firma Invitrogen und wurde für die direkte Klonierung von PCR-Produkten verwendet (siehe 3.2.7).

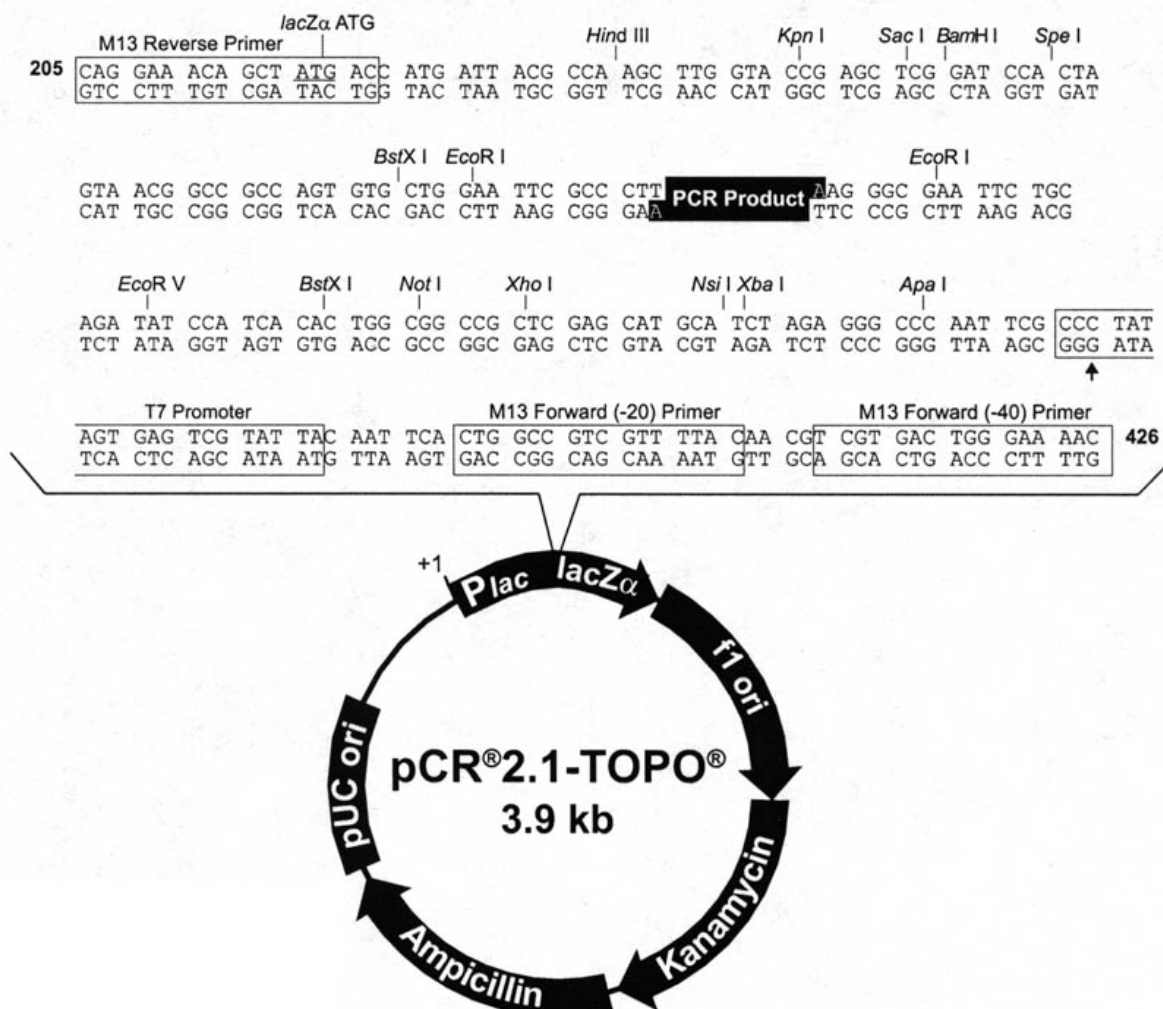


Abb. 2.1: pCR[®]2.1-TOPO[®]

2.2.1.2 Bakterielle Expressionsvektoren

Der Vektor pGEX-5X-1 ist Teil eines Expressionssystems der Firma Amersham Pharmacia Biotech. Die inklonierte cDNA wird als Fusionsprotein exprimiert, an das N-terminal das aus *Shistosoma japonicum* stammende Enzym Glutathion-S-Transferase fusioniert ist. Über den GST-Anteil ist eine Aufreinigung des Fusionsproteins möglich (siehe 3.3.2.2). Der GST-Anteil kann später enzymatisch abgespalten werden. Dafür ist die Erkennungssequenz für den Faktor X_a vorhanden.

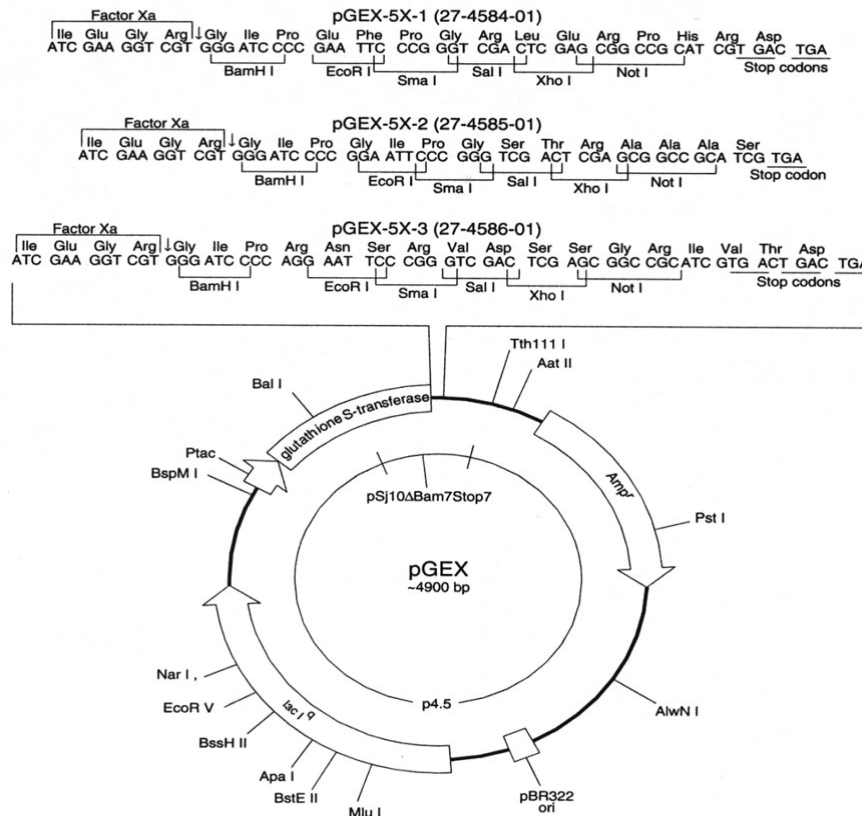


Abb. 2.2: pGEX-5X. Amp^r: Ampicillinresistenz.

Der Vektor pQE30 ist Teil des QIAexpress™ Systems der Firma Qiagen. Die klonierte cDNA wird als Fusionsprotein mit einem N-terminalen „6xHis-Tag“ exprimiert. Durch die Bindung der Histidine an eine Nickelsäule kann das in Bakterien exprimierte Protein aufgereinigt werden (siehe 3.3.2.1). Der Vektor besitzt eine Ampicillinresistenz.

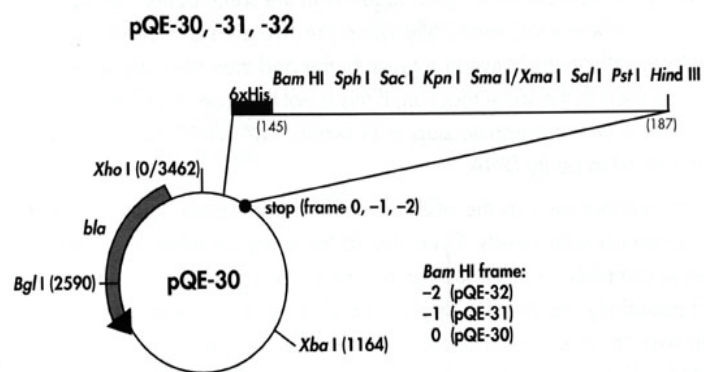


Abb. 2.3: pQE30

2.2.1.3 Eukaryotische Expressionsvektoren

Zur Expression in eukaryotischen Systemen wurden Vektoren verwendet, die einen menschlichen CMV (Cytomegalovirus) Promoter enthalten. Der Vektor pcDNA3 der Firma Invitrogen wurde verwendet um die klonierte cDNA ohne fusionierte Sequenzen zu exprimieren (siehe 3.3.1).

Zur Expression von fluoreszierenden Fusionsproteinen wurden die Vektoren pEGFP und pDsRed der Firma Clontech verwendet. Die klonierte cDNA wurde als Fusionsprotein mit N- oder C-terminalen EGFP (enhanced green fluorescent protein, *Aequorea victoria*), bzw. RFP (red fluorescent protein, *Discosoma sp.*) exprimiert.

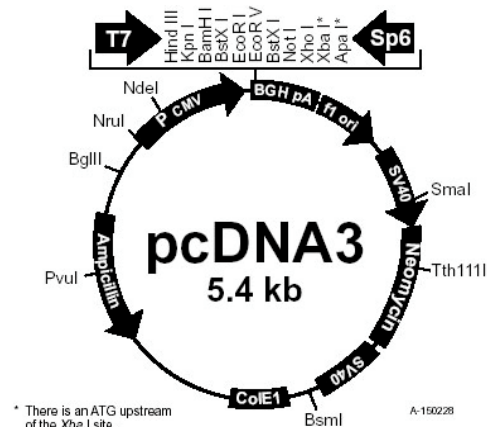


Abb. 2.4: pcDNA3

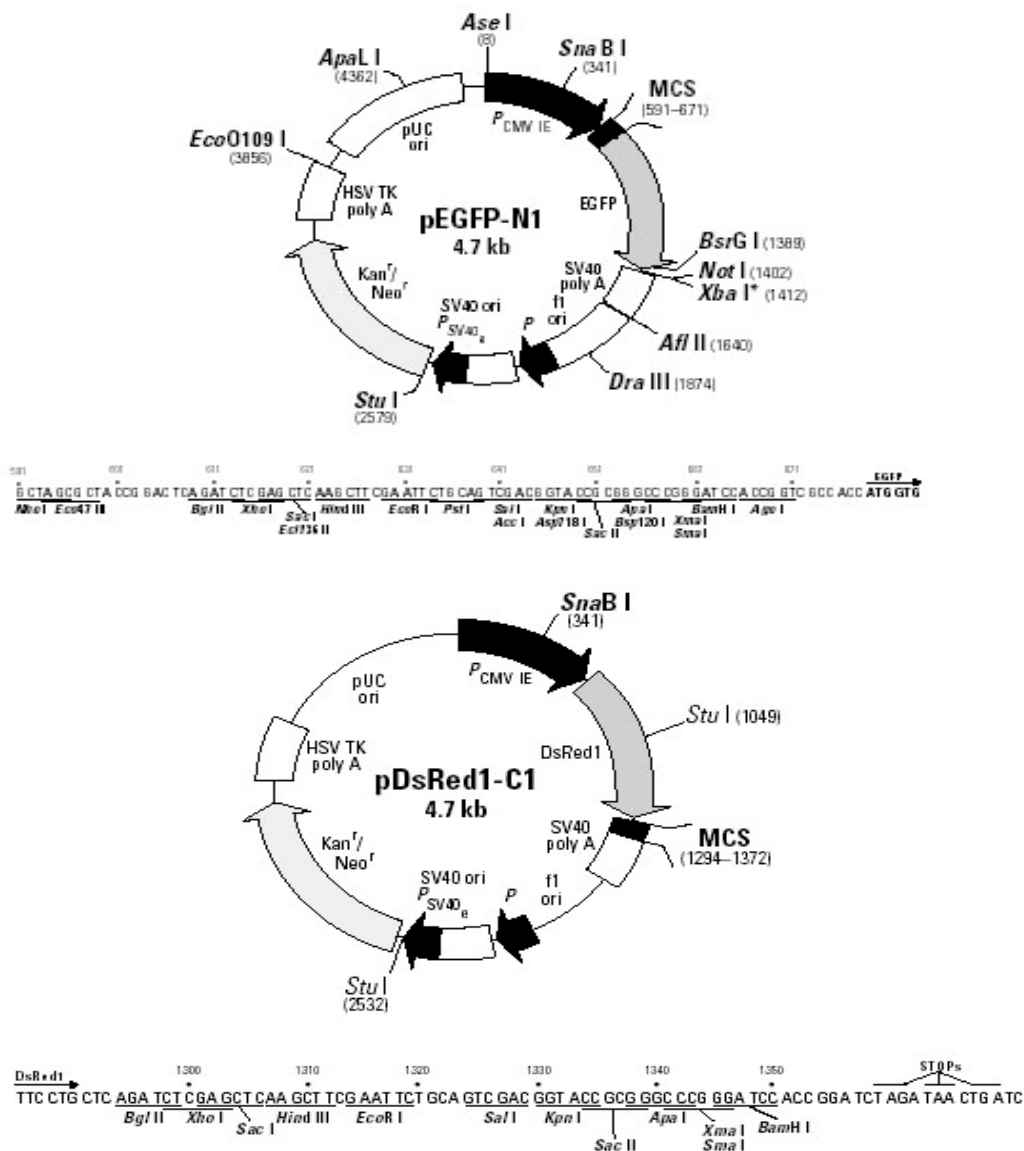


Abb. 2.5: pEGFP und pDsRed. Beispiele für C-terminal fusioniertes GFP (pEGFP-N1) und N-terminal fusioniertes RFP (pDsRed-C1). Kan^r: Kanamycinresistenz.

2.2.2 Expressionsklone

GFP-L5 (pF143L5, Rosarius et al., 2000) wurde von Prof. Dr. Hauber (Erlangen) zur Verfügung gestellt.

GFP-mRPA194 (pEGFP-C2) wurde von Dr. Dundr (Bethesda, USA) zur Verfügung gestellt.

mRPA53 wurde im Vektor pBluescript-SKII+ (Stratagene) kloniert von Prof. Dr. Grummt (Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

pBCHGN (NLS-GFP kloniert in pBluescript) wurde von Prof. Dr. Zentgraf (Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

2.2.3 Enzyme

Restriktionsenzyme und Ligase

Alle verwendeten Restriktionsenzyme und die T4-DNA-Ligase wurden von der Firma MBI Fermentas (St. Leon Rot) bezogen.

Reverse Transcriptase

Für die RT-PCR wurde die Superscript II-RT der Firma Stratagene verwendet.

Tfl-DNA-Polymerase

Die für alle DNA-Amplifikationen verwendete DNA-Polymerase, die aus *Thermus flavus* isoliert wurde, wurde über die Firma Promega (Mannheim) bezogen.

Shrimp alkalische Phosphatase (SAP)

Die SAP wurde von der Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) bezogen.

2.2.4 Oligonukleotide

Die für die DNA-Amplifikationen verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden bei der Firma INTERACTIVA (Ulm) bestellt. Der Oligo(dT)-Primer für die RT-PCR wurde von der Firma Promega (Mannheim) bezogen.

Sequenzierungsprimer:

M13 forward (-20), M13 reverse	pCR [®] 2.1
T7, Sp6	pcDNA3, pCR [®] 2.1
pGEX 5'-Sequencing	pGEX-5X
5´ GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG 3´	
pGEX 3'-Sequencing	pGEX-5X
5´ CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG 3´	

pEGFP-C-Sequencing

pEGFP-C(1-3)

5´ CCTGCTGGAGTTCGTGA 3´

pEGFP-N-Sequencing

pEGFP-N(1-3)

5´ CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG 3´

2.2.5 Kits*Plasmid Mini-Präp* (QIAGEN, Hilden)*QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN, Hilden)*TOPO TA Cloning[®] Kit* (Invitrogen)*5´, 3´RACE Kit* (Boehringer Mannheim)*ABI PRISM[®] BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems)**2.3 Chemikalien**

Chemikalien und Lösungsmittel wurden, wenn im Text nicht anders vermerkt, von den Firmen Applichem (Darmstadt), Calbiochem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Fluka (Berlin) oder Sigma (Deisenhofen) in Analysenqualität bezogen.

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, CO₂-Auto-Zero

Heraeus, Frankfurt

Drehtisch, regelbar

Heidolph, über Hartenstein, Würzburg

Drystar Gelrockner

H. Hölzl GmbH, über Hartenstein,
Würzburg

Elektronenmikroskop Zeiss EM10

Zeiss, Oberkochen

Elektrophorese System

BIO-RAD, München

Feinwaage A1 100

Mettler, Gießen

Fluoreszenzmikroskop Axiophot Stereo HB050 mit Quecksilberlampe Graphit-Blotkammer	Zeiss, Oberkochen
Heizblock	LMS, über Hartenstein, Würzburg
Homogenisator RW20	Liebisch, über Hartenstein, Würzburg Janke & Kunkel, über Hartenstein, Würzburg
Kippschüttler WS5	Edmund Bühler, Tübingen
Konfokales Laserscanning Mikroskop TCS-SP	Leica, Solms
Kühlzentrifuge RC5B	Sorvall, Du Pont, Bad Homburg
Kühlzentrifugen	Eppendorf, Hamburg
Laborwaage Mettler PJ 3600 DeltaRange®	Mettler, Düsseldorf
Magnetrührer M35	GLW, Würzburg
Mikroinjektor 5242	Eppendorf, Hamburg
Mikromanipulator	Leitz, Wetzlar
Mikromanipulator	Brinkmann Instrumentenbau, Mannheim
Mikroschmiede	Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
Minifuge RF	Heraeus-Christ, Osterode
pH-Meter pH 523	WTW, über Hartenstein, Würzburg
Proteingelkammer Mini V8	Gibco BRL
ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Weiterstadt
Sonifier B12	Branson Sonic Power Company, über Gerhard Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Spectrophotometer UVIKON 710	Kontron Instruments GmbH, Neufahrn
Stabilisiertes Netzgerät	Fischer, Heidelberg
Sterile Werkbank, Gelaire	Flow, Köln
Thermocycler TECHNE PROGENE	über Thermo-Dux, Wertheim
Thermostat 5322	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 3k30 kühlbar	Sigma, Deisenhofen
Tischzentrifuge Biofuge A	Heraeus-Christ, Osterode
Umkehrmikroskop IM 35	Zeiss, Oberkochen
Vertical Elektrophorese System	Gibco-BRL, Eggenstein
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich
Wasserbad	Köttermann, über Hartenstein, Würzburg

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Flüssigkultur von Bakterien

Lösungen:

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

2x YT-Medium 1 l: 16 g Bacto-Trypton (Gibco)
 10 g Hefeextrakt (Gibco)
 5 g NaCl
 pH 7,0-7,4 (NaOH)
 ⇒ autoklavieren

Antibiotika-Stammlösungen: Ampicillin: 50 mg/ml in H₂O bidest.
 Kanamycin: 50 mg/ml in H₂O bidest.
 Tetracyclin: 5 mg/ml in Ethanol (100 %, p.a.)

Für eine Übernachtskultur (ÜNK) wurden ca. 5 ml Medium in einem Greinerröhrchen vorgelegt und je nach verwendetem Bakterienstamm zur Selektion ein Antibiotikum zugesetzt. Ampicillin und Kanamycin wurden in Endkonzentrationen von 50 µg/ml eingesetzt, Tetracyclin wurde mit einer Konzentration von 15 µg/ml verwendet. Zum Animpfen wurde etwas Bakterienmaterial aus einer Glycerinkultur oder eine Bakterienkolonie von einer Agarplatte mit einer sterilen Pipettenspitze in das Medium überführt. Die Kultur wurde dann bei 37 °C über Nacht geschüttelt. Normalerweise wurde LB-Medium verwendet, bei manchen Anwendungen, wie z.B. einer in-vivo-Expression von Proteinen in Bakterien, ist 2x YT-Medium unter Umständen besser geeignet und liefert so höhere Ausbeuten.

3.1.1.1 *In vitro* Expression in Bakterien

Lösungen:

LB-Medium (siehe oben)

IPTG (Isopropyl β-D-Thiogalactosid, Appllichem): 1M in dH₂O

Für Flüssigkulturen zur in-vitro-Expression wurde zunächst eine ÜNK angesetzt (siehe oben). Mit 0,5-5 ml dieser ÜNK wurde dann am nächsten Tag die Kultur für die Proteinexpression angeimpft. Die Kulturen wurden in Volumina zwischen 20 und 1000 ml angesetzt, abhängig von der gewünschten Menge des zu exprimierenden Proteins, das z.B. für eine Aufreinigung für Folgeversuche zur Verfügung stehen sollte.

Es wurde eine Flüssigkultur aus *E. coli* XL1-Blue Bakterien (2.1.3) hergestellt, in die der Expressionsvektor mit der zu exprimierenden Proteinsequenz transformiert wurde (3.1.5). Bei Erreichen einer OD_{600} 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 Fusionsprotein wurde dann, wie unter 3.3.2 beschrieben, aufgereinigt.

3.1.2 Glycerinkultur

Um Bakterien langfristig aufzubewahren wurden Glycerinkulturen angesetzt. Zur Herstellung wurden 100-200 µl steriles Glycerin mit 900 µl einer ÜNK vermischt und bei -70°C gelagert. Um aus einer Glycerinkultur eine Flüssigkultur zu machen, wurde mit einer sterilen Pipettenspitze über die Glycerinkultur gestrichen und die anhaftenden Bakterien in ein mit LB-Medium gefülltes Greinerröhrchen überführt.

3.1.3 Bakterienkultur auf Agarplatten

Für die Herstellung von Agarplatten wurden 1,5% Agar (Select Agar, Gibco) in LB-Medium eingewogen und das Gemisch autoklaviert. Nachdem sich die Lösung nach dem Autoklavieren auf etwa 50°C abgekühlt hatte, wurde für Selektionsplatten ein Antibiotikum zugegeben, Ampicillin und Kanamycin in Endkonzentrationen von 50 µg/ml, Tetracyclin wurde mit einer Konzentration von 15 µg/ml verwendet. Der flüssige Agar wurde anschließend so in sterile Petrischalen gegossen, daß der Boden einer Schale gerade bedeckt war. Nach Erstarren des Agars wurden die Schalen umgedreht, um ein Auftropfen von Kondenswasser auf den Nährboden zu verhindern. So wurden die Platten über Nacht bei RT zum Trocknen aufbewahrt. Die kurzfristige Lagerung (3-4 Wochen) erfolgte bei 4°C.

Zur Herstellung von Plattenkulturen aus Flüssigkulturen wurden ca. 50-100 µl der Kultur auf die Platte pipettiert und anschließend mit einem sterilen Drygalski-Spatel ausgestrichen. Aus Glycerinkulturen wurden Bakterien mit Hilfe einer sterilen Impföse auf die Platte überführt und dort ausgestrichen.

3.1.4 Herstellen kompetenter Bakterien

Um Bakterien mit Plasmiden 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 (3.1.1)

TSS (Transformation and Storage Solution): LB-Medium

+ 10% (w/v) PEG 3350 oder 8000
+ 5% (v/v) DMSO
+ 20-50 mM Mg^{2+} ($MgSO_4$ oder $MgCl_2$)
pH 6,5

⇒ sterilfiltrieren und bei -20°C aufbewahren

Zunächst wurde eine ÜNK mit einer Einzelkolonie des gewünschten Bakterienstammes angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml der ÜNK angeimpft. Dieser Ansatz wurde bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,4 inkubiert, was nach ca. 2h der Fall war. Dann wurde die Kultur auf zwei 50 ml-Röhrchen verteilt und bei 1000xg und 4°C 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in $\frac{1}{40}$ des Ausgangsvolumens (2,5 ml) eiskaltem TSS aufgenommen und resuspendiert. Die Suspension wurde in Aliquots zu 100 µl auf vorgekühlte Eppendorf-Caps verteilt und dann in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -70°C und war mehrere Wochen möglich.

3.1.5 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

Lösungen:

LB-Medium (3.1.1)

Ein Aliquot (100 µl) kompetenter Bakterien wurde auf Eis aufgetaut (ca. 10 min) und mit 10-100 ng Plasmid-DNA vermischt. Der Ansatz wurde 5-60 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 900 µl LB-Medium zugegeben und das Gefäß 1h bei 37°C geschüttelt. Danach wurden zwei Verdünnungen auf entsprechenden Selektionsplatten ausgestrichen (je nach Antibiotikaresistenz, die das transformierte Plasmid trägt). Zunächst wurden 100 µl entnommen und ausgestrichen ($\frac{1}{10}$), der Rest wurde bei 3000 rpm für 5 min in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 100 µl abgenommen, in denen das Pellet resuspendiert wurde. Anschließend wurde alles auf einer zweiten Platte ausgestrichen ($\frac{9}{10}$).

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Isolierung von RNA aus Zellen und Geweben

Lösungen:

peqGOLD TriFast™ (Phenolreagenz zur Isolierung von DNA, RNA und Proteinen)

Chloroform (frei von Zusätzen wie Isoamylalkohol)

Isopropanol

75 % Ethanol

DEPC-H₂O (H₂O_{bidest.} mit 0,1% DEPC versetzen und nach kurzer Inkubationszeit autoklavieren)

peqGOLD TriFast™ ist ein gebrauchsfertiges Reagenz, das die gleichzeitige Isolierung von RNA, DNA und Proteinen aus vielerlei Materialien ermöglicht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Reagenz zur RNA-Isolierung aus Kulturzellen und Oocyten von *Xenopus laevis* verwendet. Die Durchführung erfolgte weitestgehend nach den Angaben im Herstellerprotokoll.

Um RNA aus Kulturzellen zu isolieren, wurden diese im Monolayer kultiviert, wobei die relative Ausbeute an mRNA höher ist, wenn die Zellen noch nicht konfluent sind (sie

bilden noch keine geschlossene Zellschicht auf dem Schalenboden), da in diesem Zustand die Genexpression und damit die mRNA-Transkription bestimmter Gene stark herunterreguliert wird. Die Zellen wurden in PBS mit einem Gummischaber vom Schalenboden abgelöst und die Suspension dann in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach kurzer Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes wurde ca. 1 ml TriFast™ pro 10^7 Zellen zugegeben. Die Probe wurde durch pipettieren resuspendiert. Für die Gewinnung von RNA aus Oocyten wurden ca. zehn reife Oocyten in 1 ml TriFast™ durch pipettieren homogenisiert.

Wurde die isolierte RNA nicht sofort weiterverarbeitet, dann wurde das Protokoll nur bis zum ersten Waschschrift durchgeföhrt und die RNA in 75% Ethanol bei -20°C aufbewahrt. Ansonsten wurde die RNA in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ aufgenommen und die Konzentration wurde photometrisch bestimmt (siehe 3.2.10). Die RNA wurde in einer Konzentration von $\sim 1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ für die RT-PCR verwendet und konnte bei -20°C einige Wochen aufbewahrt werden.

3.2.2 RT-PCR

RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) ist die Bezeichnung für den zweistufigen Prozeß der Amplifikation von mRNA Sequenzen in Form von cDNA (complementary DNA). Zunächst wird die gesamte mRNA eines Zelltyps mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in DNA übersetzt. Da mRNA nur aus Exons besteht, unterscheidet sich die bei dieser Prozedur entstehende cDNA von genomischer DNA. Spezifische cDNAs werden anschließend durch PCR (3.2.3) mit den entsprechenden Primern amplifiziert. Dadurch wird eine, für ein Protein kodierende, Sequenz isoliert und kann zur Sequenzierung und Expression in entsprechende Vektoren kloniert werden. Es können auch verschiedene transkribierte Isoformen einer RNA, Splicevarianten oder, je nach Wahl der PCR-Primer, homologe Transkriptionsprodukte identifiziert werden.

Die RT wurde mit Gesamt-RNA (3.2.1) durchgeföhrt, indem ein Oligo(dT)-Primer als Ansatzpunkt für die reverse Transkriptase verwendet wurde. Dieser Primer bindet an den Poly(A)-Schwanz, der ausschließlich am 3'-Ende von mRNAs angehängt wird. Somit stehen nur mRNAs als „template“ (Vorlage zur Produktion einer komplementären Kopie durch Polymerasen) zur Verfügung. Alternativ kann auch Poly(A)-RNA gereinigt und als Ausgangsmaterial eingesetzt werden.

Durchföhrtung:

1 μl **Gesamt-RNA** ($\sim 1\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
1 μl **Oligo(dT)-Primer** ($0,5\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Promega)
ad. 5 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$

Dieser Ansatz wurde gemischt, kurz zentrifugiert und dann 2 min bei 72°C denaturiert. Nach 2 min Inkubation wurde wiederum kurz zentrifugiert und dann der RT-Ansatz wie folgt komplettiert:

2 μl **5x First-Strand Buffer** (Gibco)
1 μl **DTT** (20 mM, Gibco)
1 μl **dNTP-Mix** (10 mM, MBI)
1 μl **RT-Superscript II** ($200\text{ U}/\mu\text{l}$, Gibco)

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

3.2.3 PCR

Durch die Polymerase-Kettenreaktion lassen sich selektiv DNA-Sequenzen nach folgendem Prinzip vervielfältigen. Bei hoher Temperatur denaturiert („schmilzt“) doppelsträngig vorliegende DNA, d.h. es trennen sich die zwei Einzelstränge. Mit Hilfe einer DNA-Polymerase lassen sich die entstandenen Einzelstränge kopieren. Hierfür benötigt die Polymerase Primer, die an beiden Seiten der zu amplifizierenden Sequenz binden. Die Kopienanzahl dieser DNA wird verdoppelt und durch mehrere Wiederholungen der Reaktionen wird die Menge der spezifischen DNA-Sequenz exponential vervielfacht.

Aufgrund dieser zyklischen Wiederholung bietet sich die Automatisierung der PCR an. Dies wird durch die Verfügbarkeit von thermostabilen DNA-Polymerasen ermöglicht, welche durch die Denaturierungstemperatur von 96°C nicht zerstört werden und so nicht nach jedem Zyklus erneut zugegeben werden müssen. Ein automatisch geregelter Heizblock (Thermocycler) wird so programmiert, daß nach der Denaturierung die Proben auf die sogenannte Annealing-Temperatur gebracht werden. Bei dieser Temperatur binden die im Überschuß vorliegenden Primer spezifisch an die komplementären Sequenzen der einzelsträngigen „template“-DNAs. Schließlich wird die Elongationstemperatur der Polymerase von 72°C eingestellt und die komplementären DNA-Stränge werden synthetisiert. Dieser Zyklus wird 25-40 mal wiederholt um ausreichende cDNA-Mengen für Folgeversuche zu amplifizieren.

Primer und Primerdesign:

Der Erfolg einer PCR hängt hauptsächlich von den verwendeten Primern ab, die folgende Eigenschaften besitzen sollten. Sequenzen die eine Hybridisierung mit sich selbst oder dem anderen Primer ermöglichen sollten vermieden werden. Die Schmelztemperaturen der beiden verwendeten Primer sollten sich um höchstens 1-2°C unterscheiden und der G/C-Gehalt ihrer Sequenzen zwischen 40 und 60% liegen. Die Schmelztemperatur gibt an bei wieviel Grad sich der Primer vom Template-Strang ablöst. Für kurze Oligonukleotide (Länge von Standardprimern: ~18-30 Nukleotide) kann diese Temperatur (T_m) mit folgender Formel annähernd berechnet werden:

$$T_m = 2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) + (\text{G}+\text{C}) \quad \text{wobei A, T, G, C = Anzahl der entsprechenden Basen}$$

Die PCR-Reaktion ist um so spezifischer, je näher die Annealing-Temperatur bei der Schmelztemperatur der beiden Primer liegt. Die Annealing-Temperatur wurde anfangs meist ca. 5°C unter T_m gewählt und bei unspezifischer Amplifikation nach oben oder bei nicht erfolgter Amplifikation nach unten korrigiert.

„Degenerierte“ Primer:

Um spezifische Primer verwenden zu können muß zumindest ein Teil der Nukleotidsequenz der zu amplifizierenden DNA bekannt sein. In der vorliegenden Arbeit sollte die Nukleotidsequenz von p52 ermittelt werden (siehe 1.4.1 und 4.2). Es lagen lediglich Aminosäuresequenzen von Peptiden des Antigens vor. Da jeweils mehrere Basentriplets für eine Aminosäure kodieren können (Degeneration des genetischen Codes), wurden alle möglichen für diese Aminosäuren kodierenden Nukleotidsequenzen ermittelt. Es wurden Oligonukleotide zur Amplifikation der Nukleotidsequenz ausgewählt, welche für die unbekannte, zwischen den sequenzierten Peptiden liegende Aminosäuresequenz von p52 kodiert (Abb. 3.1). Die Vielfalt der Sequenzen wurde reduziert, indem teilweise nur die bei *Xenopus* gebräuchlichsten Codons berücksichtigt wurden. Eine Mischung aus allen Oligonukleotiden wurde hergestellt (Physiologische Chemie I, Uni Würzburg) und als „degenerierte“ Primer für die RT-PCR verwendet.

	5'Primer	3'Primer
Aminosäuresequenz	N L N D R L A	I Q P D H V E
Primer 5'→3'	AACCTGAACGATAGACTGGCAT T T T C G T T	TATCTGGGGGTCATGXACTTC G T A A G C A T

Abb. 3.1: Ableitung der degenerierten Primer für die RT-PCR. Die Aminosäuren sind über die für sie kodierenden Basentriplets zentriert. Die Sequenz des 3'Primers muß revers und komplementär gelesen werden um die entsprechende Aminosäuresequenz zu erhalten. An der dritten Position jedes Codons sind die verschiedenen verwendeten Basen übereinander aufgelistet, wobei X für eine beliebiges Nukleotid steht. Die degenerierten Primer bestehen demnach aus Mischungen von 128 (5') bzw. 576 (3') Oligonukleotiden.

Die für die PCR eingesetzte Menge (400 pmol je Primermischung in einem 50 µl Ansatz) und die Annealing-Temperatur (52°C) wurden empirisch ermittelt. Es wurde ein 918 bp Produkt amplifiziert, das für die ausgewählten Peptidsequenzen kodierte. Aus dieser Sequenz wurden spezifische Primer zur Produktion der gesamten cDNA durch RACE (3.2.4) gewählt.

Durchführung:

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Tfl-Polymerase (Promega) verwendet, die aus *Thermus flavus* isoliert wurde. Diese Polymerase hat die Eigenschaft, daß sie einen Überhang aus A-Nukleotiden am 3'-Ende des Produkts anhängt, welches somit direkt kloniert werden kann (siehe 3.2.7).

10-100 ng **DNA** (oder 2 µl aus einer RT)
 3 µl **MgSO₄** (25 mM, Promega)
 5 µl **10x Reaction Buffer** (Promega)
 1 µl **dNTP-Mix** (10 mM, MBI)
 1 µl **5'-Primer** (100^{pmol}/µl, Interactiva)
 1 µl **3'-Primer** (100^{pmol}/µl, Interactiva)
 1 µl **Tfl DNA-Polymerase** (5^U/µl, Promega)
 ad. 50 µl H₂O_{bidest.}

Der Ansatz wurde in ein 0,5 ml-PCR-Cap pipettiert, wobei die Polymerase zum Schluß zugegeben wurde. Das Ganze wurde gut vermischt und im Thermocycler mit folgendem Programm inkubiert:

Denaturierung 1 min, 96°C

25-35 Zyklen:

Denaturierung 15 sec, 96°C
Annealing 30 sec, 50-65°C (Primerabhängig, siehe Tabelle 3.1)
Elongation 1-3 min, 72°C (1 min pro 1000 Nukleotide)

finale Elongation 10 min, 72°C
Kühlung 4°C

Die Analyse der PCR-Reaktion erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese (3.2.5).

Protein	Datenbank (Acc. no., cDNA)	Primer (5'→3')		T _m (°C)	T _a (°C)	Produkt (bp)
mRPA53	NM_022811	5'	GGATCCATGGCTACTCTGGAGTCTCC	61,2	56	1319
		3'	GGTTCATTTTCCTCCGCTTTGACTG	60,9		
<i>Anmerkung: 5' mRPA53Bam, 3' mRPA53-tag+1 zur Umklonierung aus pBl (siehe 2.2.2) in GFP/RFP N1</i>						
hRPA53	AK024032	5'	ATGGCGGCGGAGGTGTTG	58,9	60	1258
		3'	TGGTAATCTTCCTCCGCTTTGCC	60,3		
<i>Anmerkung: Datenbank-cDNA ist homolog zu mRPA53, experimentell nicht bestätigt RT-PCR aus Hep2-RNA, 3' hRPA53-tag+1 zur Klonierung in GFP/RFP N1</i>						
hFibrillarin	XM_042682	5'	GCCATGAAGCCAGGATTCAGTCCC	63,6	55	966
		3'	GGTTCTTCACCTTGGGGGGTGGC	65,2		
<i>Anmerkung: RT-PCR aus Hep2-RNA, 3' hFib-tga+1 zur Klonierung in GFP/RFP N1</i>						
hB23	BC002398	5'	ATGGAAGATTCGATGGACATG	51,3	50	882
		3'	AAGAGACTTCTCCACTGCCAG	54,1		
<i>Anmerkung: RT-PCR aus Hep2-RNA, Klonierung in GFP C2 3' hB23-taa+1 zur Klonierung in GFP/RFP N1</i>						
hL10	XM_018114	5'	ATCCTGGTGTGCGCCATGGGC	61,4	60	657
		3'	GTGAGTGCAGGGCCCGCC	60,9		
<i>Anmerkung: RT-PCR aus Hep2-RNA, 3' hL10-tga+1 zur Klonierung in GFP/RFP N1</i>						
xL10	ESTs	5'	CATGGGTCGCCGCTCCTGCC	63,0	60	645
		3'	GCAGCATGAATTGCTCTCCATTTGTC	61,8		
<i>Anmerkung: Konsensussequenz aus 15 ESTs (expressed sequence tags) homolog zu hL10. RT-PCR aus A6-RNA, 5' xL10+1, 3' xL10-tag zur Klonierung in GFP/RFP N3/C1</i>						
hL4	NM_000968	5'	CATGGCGTGTGCTCGC	52,1	50	1281
		3'	TGCAGCAGGCTTCTTCTCC	52,9		
<i>Anmerkung: RT-PCR aus Hep2-RNA, kloniert von Ufuk Karatas</i>						
xCK19/1, 3	-	5'	CCTGACACAGCTACCATGACC	51,8	52	1: 1448 3: 1474
		3'	GTGGCAGTGGGAAAAGTAATG	51,4		
xCK19/2	-	5'	RACE anchor primer (3.2.4)	59,0	60	1446
		3'	GGACTTCTGGTCTCAAGGTGCTAGA	57,0		
<i>Anmerkung: RT-PCR aus A6-RNA und Oocyten-RNA zur Klonierung in GFP-C2 Komplette cDNAs (4.2.1) wurden nach RACE ermittelt (3.2.4)</i>						
xCK19/1	-	5'	GGATCCCCTGACACAGCTACCATGAC			1329
		3'	GGATCCGTGTGATCATGCACTTCTAGT			
<i>Anmerkung: RT-PCR aus A6-RNA und Oocyten-RNA zur Klonierung in GFP-N3 und GFP-NLS</i>						

Tabelle 3.1: Primer zur Amplifikation der in dieser Arbeit klonierten cDNAs. Acc. No. (Accession number): Identifikationsnummer der klonierten cDNAs in öffentlichen Datenbanken. T_m: Errechnete Schmelztemperatur (siehe oben). T_a: Annealingtemperatur der durchgeführten PCR. Alle Details zur Klonierung in Expressionsvektoren sind in den Anmerkungen zusammengefasst.

3.2.4 RACE

Durch RT-PCR mit degenerierten Primern (Abb. 3.1) wurde ein Fragment der cDNA von p52 amplifiziert (3.2.3). Zur Ermittlung der vollständigen Nukleotidsequenz wurden die 5'- und 3'-Enden der cDNA durch 5'- bzw. 3'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) synthetisiert. Es wurde das 5'/3' RACE Kit der Firma Boehringer verwendet (Abb. 3.2).

Beim 3'-RACE wird der poly (A)-Schwanz genutzt um mit einem Oligo dT primer die RT durchzuführen. Mit diesem primer wird am 3'-Ende eine zusätzliche Sequenz an die cDNA gehängt, die als spezifische primer-Bindungsstelle in der nachfolgenden PCR fungiert. Mit einem spezifischen primer (Sp4) aus der bekannten Sequenz und dem PCR anchor primer wird das gesamte 3'-Ende der cDNA amplifiziert. Dasselbe Prinzip kann im 5'-RACE angewandt werden, indem am 3'-Ende der cDNA (entspricht dem 5'-Ende der mRNA) durch das Enzym Terminale Transferase ein poly (A)-Schwanz angehängt wird. Durch PCRs mit entsprechenden primern wird das 5'-Ende der cDNA synthetisiert (siehe Abb.3.2).

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerprotokoll. Es wurden hierbei die in 4.2.1 dargestellten Sequenzen der xCK19 Isoformen identifiziert. Durch die in 3.2.3 angegebenen PCR-primere wurden die Gesamt-cDNAs zur Klonierung amplifiziert.

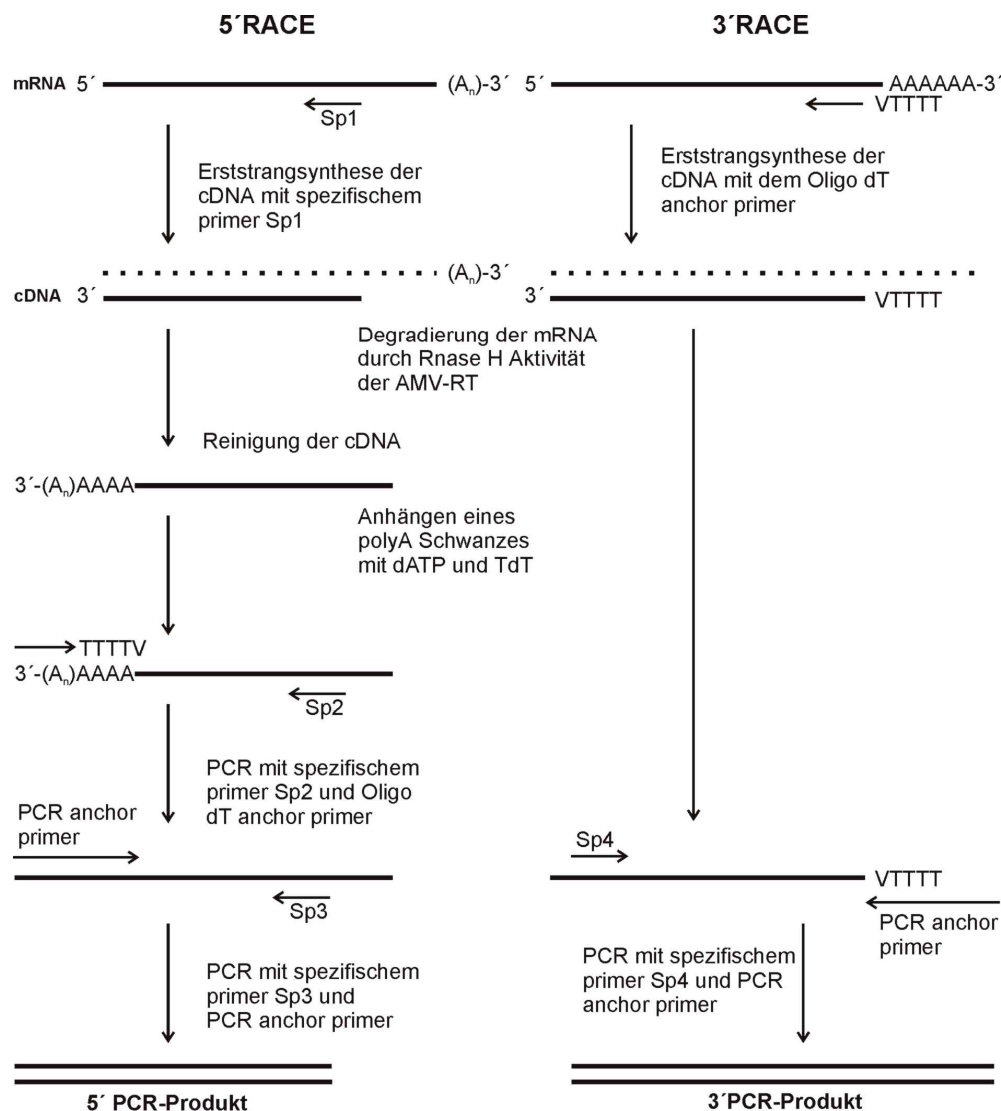
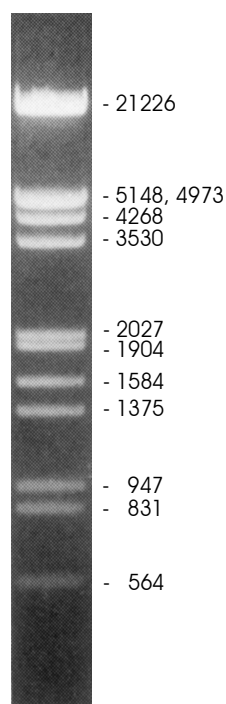


Abb. 3.2: Prinzip des RACE. (Boehringer) AMV-RT: AMV Reverse Transkriptase. TdT: Terminale Transferase.

3.2.5 Auftrennung von DNA-Molekülen durch Agarose-Gelelektrophorese

Aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatreste verhalten sich DNA-Moleküle in wässrigen Lösungen, an die ein elektrisches Feld angelegt wird, als Anionen. Bei deren Wanderung durch eine in die wässrige Lösung integrierte Trägermatrix (also ein Agarosegel), ist die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA u.a. direkt abhängig vom Vernetzungsgrad der Matrix und von der Größe der DNA-Moleküle. Große DNA-Moleküle werden dabei durch die Matrix mehr zurückgehalten als kleine. Die Größe von DNA-Molekülen gleicher Konformation, also linearisierte DNA-Fragmente, kann so verglichen werden. Zudem können die einzelnen DNA-Fragmente nach der Auftrennung einfach aus der Agarose isoliert werden (3.2.6). Durch Variation der Agarosekonzentration lassen sich verschiedene Größenbereiche unterschiedlich gut auftrennen (Abb. 3.3).



Agarose	effiziente Auftrennung
0,3%	5-60 kb
0,6%	1-20 kb
0,7%	0,8-10 kb
0,9%	0,5-7 kb
1,2%	0,4-6 kb
1,5%	0,2-3 kb
2,0%	0,1-2 kb

Abb. 3.3: DNA-Elektrophorese im Agarosegel.

Links: Größenstandard für die DNA-Elektrophorese. DNA des λ -Phagen mit *EcoRI* und *HindIII* geschnitten. 1 μ g DNA aufgetragen auf ein 0,8% Agarosegel.

Rechts: Länge der DNA-Fragmente die effizient aufgetrennt werden, in Abhängigkeit von der Agarosekonzentration.

Lösungen:

50 x TAE: 242 g Tris
57,1 ml konz. Essigsäure
100 ml 0,5 M EDTA (pH 8);
mit dH₂O auf 1000 ml auffüllen

Probenpuffer: (MBI Fermentas)
Ethidiumbromid (EtBr): (Stammlösung: 10 mg/ml)

Durchführung:

Eine Gelkammer (Gibco) für Agarosegele wurde an den Rändern mit Tesafilm abgedichtet und mit einem entsprechendem Kamm bestückt. Anschließend wurde Agarose (low EEO, Applichem) in der gewünschten Konzentration in 1 x TAE aufgeköcht, bis sie vollständig

gelöst war. Nachdem die Lösung auf etwa 60°-70°C abgekühlt war, wurde EtBr hinzugegeben (Endkonzentration 1 µg/ml). Die Lösung wurde dann sofort in die abgedichtete Kammer gegossen; die Zähne des Kammes sparten dabei die Taschen aus, in die später die DNA-Proben eingefüllt wurden. Nach Erstarren des Gels wurden Kamm und Klebestreifen vorsichtig entfernt und das Gel in die Laufkammer gelegt. Laufpuffer (1 x TAE) wurde eingefüllt. Die zu analysierenden DNA-Proben hatten ein Volumen von 10-20 µl und wurden zuvor mit 1/10 Volumen des 10 x RNA/DNA-Probenpuffers versetzt. Als Größenstandard wurde die mit den Restriktions-enzymen *EcoRI* und *HindIII* geschnittene DNA des λ-Phagen aufgetragen (siehe Abb. 3.2). Nach dem Auftrag der Proben wurde eine Spannung an das Gel angelegt (1-10 V/cm). Die Farbfront des Probenpuffers ermöglicht die Kontrolle der Laufzeit. Die durch das Ethidiumbromid gefärbten DNA-Banden wurden mit einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und über eine Videokamera mit angeschlossenem Printer dokumentiert.

3.2.6 Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* der Firma Qiagen durchgeführt. Die gewünschten Banden wurden mit einer Skalpellklinge aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend wurde die DNA aus dem Gelstück eluiert. Vorgegangen wurde dabei nach Herstellerprotokoll, die eluierte DNA wurde in 30 µl H₂O_{bidest.} aufgenommen.

Es wurde Agarose (low EEO, Applichem) verwendet, die eine niedrige Bindungsaffinität zu Nukleinsäuren besitzen, was die Elution der DNA erleichtert und somit höhere Ausbeuten möglich macht. Die eluierte DNA stand ohne weitere Bearbeitungsschritte für Folgeversuche zur Verfügung.

3.2.7 Klonierung von PCR-Fragmenten in den pCR[®]2.1-Vektor

Die Klonierungsmethode des *TOPO TA Cloning[®] Kits* (Invitrogen) macht sich die Tatsache zu Nutze, daß Taq- und Tfl-Polymerasen durch ihre terminale Transferase-Aktivität einen 3'-Überhang aus Deoxyadenosinen an das PCR-Produkt anfügen. Der Vektor liegt in linearisiertem Zustand vor und besitzt einen 3'-Überhang aus Thymidinen. 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 3'-A-Überhang schnell in den Vektor integriert, wobei das Enzym dissoziiert (Abb. 3.4). Diese Methode erlaubt auch eine Vorauswahl möglicher positiver Klone über Blau/Weiß-Selektion, wobei die positiven, also die Klone mit integriertem PCR-Produkt, weiß bleiben, während die Klone ohne Insert blau werden. Ohne Insert wird das *lacZ*-Gen exprimiert und X-Gal als Substrat der β-Galaktosidase gespalten, wobei ein blauer Farbstoff entsteht. Das PCR-Produkt inseriert zwischen Promotor und *lacZ*-Gen, so daß keine Expression dieses Gens mehr möglich ist. Nach der Ligation wurde der Ansatz in chemisch kompetente *E. coli* TOP10F' (Invitrogen) transformiert. Die Transformation wurde dann in zwei Verdünnungen auf LB_{Amp}-Platten (mit X-Gal für Blau/Weiß-Selektion) ausgestrichen.

Durchführung:

PCR-Produkt	0,5-4 µl
TOPO[®]-Vektor	1 µl
H ₂ O _{bidest.}	ad. 5 µl
Salzlösung (ermöglicht längere Inkubation)	1 µl

3.2.8.2 Dephosphorylierung des Vektors

Die Dephosphorylierung wurde durchgeführt, um die Autoligationsrate des Vektors zu vermindern, da die Ligase phosphorylierte Enden für eine Ligation benötigt.

Die Vektor-DNA wurde zunächst linearisiert. Das dazu verwendete Restriktionsenzym wurde hitzeinaktiviert (10 min, 85°C) und die DNA wurde mit Natriumacetat und Ethanol gefällt (siehe 3.2.12). Das Pellet wurde so in H₂O_{bidest.} resuspendiert, daß in 1 µl etwa 100 ng DNA enthalten waren.

Durchführung:

100-150 ng	linearisierter Vektor
0,5 µl	10x SAP-Puffer (Roche)
ad. 4 µl	H ₂ O _{bidest.}
1 µl	SAP (Shrimp alkalische Phosphatase) (1 U/µl, Roche)

Der Ansatz wurde gemischt und 1-2h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym 15 min bei 65°C hitzeinaktiviert. Der Ansatz wurde bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt, was mehrere Wochen möglich war.

3.2.8.3 Ligation und Transformation

Durchführung:

5 µl (100-150 ng)	Vektor (Dephosphorylierungsansatz).
300 ng	Insert (ca. 3fache molekulare Menge im Vergleich zum Vektor)
1,5 µl	10x T4 DNA-Ligase-Puffer (MBI)
ad. 19 µl	H ₂ O _{bidest.}
1 µl	T4 DNA-Ligase (5 U/µl, MBI)

Der Ansatz wurde vermischt und 30-60 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ligationsansatz für eine Transformation in kompetente Bakterien eingesetzt (siehe 3.1.5).

3.2.8.4 Überprüfung der erhaltenen Klone

Die Klone wurden über Restriktionsverdau (siehe 3.2.11) auf eine erfolgreiche Ligation hin überprüft. Außerdem wurde getestet, in welcher Orientierung das inklonierte DNA-Fragment in den Vektor inseriert hatte. Dazu wurde ein Restriktionsverdau mit geeigneten Enzymen im Vektor und der Insert-DNA durchgeführt (Abb. 3.5), oder der Klon wurde sequenziert (siehe 3.2.13).

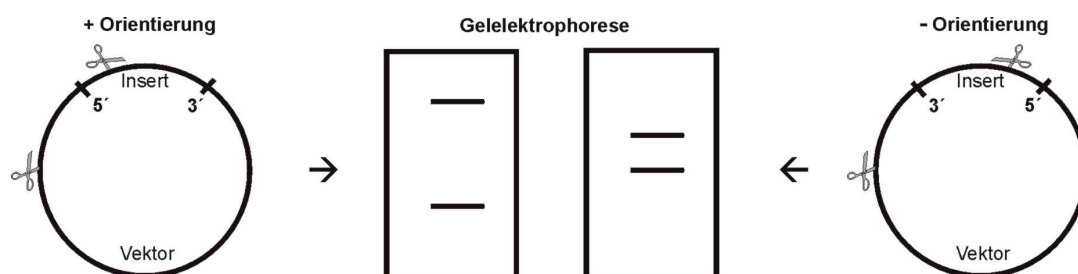


Abb. 3.5: Schnelle Bestimmung der Insert-Orientierung. Restriktionsverdau eines rekombinanten Plasmids mit einem Enzym dessen Schnittstelle je einmal in Vektor und Insert vorliegt. Durch die gelelektrophoretische Auftrennung der entstehenden Fragmente kann die Orientierung des Inserts eindeutig bestimmt werden.

3.2.9 Gewinnung von Plasmid-DNA

3.2.9.1 GTE-System (alkalische Lyse)

Diese schnelle Präparationsmethode (Li et al., 1997) wurde vor allem verwendet um nach einer Ligation erhaltene Klone auf die erfolgreiche Insertion der zu klonierenden DNA zu überprüfen (siehe 3.2.8.4).

Lösungen:

Lösung 1 (GTE-Puffer): 50 mM Glucose
 10 mM EDTA
 25 mM Tris/HCl, pH 8,0
 + 1 Spatelspitze RNase A
 ⇒ Lagerung bei 4°C

Lösung 2 (Lysispuffer): 0,2 N NaOH
 1% (w/v) SDS

Lösung 3 (Kaliumacetatlösung): 60 ml Kaliumacetatlösung (5M)
 11,5 ml Eisessig
 28,5 ml H₂O_{bidest.}

100% Ethanol (p.a., auf Eis vorkühlen)

Durchführung:

Plasmide wurden in ÜNKs der entsprechenden Bakterienklone vermehrt (siehe 3.1.1). 1,5 ml dieser ÜNK wurde in ein frisches Eppendorf-Cap überführt und 30 sec bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl GTE-Puffer durch Vortexen resuspendiert. Danach wurden 200 µl Lösung 2 zugegeben und durch mehrmaliges Invertieren des Caps gemischt. Zum Schluß wurden 150 µl Lösung 3 zugegeben und der Ansatz kurz kräftig geschüttelt. Nach 30 sec Zentrifugation bei 13000 rpm zum Pelletieren der Zelltrümmer wurden 400 µl des Überstandes in ein frisches Gefäß überführt und 400 µl eiskaltes Ethanol (100%, p.a.) zugegeben. Beim Abnehmen des Überstandes war darauf zu achten, daß kein ausgefallenes SDS mit verschleppt wurde, weil dies nachfolgende Reaktionen stören könnte. Für eine höhere Reinheit der Präparation wurde der gesamte Überstand in ein frisches Cap überführt und dann 400 µl des Überstandes nach einer weiteren 5minütigen Zentrifugation abgenommen, in ein frisches Cap gegeben und mit Ethanol versetzt. Der Ansatz wurde kurz gemischt und dann sofort 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand sorgfältig abgenommen und das Pellet 5-10 min luftgetrocknet. Zum Schluß wurde das Pellet in 30 µl H₂O_{bidest.} aufgenommen. Von der GTE-Plasmid-Präparation wurden 8 µl in einem Restriktionsverdau (siehe 3.2.11) eingesetzt.

3.2.9.2 Qiagen Plasmid Mini-Prep

Diese Methode ist 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. H₂O_{bidest.}) bei pH 7,0-8,5 eluiert. Die durch diese Methode gewonnene Plasmid-DNA besitzt eine sehr hohe Reinheit und ist somit auch für empfindliche Reaktionen wie die Sequenzierung und in vitro/in vivo Expressionen einsetzbar.

Durchgeführt wurde die Qiagen Plasmid Mini-Prep nach Herstellerprotokoll, ausgehend von 5 ml UNKs. Eluiert wurde mit 50 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$, was normalerweise zu Konzentrationen zwischen 250 und 400 $\text{ng}/\mu\text{l}$ führte.

3.2.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der gewonnenen DNA und RNA wurde photometrisch (Biophotometer, Eppendorf) über die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen (Nukleinsäuren besitzen dort ihr Absorptionsmaximum). Gemessen wurde eine 1:20-Verdünnung gegen einen entsprechenden Leerwert. Die Konzentrationen verschiedener Nukleinsäuren die einer OD_{260} von 1 entsprechen sind in Tabelle 3.2 aufgeführt. Aus den Quotienten $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ und $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ konnten Aussagen über die Reinheit der Probe getroffen werden. Die Absorption bei 280 nm spiegelt die Verunreinigungen durch Proteine wider, während Peptide, aromatische Verbindungen und Kohlenhydrate bei 230 nm ihr Absorptionsmaximum haben. In Tabelle 3.2 sind Quotienten reiner Proben aufgeführt.

	$\text{OD}_{260} = 1$ entspricht	$\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} \geq$	$\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230} \geq$
dsDNA	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1,8	2,2
ssDNA	37 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1,8	2,2
RNA	40 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2,0	2,2
Oligonukleotide	30 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1,8	2,2

Tabelle 3.2: Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren.

3.2.11 Restriktionsverdau

Restriktionsverdaus wurden durchgeführt zur Umklonierung von DNA-Fragmenten, zur Linearisierung von Vektoren und zur Analyse von Klonen, um festzustellen, ob ein Insert in den Vektor ligiert hatte und um die Orientierung des Inserts im Vektor herauszufinden.

Die in der Molekularbiologie verwendeten Restriktionsenzyme sind fast ausschließlich Endonukleasen der Klasse II und spalten doppelsträngige DNA innerhalb bestimmter Zielsequenzen. Diese Sequenzen sind meist 4-8 bp lang und besitzen eine palindrome Struktur. Innerhalb der Zielsequenz wird in beiden DNA-Strängen je eine bestimmte Phosphodiester-Bindung hydrolysiert. Diese sind entweder um 2-6 bp versetzt, es entstehen kohäsive (sticky) Enden, oder auf gleicher Höhe, wodurch glatte (blunt) Enden entstehen. Schnittstellen mit überhängenden Enden können effizient mit komplementären Enden ligiert werden, die mit demselben Enzym geschnitten wurden, was man sich auch bei der Umklonierung von DNA-Fragmenten zu Nutze machen kann.

Durchführung:

1 μg	Plasmid-DNA
1 μl	10x Puffer (passend zum verwendeten Enzym)
ad. 9 μl	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$
1 μl	Restriktionsenzym (10U/ μl)

Der Ansatz wurde gemischt und 1-2h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde $1/10$ Volumen 10x DNA-Probenpuffer zugegeben und der Verdau im Agarosegel analysiert (siehe 3.2.5).

3.2.12 Fällung von Nucleinsäuren (DNA und RNA)

Nucleinsäuren (DNA und RNA) wurden bei Bedarf mit Natriumacetat und Ethanol gefällt. Dazu wurde der DNA-Lösung zunächst $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M Na-Acetate pH 5,2 und dann 2,5 Volumina 100% Ethanol (p.a.) zugegeben. Standardmäßig wurden Nucleinsäuren in 100 μ l-Ansätzen gefällt, kleinere Ansätze von Verdauungen oder Sequenzierungen wurden auf 100 μ l aufgefüllt. Der Ansatz wurde gemischt und anschließend 20-30 min bei 12000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet 2 mal mit 70% Ethanol gewaschen. Zum Waschen wurde das 70%ige Ethanol auf das Pellet pipettiert und anschließend bei 12000xg für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das Pellet schließlich in der gewünschten Menge Puffer gelöst. Zur Erhöhung der Ausbeute konnte Glykogen in einer Endkonzentration von 26 μ g/ml (bei 100 μ l-Ansatz entsprach das 2,6 μ l einer SL mit 10 μ g/ml) zusätzlich zum Na-Acetate und Ethanol zugegeben werden. Zentrifugiert und gewaschen wurde analog zur Standardmethode ohne Glykogen.

3.2.13 DNA-Sequenzierung

Durch kontrollierten Kettenabbruch der Replikation können DNA-Sequenzen ermittelt werden. Diese Methode wurde von Frederick Sanger 1977 entwickelt und beruht auf folgendem Prinzip. 2', 3'-Dideoxynucleosidtriphosphate blockieren die weitere Verlängerung eines DNA-Fragmentes durch die DNA-Polymerase. Da das 3'-Hydroxylende in diesen dNTP-Analoga fehlt, kann keine weitere Phosphodiesterbindung geknüpft werden. Somit entstehen in einem in vitro Replikationssystem mit radioaktiv markierten dNTPs und ddNTPs einzelsträngige DNA-Stücke mit verschiedenen Längen, die man in einem spezifischen Gelsystem auftrennen und durch Autoradiographie sichtbar machen kann.

Bei der Methode des „Terminator Cycle Sequencing“ (Applied Biosystems, Weiterstadt) wird das Prinzip der „Polymerase Chain Reaction“ (PCR) mit der Dideoxymethode nach Sanger (1977) gekoppelt: Es wurden 2', 3' ddNTPs (A, C, G, U) verwendet, die jeweils mit einem von vier fluoreszierenden Farbstoffen gekoppelt waren, wodurch keine Radioaktivität benötigt wurde. Desweiteren wurde eine Variante der Taq DNA Polymerase eingesetzt, die ihre enzymatische Aktivität beibehält, selbst wenn sie mehrmals bis auf 98°C erhitzt wird. Die zu sequenzierende DNA wurde denaturiert, so daß ein spezifischer Primer daran binden und somit eine Einzelstrang-Synthese durch die Taq Polymerase ablaufen konnte. Da sich in einem bestimmten Verhältnis dNTPs und ddNTPs in dem Reaktionsgemisch befanden, wurde die Synthese an den Stellen abgebrochen, an denen gerade ein ddNTP eingebaut wurde. Dies erfolgt statistisch gesehen an jedem Nucleotid mit gleicher Wahrscheinlichkeit, wodurch Fragmente entstehen, die jeweils um ein Nucleotid länger sind als das Vorherige. Die so entstandenen DNA-Fragmente wurden in einem Gelsystem (Polyacrylamid) aufgetrennt und mit Hilfe eines Lasers detektiert. Da für eine Reaktion ein Primer eingesetzt wurde, der nur die Synthese in eine Richtung erlaubte, war nicht, wie bei der PCR, die Amplifikation eines spezifischen DNA-Abschnitts die Folge. In jedem Zyklus vollzog sich nur immer wieder eine kontrollierte Kettenabbruchreaktion in einer Richtung. Dies führte zur Vervielfältigung der einzelnen Fragmente und resultierte so in einer Verstärkung der Fluoreszenz der zu detektierenden Banden.

Durchführung:

200-500 ng	DNA
10 pmol	Primer
ad. 8 μ l	H ₂ O _{bidest.}
2 μ l	Premix (dNTPs, markierte ddNTPs, Taq-DNA-Polymerase, MgCl ₂ , Puffer, ABI PRISM® BigDye™ Ready Reaction Kit, Applied Biosystems).

Dieser Ansatz wurde gut vermischt und anschließend in einem Thermocycler bei folgendem Programm für 25 Zyklen inkubiert:

1.Schritt:	Denaturierung der DNA	30 sec	96°C
2.Schritt:	"Annealing" des Primers	15 sec	48°C
3.Schritt:	Polymerasereaktion	4 min	60°C

Die Annealing-Temperatur wurde je nach Primer gewählt, für Standard-Sequenzierprimer (T3, T7, M13 forward, M13 reverse) wurde sie auf 48 °C eingestellt.

Nach der Reaktion wurde der Ansatz mit Na-Acetat und Ethanol gefällt (siehe 3.2.12), das Pellet 5-10 min luftgetrocknet und in 25 µl TSR (Template Supression Reagent, Applied Biosystems) aufgenommen. Nach einer Inkubation für 2 min bei 90°C wurde der Ansatz kurz gevortext, dann kurz zentrifugiert und anschließend in ein Sequenzier-Cap mit aufgesetztem Septum überführt.

Die DNA-Fragmente wurden mit einem ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer aufgetrennt. Die markierten DNA-Fragmente werden durch eine Polymer-gefüllte Kapillare elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt. Die an die Fragmente gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe werden dann durch einen Laser angeregt und emittieren Licht mit jeweils einer spezifischen Wellenlänge. Das Licht wird durch einen Spektrographen aufgenommen und nach Wellenlänge getrennt. Es wird dann durch eine spezielle Kamera gesammelt die alle vier Fluoreszenz-Signale gleichzeitig detektiert. Die Lichtintensitäten werden von der zum Sequencer gehörenden Software aufgenommen, ausgewertet und als Sequenzdiagramm (Elektropherogramm) ausgedruckt.

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe von Internet-Datenbanken und Bearbeitungsprogrammen analysiert.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 *In vitro* Expression im Retikulozytenlysat

Zur eukaryotischen *in vitro* Translation von cDNAs wurde das TNT® (gekoppelte Transkription und Translation) Retikulozytenlysat System der Firma Promega verwendet. Im Retikulozytenlysat von Kaninchen wurde in den Vektor pCDNA3 (2.2.1.3) klonierte cDNA durch zugegebene T7-RNA-Polymerase transkribiert. Im gleichen Ansatz wurde die produzierte RNA unter Einbau zugegebener Aminosäuren translatiert. Zum direkten Nachweis des exprimierten Proteins durch Autoradiographie wurde dabei [³⁵S] Methionin verwendet. Zusätzlich wurde das Protein im Immunblot (3.3.10) nachgewiesen.

Durchführung: (Standardprotokoll des Herstellers)

25µl	TNT® Rabbit Reticulocyte Lysate
2µl	TNT® Reaktionspuffer
1µl	TNT® T7 RNA-Polymerase
1µl	Aminosäurenmix, ohne Methionin, 1 mM
2µl	[³⁵S] Methionin, 1175 Ci/mmol, 10 mCi/ml (ICN Pharmaceuticals, Irvine, USA)
1µl	Ribonukleaseinhibitor, 40U/µl
1µg	Plasmid-DNA
ad. 50µl	H₂O_{bidest.}

Die Reaktion wurde 90min bei 30°C inkubiert. Das Translationsprodukt wurde durch SDS-PAGE (3.3.7) und anschließender Autoradiographie (ÜN, -70°C) analysiert.

3.3.2 Aufreinigung von Fusionsproteinen

3.3.2.1 GST-Fusionsproteine

In Bakterien exprimierte GST-Fusionsproteine (siehe 3.1.1.1) wurden durch die Kopplung des GST-Anteils des Proteins an Glutathion-Sepharose beads aufgereinigt.

Lösungen:

PBS: 140mM NaCl
2,6mM KCl
6,4mM Na₂HPO₄ x 2H₂O
1,4mM KH₂PO₄
pH 7,4

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

1M MnCl
1M MgCl₂

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 (Glutathion-Sepharose 4B, Pharmacia Biotech) in ein Eppendorf-Cap gegeben und durch Zentrifugation für 5 min bei 500xg und RT pelletiert. Das Pellet wurde anschließend 2x mit PBS gewaschen, wobei nach jedem Waschschrift eine Zentrifugation erfolgte. Für einen 1L Proteinansatz benötigt man 500µl Sepharose.

Durchführung:

Die folgenden Mengenangaben beziehen sich auf einen 1L Kulturansatz.

Das Bakterienpellet wurde in 10ml Resuspendierungspuffer aufgenommen. Nach Zugabe von 26µl MnCl (1M) und 260µl MgCl₂ (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 pelletiert. Der 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 konnten nun über SDS-PAGE und Immunblot kontrolliert werden (siehe 3.3.7, 3.3.10). Die Proteine wurden zur Mikroinjektion (3.4.4) und zu Bindungsstudien eingesetzt (3.3.4)

3.3.2.2 His-tag Fusionsproteine

Zur Reinigung bakteriell exprimierter His-Fusionsproteine wurde das QIAexpress System der Firma Qiagen verwendet. Im pQE-30 Vektor (2.2.1.2) klonierte cDNA wurde wie unter 3.1.1.1 beschrieben exprimiert. Durch die Fusion mit sechs Histidinresten (6xHis tag) konnte das Protein über eine Nickelsäule (an Sepharose CL-6B gekoppeltes Ni-NTA [Nitrilotriessigsäure]) gereinigt werden.

Es wurden 50ml Kulturen angesetzt. XCK19 wurde unter denaturierenden Bedingungen (8M Harnstoff) nach Angaben des Herstellers isoliert und gereinigt. Die Proteine wurden wie unter 3.3.2.1 beschrieben dialysiert, über SDS-PAGE analysiert und zur Mikroinjektion verwendet.

3.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Über 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.

3.3.4 „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 GST-gekoppelte Proteine gebunden wurden.

Lösungen:

EP (Extraktionspuffer): 20mM HEPES
0,25M Sucrose
0,1M NaCl
2,5mM MgCl₂
pH 7,2

PBS siehe 3.3.2.1

Kernextrakt: siehe 3.3.5

Probenpuffer (H): siehe 3.3.7

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

Es erfolgte die Bindung des GST-gekoppelten Proteins an die Matrix. Dazu wurden 20µl EP zu der Sepharose gegeben, sowie das zu bindende Protein. Nach einer Inkubation von 1h, während der die Lösung mehrmals vorsichtig durchgemischt wurde, wurde die Lösung erneut zentrifugiert für 3min bei 500 g. 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 500 g, 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 für 1h mit Kernextrakt inkubiert. Auch hier wurde die Lösung, während der Inkubation, mehrmals vorsichtig durchgemischt. 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 SDS-PAGE (3.3.7) aufgetrennt, und durch Immunblot analysiert (3.3.10).

3.3.5 Isolierung von Zellkernen aus Kulturzellen

Diese Kernpräparation wurde nach einer Methode von Krohne et al. (1981) durchgeführt. Die Kulturzellen wurden in Plastik-Petrischalen (Durchmesser 10 cm; Fa. Greiner, Frickenhausen) mit je 10 ml Medium bis zu einer Zelldichte von maximal 10⁵ Zellen/ml kultiviert. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt, um einem proteolytischen Abbau der Proteine vorzubeugen.

Lösungen:

TKM-Puffer: 70 mM KCl
3 mM MgCl₂
10 mM Tris-HCl pH 7,2

Lysepuffer: 10 mM Tris-HCl pH 7,2

In die vorgekühlten Lösungen wurde kurz vor der Präparation der Proteaseinhibitor PMSF in einer Endkonzentration von 1 mM (in EtOH) zugegeben. Das Zellkultur-Medium aus den dichtbewachsenen Kulturschalen wurde abgegossen und die am Schalenboden als "Monolayer" anhaftenden Zellen wurden sofort mit 3 ml TKM gewaschen um Reste des Mediums zu entfernen. Die Zellen wurden mit einem Gummischaber vom Schalenboden gelöst, in 5 ml TKM aufgenommen und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde die Kulturschale nochmals mit 5 ml TKM gespült. Die Zellsuspension wurde in einer Kühlzentrifuge 5 min bei 3000xg sedimentiert. Das Sediment wurde in 10 ml Lysepuffer aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert.

Eine kleine Menge der Suspension wurde zur Bestimmung der Kernzahl in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Durch den hypotonischen Lysepuffer schwellen die Zellen an, was das anschließende Aufbrechen der Zellen in einem Glas-Teflon-Homogenisator erleichtert. Das Homogenisieren wurde unter ständiger lichtmikroskopischer Kontrolle so lange durchgeführt, bis möglichst alle Zellen aufgeschlossen waren und nur noch die intakten Kerne vorlagen. Die Suspension wurde in einer Kühlzentrifuge 20 min bei 5000 xg sedimentiert. Das Zellkernsediment wurde entweder bei -20°C eingefroren oder sofort weiterverarbeitet.

3.3.5.1 Mengenbestimmung von Zellkernen in der Neubauer-Kammer

Die Zählung von Zellkernen in bestimmter Verdünnung wurde mikroskopisch mit der Neubauer-Kammer (oder auch Thoma-Kammer) vorgenommen. Hält man eine Neubauer-Kammer gegen das Licht, so sieht man auf dem mittleren Steg ein eingeritztes Kreuz, das bei mikroskopischer Betrachtung in feinen Linien erscheint. Die eingeritzten Linien schneiden Großquadrate aus, die wiederum aus 16 Kleinquadraten bestehen. Der Abstand von einem Kleinquadrat bis zu dem plan aufgelegten eingeschliffenen Deckglas beträgt 0,1 mm. Das Volumen eines Großquadrates faßt 0,1 µl Flüssigkeit. Um die Anzahl der angereicherten Kerne pro ml Suspension zu bestimmen, gilt also : Zahl der Kerne pro Kleinquadrat x 16 x 10⁴ = Zellkerne /ml Suspension.

3.3.6 Dephosphorylierung von Proteinen

Lösungen:

Phosphatasepuffer: 10 mM MgCl₂
 150 mM NaCl
 100 mM Tris-HCl, pH 8,8

Die zu dephosphorylierenden Proteine wurden bevor sie in Probenpuffer (3.3.7) aufgenommen wurden, 1h bei 37°C mit alkalischer Phosphatase (Boehringer) behandelt. Als Probe für ein zweidimensionales Gel (3.3.8) wurden Proteine aus 5x10⁶ Zellkernen (3.3.5) mit 100 U Phosphatase in 1ml Puffer inkubiert.

3.3.7 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die eindimensionale Auftrennung von Proteingemischen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelsystem in Gegenwart von SDS. Die Kombination von Trenngel und Sammelgel, die sich in der Acrylamidkonzentration und im pH-Wert unterscheiden, ermöglicht eine optimale Konzentrierung und anschließende Auftrennung der Polypeptide. Durch den pH-Sprung zwischen beiden Gelen entsteht ein diskontinuierlicher Spannungsgradient, was zur Folge hat, daß die Proteine beim Übergang vom Sammelgel zum Trenngel konzentriert werden.

Um eine gleichmäßige und gute Auftrennung der Polypeptidproben zu erzielen, wurde das Gel- und Puffersystem nach Thomas und Kornberg (1975) mit einer Acrylamidkonzentration von 12% benutzt. Für die Elektrophorese wurden Plattengelapparaturen der Fa. Gibco BRL (München) benutzt.

Lösungen (nach Thomas und Kornberg, 1975):

- A:** 30% **Acrylamid-Bis-Lösung** für das **Trenngel**:
30 g Acrylamid + 0,15 g Bis (N,N'-methylendiacylamid) auf 100 ml dH₂O.
- A':** 30% **Acrylamid-Bis-Lösung** für das **Sammelgel** (nach Laemmli, 1970):
30 g Acrylamid + 0,8 g Bis auf 100 ml dH₂O.
- B:** **Trenngelpuffer**:
3M Tris-HCl, pH 8,8, 0,4% SDS
- C:** **Sammelgelpuffer**:
0,75M Tris-HCl, pH 6,8, 0,4% SDS
- D:** **APS**, 10% Ammoniumperoxodisulfat-Lösung in dH₂O
- E:** **Elektrophoresepuffer**:
50 mM Tris-HCl, 0,38 M Glycin, 0,1% SDS, pH 8,8
- F:** **Färbelösung**:
0,1% Serva Blau R 250 (entspricht Coomassie Brilliant Blue),
20% Methanol (techn.), 7,5% Essigsäure
- G:** **Entfärbelösung**:
20% Methanol (techn.), 7,5% Essigsäure
- H:** **Probenpuffer** (nach Laemmli, 1970):
60 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% Glycerin, 5% SDS, 10% β-Mercaptoethanol

*Zusammensetzung des **Trenngels** (12%):*

A	16ml
B	10ml
dH₂O	6,2ml
TEMED	13µl
D	400µl

*Zusammensetzung des **Sammelgels** (3,9%):*

A'	1,3ml
C	2,5ml
dH₂O	13,7ml
TEMED	10µl
D	300µl

Die Trenngellösung wurde gut gemischt und unverzüglich zwischen zwei mit 1% Agarose abgedichtete, durch Abstandshalter (Spacer) getrennte Glasplatten bis zu einer Höhe von ca. 13 cm gegossen. Zum gleichmäßigen Abschluß der Polymerisationsgrenze zum Sammelgel wurde das Trenngel nach dem Eingießen mit dH₂O vorsichtig überschichtet. Nach ca. 30 min war die Gellösung vollständig polymerisiert. Die Geloberfläche wurde mit dH₂O gewaschen, das Wasser vollständig entfernt und das Gel mit der Sammelgellösung übergossen.

Minigele (12%):*Zusammensetzung des Trenngels*

A	4ml
B	2,5ml
dH₂O	3,4ml
TEMED	3,33µl
D	100µl

Zusammensetzung des Sammelgels

A'	0,65ml
C	1,25ml
dH₂O	3,1ml
TEMED	5µl
D	150µl

In die noch flüssige Sammelgellösung wurde luftblasenfrei ein Kamm (15 oder 20 Taschen) so eingesetzt, daß der Abstand vom Taschenboden bis zum Trenngel 1,5 cm betrug. Nach 20 min war das Sammelgel polymerisiert, der Kamm wurde langsam herausgezogen und die Geltaschen mehrmals mit dem entsprechenden Elektrophoresepuffer ausgespült.

Die in Probenpuffer (Lösung F) aufgenommenen Proben wurden 5 min bei 95°C denaturiert und kurz in der Tischzentrifuge zentrifugiert (10 min bei 10000 g). Das Auftragsvolumen betrug 15-20 µl pro Tasche. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurden Referenzproteine von hohem Molekulargewicht („High-Marker“) und von niedrigem Molekulargewicht („Low-Marker“) aufgetragen (je Spur 1 µl in 14 µl Probenpuffer, Fa. BIO-RAD, München).

High-Marker	Low-Marker	M _r
Myosin		200.000
β-Galactosidase		116.250
Phosphorylase B	Phosphorylase B	97.400
BSA	BSA	66.200
Ovalbumin	Ovalbumin	45.000
	Karbonat-Anhydrase	31.000
	Trypsin-Inhibitor	21.500
	Lysozym	14.300

Tabelle 3.3: Relative Molekulargewichte der Markerproteine (nach Größe)

Zur Markierung der Lauffront wurde in die leeren Geltaschen 5 µl Bromphenolblau in Probenpuffer (F) aufgetragen.

Die obere Elektrophoresekammer wurde an die Kathode eines stabilisierten Netzgerätes angeschlossen, die untere Kammer an die Anode. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei großen Gelen über Nacht bei 25 mA, bei Minigelen ca. 1h bei 100V. Die Elektrophorese wurde beendet, als die Bromphenolblaufront etwa 1 cm von der unteren Gelkante entfernt war. Das Gel wurde an einer Ecke markiert, um das Beladungsschema nachvollziehbar zu machen. Das Trenngel wurde vom Sammelgel getrennt und in die Färbelösung (Lösung G) überführt. Nach einer Inkubation von 2h bei RT konnte das Gel in die Entfärbelösung (Lösung H) überführt werden. Die Gele wurden anschließend mit Durchlicht und Gelbfilter fotografiert. Zur Aufbewahrung wurden die Gele in Haushaltsfolie luftdicht eingeschweißt und im Kühlschrank aufbewahrt.

3.3.8 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die zweidimensionale gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte im Wesentlichen nach der von O'Farrell et al. (1977) beschriebenen Methode. Die Proteine werden dabei in der ersten Dimension durch einen pH-Gradienten nach ihrer Ladung aufgetrennt, in der zweiten Dimension unter denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht.

3.3.8.1 Erste Dimension: NEPHGE

Die Nichtgleichgewichts-pH Gradienten-Gelelektrophorese (NEPHGE) wird vorwiegend zur Auftrennung basischer Proteine benutzt. Die Proteine wandern dabei jedoch nicht bis zu ihrem isoelektrischen Punkt (IEP), da der pH-Gradient bei längeren Laufzeiten im alkalischen zusammenbrechen würde und die Elektrophorese daher vor Erreichen des Gleichgewichtszustandes abgebrochen werden muß. Die Proteine wandern von der Anode (+) zur Kathode (-), wobei der Kathodenpuffer alkalisch ist. Die Dauer der Elektrophorese richtet sich nach der Ladung der aufzutrennenden Proteine. Bei stark basischen Proteinen muß die Laufzeit entsprechend verkürzt werden.

Lösungen:

L1 (Lysis-Puffer 1):	9,5 M Harnstoff 0,5% SDS 5% β -Mercaptoethanol 2% Ampholine pH 2-11
I2 (Lysis-Puffer 2):	9,5 M Harnstoff 5% (w/w) Nonidet P40 5% β -Mercaptoethanol 2% Ampholine pH 2-11
J (Überschichtungslösung):	6 M Harnstoff 5% (w/w) Nonidet P40 1% Ampholine pH 2-11
K (30% Acrylamid-Bis-Lösung):	28,38 g Acrylamid 1,62 g Bis auf 100 ml dH ₂ O
L (10% Nonidet P 40):	10 g NP 40 auf 100 ml dH ₂ O
M (Anoden-Elektrophoresepuffer):	10 mM H ₃ PO ₄
N (Kathoden-Elektrophoresepuffer):	20 mM NaOH
O (SDS-Probenpuffer für 2. Dimension):	60 mM Tris-HCl pH 6,8 2% SDS 5% β -Mercaptoethanol 10% Glycerin

Die Lösungen I1, I2 und J wurden in Portionen bei -20°C eingefroren. Alle übrigen Lösungen wurden vor Gebrauch frisch angesetzt.

Die Rundgele wurden in silikonisierte Glasröhrchen mit einer Länge von 13 cm und einem Innendurchmesser von 3 mm gegossen. Vor dem Einfüllen der Gelmischung wurden die Röhrchen am unteren Ende mit mehreren Lagen Parafilm dicht verschlossen.

Zusammensetzung des Rundgels (10 ml Gelmischung, ausreichend für ca. 12 Rundgele):

5,5 g	Harnstoff
1,33 ml	Acrylamid-Lösung K
2 ml	10% NP 40-Lösung L
2 ml	dH₂O
0,5 ml	Ampholine pH 2-11
15 µl	10% APS
10 µl	TEMED

Ampholine, APS und TEMED wurden erst zugegeben, nachdem der Harnstoff vollständig gelöst war. Die Gellösung wurde mit einer langen Pasteurpipette luftblasenfrei bis zu einer Höhe von ca. 12 cm in die Glasröhrchen eingefüllt. Die Rundgele wurden mit 50-100 µl Wasser vorsichtig überschichtet und möglichst senkrecht gestellt um die gleichmäßige Polymerisation der Geloberfläche zu ermöglichen. In der Regel wurden die Gele am Abend gegossen und polymerisierten über Nacht. Danach wurde die Geloberfläche mehrmals mit Wasser gespült, der Parafilm entfernt und das untere Ende der Röhrchen mit Gaze verschlossen, um ein Herausgleiten der Gele während der Elektrophorese zu verhindern. Die Röhrchen wurden in eine Elektrophoresekammer für Rundgele eingesetzt und die untere Pufferkammer mit 20 mM NaOH (Lösung N) aufgefüllt.

3.3.8.2 Vorbereitung der Proben

Die aufzutrennende Proteinprobe wurde in Probenpuffer für eindimensionale Gele (Lösung H) aufgenommen und durch Kochen gelöst. Nach Abkühlen der Probe wurden die Proteine durch Zugabe von 9 Volumenteilen Aceton bei -20°C für mindestens 3 Stunden oder über Nacht ausgefällt. Die gefällten Proteine wurden abzentrifugiert und zweimal mit 90% Aceton gewaschen. Das unter Stickstoff getrocknete Sediment wurde in 30 µl Lysis-Puffer 1 (I1) gelöst. Nach Zugabe von 30 µl Lysis-Puffer 2 (I2) wurde nicht gelöstes Material abzentrifugiert und die Probe auf das Rundgel aufgetragen.

Die aufgetragene Probe wurde mit 20 µl Lösung J überschichtet und das Röhrchen bis zum oberen Rand mit 10 mM H₃PO₄ (Lösung M) aufgefüllt.

Als Farbmarker für stark basische Proteine wurde Cytochrom c (IEP > 11) auf ein separates Rundgel aufgetragen.

<i>Elektrophorese-Bedingungen:</i>	obere Kammer:	Anode (+)
	untere Kammer:	Kathode (-)

bei konstanter Spannung:	15 min	200 V
	30 min	300 V
	90-120 min	400 V

Die Elektrophorese wurde beendet, wenn Cytochrom c noch ca. 2 cm vom Gelende entfernt war. Die Rundgele wurden mit einer wassergefüllten Spritze vorsichtig aus dem Röhrchen herausgedrückt und für 20 min in Lösung O äquilibriert. Der Äquilibrierungspuffer wurde abgesaugt und die Rundgele entweder sofort auf die Flachgele der 2. Dimension aufgetragen oder bei -20°C eingefroren.

3.3.8.3 Zweite Dimension: SDS-Polyacrylamid-Flachgele

Die Flachgele wurden, wie unter 3.3.7 beschrieben hergestellt, jedoch ohne Kämme zum Formen von Geltaschen einzusetzen.

Die äquilibrierten Rundgele der ersten Dimension wurden gleichmäßig gestreckt auf die Oberfläche der Sammelgele gelegt und mit heißer 1% Agarose-Lösung in Puffer O eingegossen, so daß eine leitende Verbindung zwischen Rundgel und Sammelgel hergestellt war. Nach Erkalten der Agarose wurde zur Markierung der Lauffront an beiden Seiten des Gels Bromphenolblau (gelöst in Wasser und Glycerin) aufgetragen.

Elektrophorese-Bedingungen: 16-18 Stunden, 17-18 mA bei konstanter Stromstärke

Nach der Elektrophorese wurden die Flachgele gefärbt und anschließend wieder entfärbt, wie unter 3.3.7 beschrieben.

Die Rundgele wurden zur Bestimmung des pH-Gradienten abgetrennt und in 0,5 cm lange Stücke zerschnitten. Diese wurden einzeln, mit je ca. 3 ml dH₂O in Zentrifugenröhrchen überführt und geschüttelt. Anschließend wurde der pH-Wert jeder Probe gemessen.

3.3.9 Elution von Proteinen aus Polyacrylamidgelen

Lösungen:

4M NaAcetat

Elektrophoresepuffer ohne SDS (3.3.7)

PBS (3.3.2.1)

Die aus 2D-PAGE Gelen zu isolierenden Proteine wurden durch Western Blot nachgewiesen (3.3.10). Die auf Röntgenfilm identifizierten Banden wurden den, auf dem Nitrozellulosefilter gebundenen, durch Tinte gefärbten Proteine zugewiesen. Durch die relative Lage der gesuchten Proteine zu allen anderen aufgetrennten Proteinen konnte es nun eindeutig im Gel identifiziert werden. Dieses wurde dazu mit Natriumacetat gefärbt, da die Coomassiefärbung nicht reversibel ist.

Die entsprechenden Gelstücke wurden mit einer Skalpellklinge ausgeschnitten und in 0,5 ml Caps überführt. Zur Elution wurden diese mit einer Spritzenspitze oben und unten durchbohrt und in Centricons (Millipore) gesetzt. Diese wurden in einen entsprechenden Eluator (Millipore) plaziert und in Elektrophoresepuffer ohne SDS (fällt aus, zur Elution ist nach der Elektrophorese noch ausreichend in der Probe vorhanden) für 2h bei 200V eluiert. Die Proteine wurden durch den Versuchsaufbau aus den Gelstücken in den Caps direkt in die Centricons eluiert, mit denen sie anschließend gegen PBS dialysiert und konzentriert wurden. Aus ca. vier 2D-Gelen konnte genügend Protein eluiert und konzentriert werden um es in einem Coomassie-gefärbten Minigel sichtbar zu machen.

3.3.10 Immunblot-Methode („semidry“-Elektroblot)

Die biochemische Identifizierung der Antigene erfolgte im Prinzip durch die von Towbin et al. (1979) beschriebene Immunblot-Methode. Dabei werden Proteingemische durch ein- oder zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Polypeptide danach elektrophoretisch von den Gelen auf Nitrozellulosefilter übertragen. Die auf dem Nitrozellulosefilter immobilisierten Polypeptide werden mit Antikörpern inkubiert. Die spezifisch gebundenen Antikörper wurden durch enzymgekoppelte Sekundäntikörper nachgewiesen.

Lösungen:

Graphitblotpuffer 1:	25 mM Tris 20% Methanol pH 10,4
Graphitblotpuffer 2:	300 mM Tris 20% Methanol pH 10,4
Graphitblotpuffer 3:	25 mM Tris 40 mM DL - Norleucin 20% Methanol pH 9,4

In dieser Arbeit wurde das auf Towbin basierende semi-dry-Verfahren nach Kyhse-Anderson (1984) angewandt. Nach Beendigung der Gelelektrophorese (siehe 3.3.7 und 3.3.8) wurde das Gel ausgemessen und im Graphitblotpuffer 3 equilibriert. Ein Nitrozellulosefilter (Schleicher-Schuell, Dassel) und 18 Filterpapiere für Chromatographie (Whatman-Filterpapier, Schleicher-Schuell, Dassel) wurden auf die Maße des Gels zugeschnitten. Die Filterpapiere, die Nitrozellulose und das Gel wurden wie folgt übereinander geschichtet:

Anode (+)

3x Whatman	Puffer 2
3x Whatman	Puffer 2
3x Whatman	Puffer 1
Nitrozellulose	Puffer 1
Gel	Puffer 3
3x Whatman	Puffer 3
3x Whatman	Puffer 3
3x Whatman	Puffer 3

Kathode (-)

Um ein luftblasenfreies Aufschichten der Lagen zu gewährleisten, wurde jede Lage mit einem Zentrifugenröhrchen auf die jeweilige untere Schicht unter leichten Druck angerollt. Die Übertragung der Proteine auf einen Nitrozellulosefilter erfolgte in einer Graphit-Blotkammer. Der Transfer wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur, bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA/cm² durchgeführt. Die Proteine wanderten von der Kathode (Gel) zur Anode (Filter). Nach Beendigung des Transfers wurde die Nitrozellulose so markiert, daß das ursprüngliche Beladungsschema des Gels nachvollziehbar blieb.

Zur Kontrolle der Transfereffizienz wurde der Nitrozellulosefilter für 1min in Ponceau-S-Lösung inkubiert. Ponceau-S ist ein reversibel bindender Proteinfärbstoff, der nach einer Inkubation von wenigen Sekunden die Polypeptidbanden rot anfärbt. Vor Entfärben der Nitrozellulose in PBS (½h, RT) wurden die Spuren mit den Referenzproteinen (siehe 3.3.7) von den zu untersuchenden Proteinen getrennt. Der Filterstreifen mit den Referenzproteinen wurde auf einem Whatman Filterpapier luftgetrocknet. Anschließend wurde die Nitrozellulose 1h bei RT in einer 10% (w/v) Magermilchpulverlösung (in PBS) inkubiert um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen.

Der Nitrozellulosefilter wurde kurz in PBS gewaschen, zusammen mit der entsprechenden Antikörperlösung in Haushaltsfolie eingeschweißt und über Nacht bei 4°C auf einen Drehtisch inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden anschließend durch Waschen in PBS (3 x 10min) entfernt. Die spezifisch gebundenen Antikörper wurden mit Hilfe von enzymgekoppelten (Meerrettich-Peroxidase) Zweitantikörpern nachgewiesen. Dazu wurde die Nitrozellulose für 1 Stunde bei RT in der Antikörperlösung inkubiert. Es folgten drei Waschschritte von 10min mit PBS. Die spezifisch gebundenen Antikörper wurden mit dem „enhanced chemical luminescence-Detektionssystem“ (ECL, Amersham Buchler, Braunschweig) nach Angaben des Herstellers detektiert.

3.3.10.1 Entfernung der gebundenen Antikörper

Um gebundene Antikörper von der Nitrozellulose zu entfernen wurde diese wie im ECL-Western Blot-Protokoll vom Hersteller behandelt.

Lösungen:

„Stripping-Buffer“:	62,5 mM Tris-HCl, pH 7,6 100mM β -Mercaptoethanol 2% SDS
TBST:	140 mM NaCl 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 0,05% Tween-20

Die Nitrozellulose wurde kurz in TBST gewaschen. Anschließend wurde sie für 30min bei 50°C im Stripping-Buffer unter leichter Bewegung inkubiert. Nach viermaligem Waschen (je 15min) in großen Volumina TBST und erneutem Absättigen in der entsprechenden Absättigungslösung für 1h bei RT konnte die Nitrozellulose wieder mit einem Primärantikörper inkubiert werden.

3.3.11 Nachweis glykosylierter Proteine mit Weizenkeim-Lektin (WGA)

Aufgrund der spezifischen Bindung von WGA an N-Acetyl-Glucosamin (GlcNAc) können unter Verwendung von Peroxidase-gekoppeltem WGA GlcNAc-modifizierte Proteine auf Nitrozellulose-Filtern nachgewiesen werden.

Lösungen:

Waschpuffer: 2% Polyvinyl-Pyrolidon (PVP40) in PBS

WGA-Peroxidase (Medac, Hamburg)

Peroxidase-Entwicklerlösung: 94 ml Waschpuffer
6 ml 4-Chlor-1-Naphthol in Methanol
20 μ l H₂O₂

Durchführung:

Der Versuchsablauf erfolgte wie beim Immunblot (3.3.10). Nach dem Western Blot wurden die Filter über Nacht in Waschpuffer abgesättigt und am nächsten Tag 1h in WGA-Peroxidase (1:500 in Waschpuffer) inkubiert. Der Filter wurde anschließend 4x10min in Waschpuffer gewaschen. Die Färbereaktion erfolgte in der Entwicklerlösung.

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Präparation von Oocyten

Lösungen:

MS 222 (3-Aminobenzoessäure-ethylester-methansulfonat): 0,2% in Leitungswasser

Barth-Medium: 90mM NaCl
1mM KCl
0,8mM MgSO₄ x 7 H₂O
0,3mM Ca(NO₃)₂ x 4 H₂O
0,4mM CaCl₂ x 2 H₂O
2mM NaHCO₃
10mM Hepes
pH 7,6 eingestellt mit NaOH (Phenolrot als pH-Indikator)

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.

3.4.2 Manuelle Trennung von Kern und Cytoplasma von Oocyten

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.

3.4.3 Manuelle Isolierung von Kernhüllen

Die Methode zur manuellen Isolierung von Oocytenkernhüllen wurde von Krohne und Franke (1983) beschrieben und wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Dabauvalle durchgeführt.

Lösungen:

3:1 Medium mit MgCl₂: (3.4.2)
+ 7mM MgCl₂

Weiblichen *Xenopus laevis* Fröschen wurde, wie unter 3.4.1 beschrieben, Ovar entnommen. Dies wurde in Barth-Medium gelagert. Vor Gebrauch wurden Oocyten defollikuliert und in 3:1 Medium mit $MgCl_2$ 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.

3.4.4 Mikroinjektion

Die Mikroinjektionen in Kulturzellen und *Xenopus* Oocyten wurden freundlicherweise von Dr. Wilma Hofmann und Dr. Andrea Ewald durchgeführt (siehe Benavente et al., 1989, Hofmann et al., 2001).

Injiziert wurden gereinigtes xCK19 aus der Gelelution (3.3.9), GST-xCK19 (3.3.2.1) und His-xCK19 (3.3.2.2). Kulturzellen wuchsen auf markierten Objektträgern. Die in Kerne und Cytoplasma von Kulturzellen injizierten Proteine sollten mit entsprechenden Antikörpern in der Immunfluoreszenz detektiert werden. Dazu wurden die Zellen 30min-2h nach der Injektion wie in 3.6.2 beschrieben präpariert.

Die Proteine wurden außerdem in das Cytoplasma von Oocyten injiziert um zu untersuchen ob sie in den Kern importiert werden. Dazu wurden nach 30min-3h Kern und Cytoplasma wie in 3.4.2 beschrieben getrennt und Immunblots mit den entsprechenden Antikörpern durchgeführt (3.3.10).

3.5 Proteinanalyse durch Massenspektrometrie

Durch Gelelektrophorese isolierte Proteine wurden durch „Peptide mass fingerprinting“ identifiziert. Dazu wurden im Western Blot erkannte Proteine im Coomassie gefärbten Gel lokalisiert und ausgeschnitten. Von jedem Protein wurde nun massenspektrometrisch ein charakteristisches Profil („fingerprint“) von Peptidmassen erstellt (Durchgeführt von Dr. Korf am DKFZ, Heidelberg).

Die eluierten Proteine wurden durch Trypsin verdaut. Mit einem MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption ionization-Time of flight) Massenspektrometer wurden die beim Verdau eines Proteins entstehenden Peptide durch ihre Masse/Ladung (m/z)-Ratio charakterisiert. MALDI bezeichnet die Technik zur Herstellung der ionisierten und gasförmigen Peptidmoleküle, die dann bis zu einer bestimmten kinetischen Energie beschleunigt werden. Kleinere Ionen erreichen dadurch eine höhere Geschwindigkeit als große und werden so früher von einem Detektor erfaßt, wodurch ein time of flight (TOF) Spektrum entsteht. Bei dieser Methode kann mit ein paar hundert Femtomol eines Gel-isolierten Proteins, dessen Identifizierung durch die folgende Datenbanksuche gelingen.

Die Peptidprofile wurden mit theoretischen Trypsin-Verdau der xCK19-Aminosäuresequenzen, bzw. mit den theoretischen Peptidprofilen aller vollständig bekannten Proteinsequenzen in einer Internet-Datenbank (MS-Fit) verglichen. Bei einer hohen Messgenauigkeit von ca. 50 ppm (parts per million), gilt ein Protein bei einer Zuordnung von mindestens fünf Peptiden, die mindestens 15% der Proteinsequenz abdecken, als eindeutig identifiziert. Einzelne, durch den Profilvergleich identifizierte, Peptide wurden zur Kontrolle sequenziert und bestätigten ausnahmslos den Sequenzvorschlag (Übersicht zur Proteomanalyse durch Massenspektrometrie, siehe Mann et al., 2001).

3.6 Mikroskopie

3.6.1 Zellkultur

Kulturzellen (siehe Material 2.1.1) wuchsen 24-48 h auf Deckgläschen (\varnothing 12 mm) in Petrischalen (\varnothing 6 cm). Um die Verteilung von Antigenen in segregierten Nukleoli zu untersuchen, wurden die Zellen vor der Fixierung mit Actinomycin D behandelt um spezifisch die pol I Transkription zu inhibieren. Dem Medium wurde in PBS gelöstes Actinomycin D (Serva, Heidelberg) in einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt. Die Zellen wurden der Droge 2-3 h lang ausgesetzt und anschließend fixiert.

Zur *in vivo* Expression von GFP und RFP Fusionsproteinen wurden die Zellen mit den in entsprechende Vektoren (2.2.1.3) klonierten cDNAs (2.2.2 und Tabelle 3.1) transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit dem LipofectamineTM Reagenz der Firma Invitrogen. Dabei wird die Vektor-DNA durch Liposomen in die Zelle eingeschleust (Lipofektion) und transient exprimiert.

Zur Transfektion wuchsen Kulturzellen bis sie 50-80% konfluent waren. Die optimale Zelldichte kann, vom Zelltyp abhängig, variieren. Eine Gesamtmenge von ca. 1,5 μg DNA wurde nach Angaben des Herstellers mit LipofectamineTM gemischt. Die Zellen wurden für 2h bei 37°C mit dieser Lösung inkubiert, die danach mit Kulturmedium ersetzt wurde. Die Zellen wurden in der Regel 24-72h nach der Transfektion auf die Expression der fluoreszenten Proteine überprüft. Eine Expression wurde frühestens 7h nach der Transfektion beobachtet.

3.6.2 Immunfluoreszenz

3.6.2.1 Fixierung

Die mit Kulturzellen bewachsenen Deckgläschen wurden kurz in PBS gewaschen, um Reste des Mediums zu entfernen. Sie wurden für 10 min bei -20°C in Methanol fixiert, 4 min bei -20°C in Aceton dehydriert und anschließend bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Alternativ wurden sie für 10 min bei RT mit 2% Formaldehyd fixiert. Die Formaldehyd-Lösung wurde frisch, durch Erhitzen von Paraformaldehyd in PBS, hergestellt. Nach kurzem Waschen in PBS wurden die Präparate für 10 min bei -20°C in Aceton dehydriert und luftgetrocknet.

3.6.2.2 Inkubation mit Antikörpern

Alle Inkubationsschritte wurden bei RT in einer feuchten Kammer durchgeführt, um das Austrocknen der Zellen zu verhindern. 30-40 μl der Antikörperlösung wurden vorsichtig auf jedem Deckglas verteilt. Nach 25-35 minütiger Inkubation wurden nicht gebundene Antikörper in PBS ausgewaschen (2 x 5min). Die Präparate wurden anschließend 20 min mit dem jeweiligen Fluorochrom-gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert. In den letzten 5 min dieser Inkubationszeit wurde zusätzlich das Fluorochrom Hoechst 33258 (5 $\mu\text{g/ml}$ PBS) zur Markierung der Zellkern-DNA dazugegeben. Danach wurden die Zellen zweimal 5min in PBS gewaschen, 1min in EtOH dehydriert und luftgetrocknet. Zuletzt wurden die Präparate in Mowiol (Hoechst) eingebettet.

Zum Nachweis zweier Antigene in der gleichen Zelle wurde eine Doppel-Immunfluoreszenz durchgeführt. Dazu wurden die Präparate wie oben beschrieben in folgender Reihenfolge inkubiert: 1. Antikörper, DTAF-gekoppelter sekundärer Antikörper, 2. Antikörper, Texas Red-gekoppelter sekundärer Antikörper, Hoechst 33258.

Durch die Anregung mit UV-Licht wurden die Fluorochrome unter einem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen.

3.6.3 Epifluoreszenzmikroskop

Mikroskopiert wurde mit einem Photomikroskop (siehe 2.5) mit Epifluoreszenzoptik und Selektivfilter für Texas-Red-, FITC- und Hoechst-DNA-Fluorochrome. Die Objekte wurden mit Neofluarobjektiven untersucht.

3.6.4 Konfokales Laserscanning Fluoreszenzmikroskop (CLSM)

Ein konfokales Laserscanning Mikroskop funktioniert im wesentlichen wie ein herkömmliches Fluoreszenzmikroskop, es lassen sich jedoch Fluoreszenzaufnahmen aus einem optischen Schnitt des Präparats herstellen. Bei der Doppelimmunfluoreszenz kann das ausgestrahlte Licht beider verwendeten Fluorochrome aus derselben Ebene gleichzeitig aufgenommen werden. Als Lichtquelle wird ein Laserstrahl verwendet, der zeilenweise über das Präparat wandert („scanning“) und die Fluorochrome im Objekt zur Fluoreszenz anregt. Durch den Einsatz zweier konfokaler Lochblenden wird das Fluoreszenzlicht selektiv von der gewünschten Ebene gemessen. Es wird auf die empfindliche Fläche eines Photomultipliers gebündelt. Dieser wandelt das Licht je nach Intensität in einen proportionalen Strom um, der auf elektronischem Weg erfaßt und als Bilddaten abgespeichert wird.

3.6.4.1 Mikroskopie lebender Zellen und FRAP-Analyse

Die auf Deckgläschen gewachsenen, GFP und/oder RFP-Fusionsproteine exprimierenden, Kulturzellen (3.6.1) wurden mit etwas Kulturmedium auf Objektträger plaziert. Die Deckgläschen wurden mit Fixogum abgedichtet, so konnten die Zellen ca. 30-60 min bei Raumtemperatur analysiert werden.

Am CLSM (Leica TCS-SP) wurden die Zellen mit einem 40x Neofluarobjektiv (N.A. 1,25) untersucht. Die Anregung von GFP (auch DTAF bei Immunfluoreszenzen) erfolgte bei 488nm (Ar/Kr Laser, 18mW nominale Ausgangsleistung, pinhole = 1), die von RFP (auch Texas red) bei 568nm (Ar/Kr Laser, 17 mW nominale Ausgangsleistung, pinhole = 1). Fluoreszenzsignale beider Wellenlängen wurden simultan aufgenommen (AOTF jeweils 50%), parallel dazu wurde das entsprechende Phasenkontrastbild aufgenommen.

Bei der FRAP (Fluorescent Recovery After Photobleaching)-Analyse wurde ein einzelnes Bild gescannt (prebleach), gefolgt von einem Bleichpuls von einer Sekunde in einem Punkt von $\sim 1\mu\text{m}$ Durchmesser. Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einer Laserleistung von 4% der Intensität des Bleichpulses gescannt. Einzelne Aufnahmen wurden in folgenden Intervallen nach dem Bleichen gemacht: 10x1s, 10x2s, 10x5s, 10-30x10s. Der Verlust an Fluoreszenzintensität im gesamten aufgenommenen Bereich betrug generell weniger als 5%.

Daten von zehn Messungen aus drei unabhängigen Versuchen wurden jeweils gemittelt. Die FRAP-Erholungskurven wurden wie von Phair und Misteli (2000) beschrieben aus Hintergrund-korrigierten Meßwerten erstellt:

$$I_{\text{rel}} = T_0 I_t / T_t I_0$$

wobei

I_{rel} : relative Fluoreszenzintensität, T_0 : Gesamtintensität (prebleach), T_t : Gesamtintensität zum Zeitpunkt t, I_0 : Intensität im relevanten Bereich (prebleach), I_t : Intensität im relevanten Bereich zum Zeitpunkt t.

4 Abkürzungen

™	Trademark
®	registriertes Warenzeichen
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A	Ampère
Abb.	Abbildung
AMD	Actinomycin D
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	Basenpaare
BrUTP	Brom UTP
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	(zu mRNA) komplementäre DNA
CK	Cytokeratin
CLSM	Konfokales Laserscanning Mikroskop
cm	Zentimeter
CRM1	chromosome maintenance region protein
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
ddNTP	Dideoxy-Nukleosid-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFC	Dichte fibrilläre Komponente
dH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxy-Nukleosid-Triphosphat
DRB	5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTAF	Dichlorotriazinylaminofluorescein
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
EST	Expressed sequence tag
EtOH	Ethanol
ETS	Externer transkribierter spacer
F _{ab}	Ig-Fragment (variable Region)
FC	Fibrilläres Zentrum
Fib	Fibrillarin
FISH	Fluorescent in situ hybridization
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum
FLIP	Fluorescence loss in photobleaching
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching
g	Gramm
GC	Granuläre Komponente
GDP	Guanosin-Diphosphat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein

GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunde
HMG	High mobility group
HRP	Meerrettich Peroxidase
IF	Intermediärfilament
IF	Immunfluoreszenz
I _f	Relative Fluoreszenzintensität
Ig	Immunglobulin
IGC	Interchromatin granules
IGS	Intergenischer Spacer
ITS	Interner transkribierter spacer
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
l	Liter
LMB	Leptomycin B
M	Molar
mA	Milliampere
mAb	Monoklonaler Antikörper
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption ionization-Time of flight
MCS	Multiple cloning site
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
M _r	relative Molekularmasse
mRNA	„messenger“ RNA
mW	Milliwatt
MW	Molekulargewicht
MWCO	„molecular weight cut-off“
NDF	Nucleolus derived foci
NEPHGE	Nichtgleichgewichts-pH Gradienten-Gelelektrophorese
NES	Kernexportsignal (nuclear export signal)
ng	Nanogramm
NLS	Kernlokalisierungssignal (nuclear localization signal)
nm	Nanometer
NMD3	Nonsense mediated decay pathway
Nop	Nukleoläres Protein
NOR	Nucleolar organisator region
NPC	Kernporenkomplex (nuclear pore complex)
nt	Nukleotide
N-Terminus	Amino-Terminus
Ø	Durchmesser
OD	optische Dichte
PAF	Polymerase assoziierter Faktor
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pI	Isoelektrischer Punkt

pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNB	Prenucleolar body
Pol	RNA Polymerase
ppm	Parts per million
PS	Peptid Serum
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
rDNA	ribosomale DNA
RFP	Rot fluoreszierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoproteinpartikel
RPA	Polymerase Untereinheit
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT(-PCR)	Reverse Transkription
S	Svedberg-Einheit
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
snoRNA	Small nucleolar RNA
snoRNP	Small nucleolar RNP
sp	Spezifischer primer
ssDNA	Einzelstrang DNA
t	Zeit
T _a	Annealing Temperatur
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	TBS mit Tween 20
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TKM	Tris-Kalium-Magnesium Puffer
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan Monolaurat
U	Einheit (Unit)
UBF	Upstream binding factor
ÜN	Über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
UV	Ultraviolett
V	Volt
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
xg	fache Erdbeschleunigung

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchung nukleolärer Proteine in lebenden Zellen

Im Verlauf dieser Arbeit wurde eine Kollektion verschiedener nukleolärer Proteine in Expressionsvektoren kloniert, um sie als Fusionsproteine mit GFP und dsRed (RFP) in verschiedenen Kulturzellen zu exprimieren. Die Lokalisierung der chimären Proteine wurde mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (CLSM) überprüft und mit der Verteilung der entsprechenden endogenen Proteine nach Anfärbung mit geeigneten Antikörpern verglichen.

Durch die Verwendung von rot und grün fluoreszierenden Fusionsproteinen konnte dann die Verteilung zweier Proteine relativ zueinander in derselben Zelle beobachtet werden. Das Augenmerk galt hier hauptsächlich der funktionellen Struktur des Nukleolus, d.h. es sollte die Architektur dieses Organells zum ersten Mal in der lebenden Zelle visualisiert werden. Um FCs zu untersuchen, wurden Untereinheiten von pol I verwendet (siehe 1.1.1). Fibrillarin wurde als das charakteristische Protein des DFC kloniert (siehe 1.1.2). B23 ist im GC konzentriert (siehe 1.1.3). Außerdem sollte die nukleoläre Lokalisation der ribosomalen Proteine L5 und L10 geklärt werden (siehe 1.2.1). Diese Untersuchungen wurden ergänzt durch die Messung der Mobilität einzelner Proteine durch Photobleaching Experimente. Speziell im Fall von pol I sollte das dynamische Verhalten auch Hinweise auf die Aktivität des untersuchten Proteins liefern (siehe 1.3.2).

5.1.1 Fibrilläres Zentrum: RNA Polymerase I

RNA Polymerase I (pol I) ist ausschließlich im Nukleolus bei der Transkription von ribosomaler DNA aktiv. Durch licht- und elektronenmikroskopische Immunlokalisation wurde pol I im FC lokalisiert (siehe 1.1.1).

Bei der Maus besteht das Enzym aus 14 Polypeptiden, von denen einige kloniert worden sind. Die beiden größten Untereinheiten (RPA194, RPA116) und RPA/PAF53 sind pol I spezifisch, die anderen sind auch Bestandteile von pol II und/oder pol III. Die genaue Zusammensetzung von menschlichem pol I ist noch nicht bekannt.

5.1.1.1 *In vivo* Expression von RPA194 und RPA53

Zur Untersuchung der Verteilung von pol I in lebenden Zellen standen zwei klonierte murine Untereinheiten zur Verfügung; mRPA194 und mRPA/PAF53 (siehe 2.2.2). Zusätzlich wurde ein dem murinen RPA/PAF53 homologes menschliches Protein in GFP/RFP-Vektoren kloniert und exprimiert. Diese Untereinheit von humanem pol I war bisher nicht charakterisiert worden. So sollte die funktionelle Homologie mit dem murinen Protein gezeigt werden, sowie die richtige Expression von Fusionsproteinen verschiedener Spezies in einer gegebenen Zelle.

Die Konstrukte zeigten in allen verwendeten Kulturzelllinien (Maus, Mensch, Affe, Rattenkänguruh) eine nukleoläre Verteilung in einem großem FC (Abb. 5.1) oder in mehreren kleineren FCs (Abb. 5.2). Die Verteilung von GFP-pol I stimmte mit der von endogenem pol I überein, nachgewiesen durch Immunlokalisation mit pol I-spezifischen Antikörpern (Abb. 5.3 und siehe 1.1.1).

Die Verteilung der beiden Untereinheiten RPA194 und RPA53 stimmte in allen untersuchten Zelllinien überein. Die Kolokalisation der beiden Proteine konnte in kotransfizierten Zellen direkt gezeigt werden (Abb. 5.4).

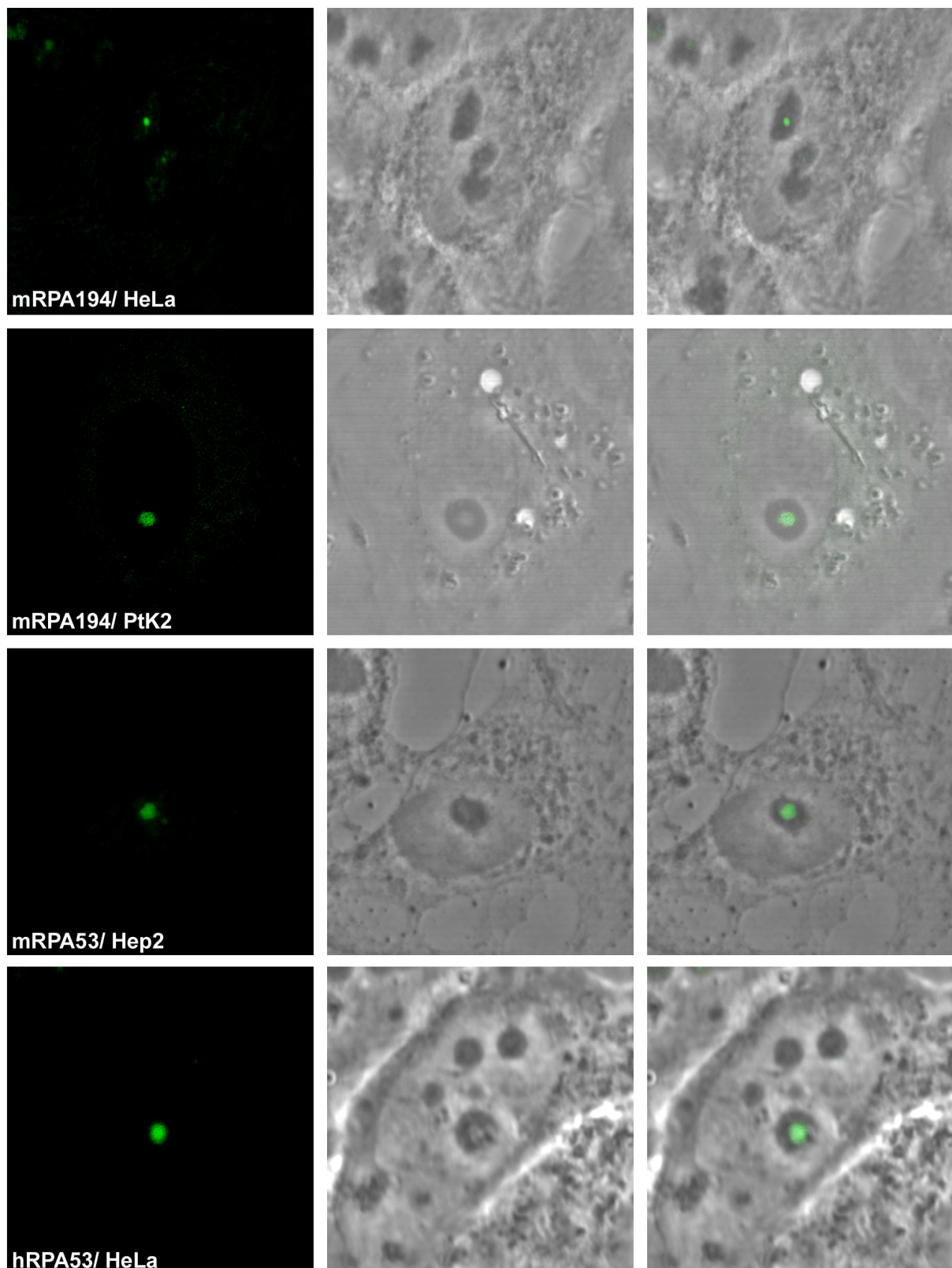


Abb. 5.1: *In vivo* Expression von GFP-pol I. Die pol I Untereinheiten wurden als GFP-Fusionsproteine in verschiedenen Kulturzelllinien exprimiert. In dem hier gezeigten Beispiel sind die fluoreszierenden pol I-Untereinheiten jeweils in einem großen FC konzentriert (linke Reihe). Die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen sind in der mittleren Reihe gezeigt, die überlagerten Ansichten in der rechten Reihe.

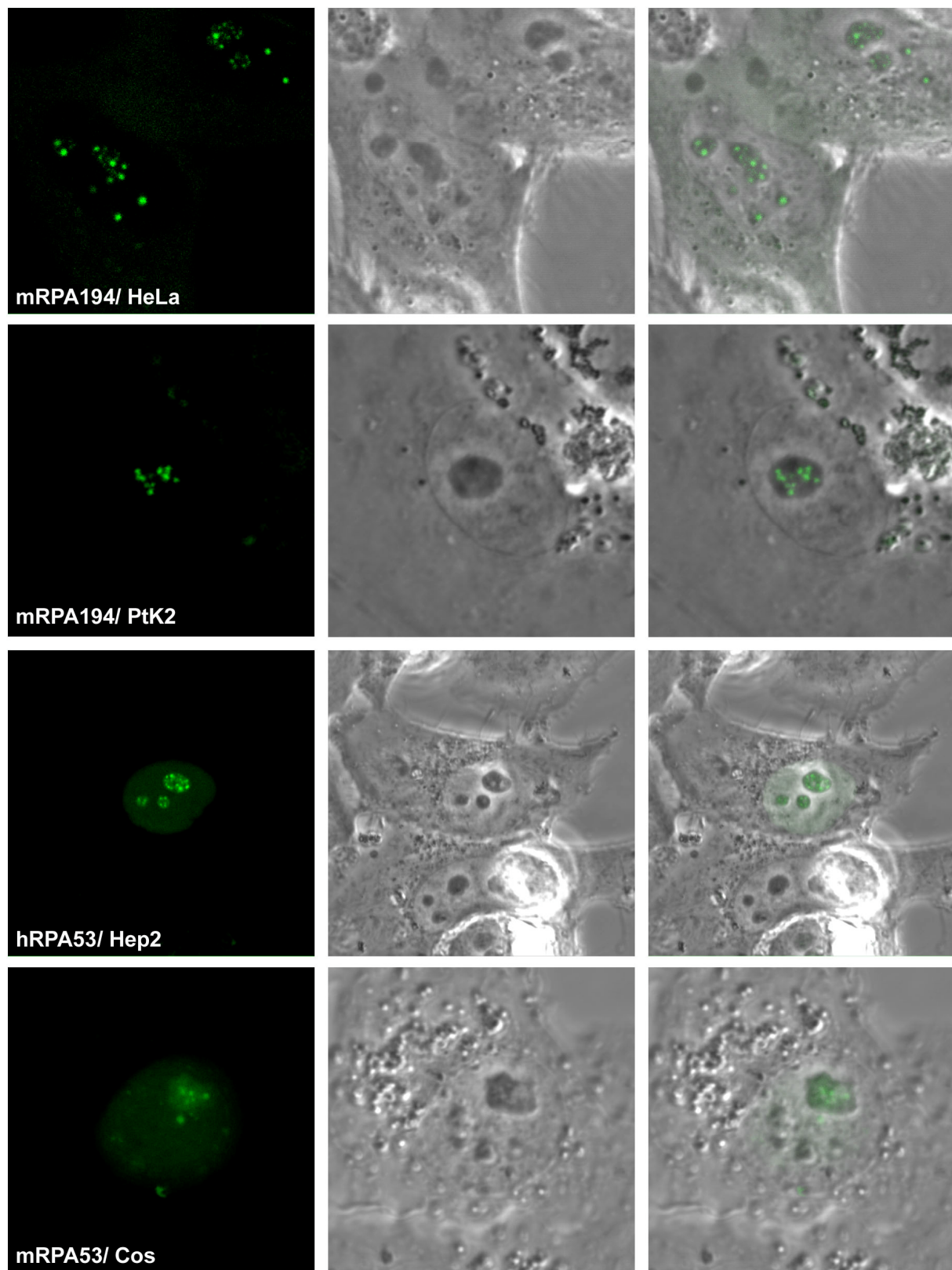


Abb. 5.2: *In vivo* Expression von GFP-pol I. In den hier gezeigten Beispielen sind die GFP-Untereinheiten auf mehrere distinkte FCs aufgeteilt (linke Reihe). Die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen sind in der mittleren Reihe gezeigt, die überlagerten Bilder rechts.

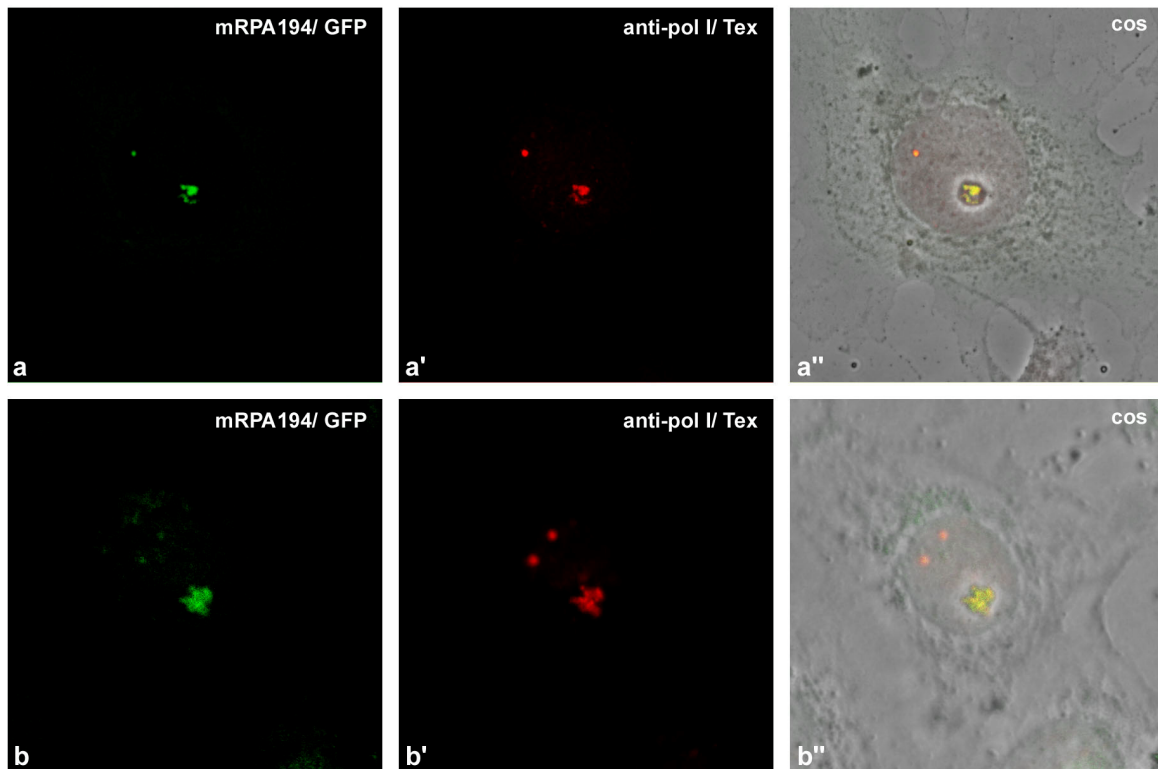


Abb. 5.3: Kolokalisation von GFP-pol I und endogenem pol I. (a, b) GFP-mRPA194 Expression in Cos-Zellen. (a', b') Immunlokalisation mit pol I-Antikörper und Texas Red gekoppeltem sekundären Antikörper. (a'', b'') Überlagerung beider Signale zusammen mit der Phasenkontrastaufnahme.

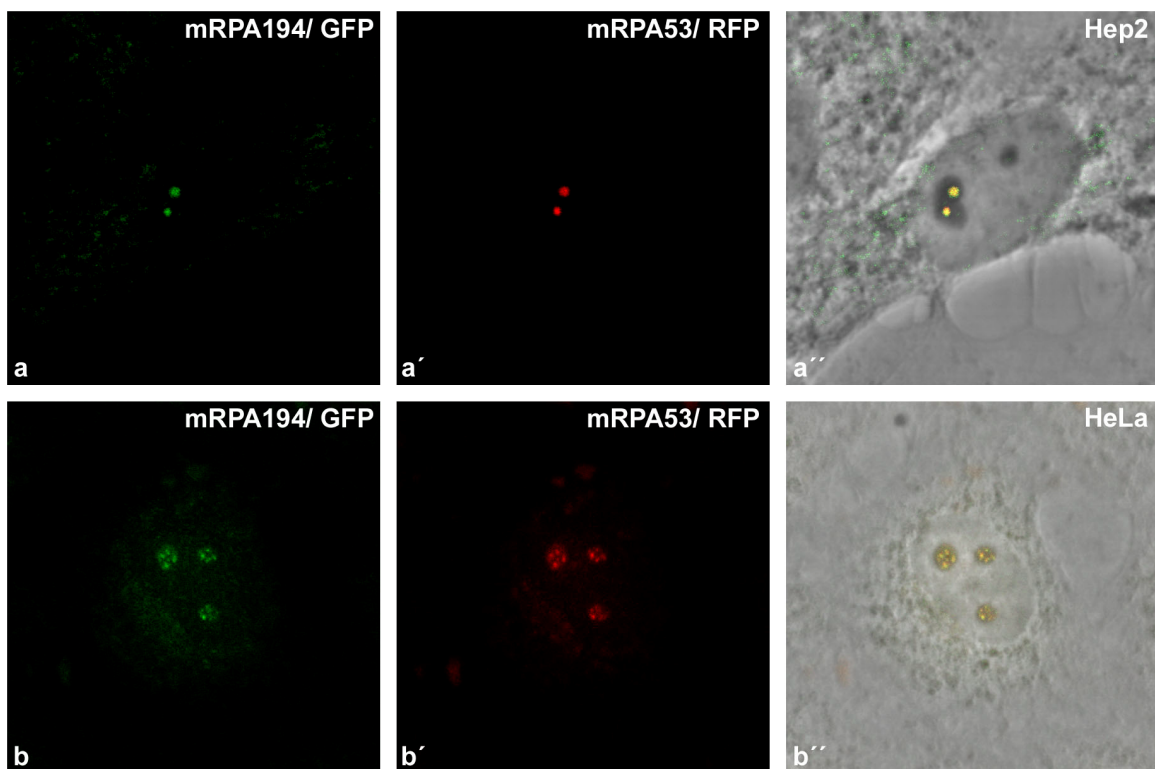


Abb. 5.4: Kolokalisation von mRPA194 und mRPA53 in lebenden Hep2 und HeLa Zellen. Die mit GFP (a, b) und RFP (a', b') markierten pol I-Untereinheiten zeigen die gleiche Verteilung, wie die Überlagerung der beiden Signale belegt (a'', b'').

Die mit den pol I-Konstrukten transfizierten Zellen waren teilungsfähig und die GFP/RFP-Fusionsproteine waren während der Mitose mit den chromosomalen NORs assoziiert (Abb. 5.7), wie auch für endogenes pol I gezeigt wurde (siehe 1.3.1).

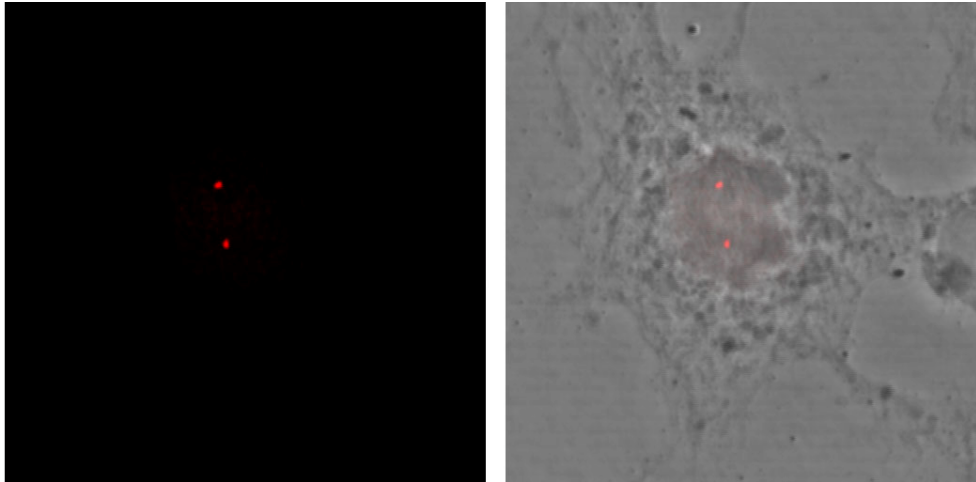


Abb. 5.7: Pol I-Assoziation mit NORs. Mit mRPA53-RFP transfizierte PtK2-Zelle in Anaphase. Das Fusionsprotein ist jeweils, in gleicher dreidimensionaler Position, in dem einzigen NOR pro Chromosomensatz lokalisiert. (Bei diesen Zellen eines männlichen Rattenkänguruhs liegt das NOR auf dem X-Chromosom).

5.1.1.2 FRAP-Analyse

Die Mobilität der pol I-Untereinheiten wurde durch FRAP-Analysen untersucht (siehe 1.3.2). Bisher wurden in der Literatur FRAP-Messungen nur an einigen anderen nukleolären Proteinen publiziert (siehe 1.3.2). Darunter befanden sich auch die im Verlauf der vorliegenden Arbeit klonierten Proteine B23 (Chen und Huang, 2001) und Fibrillarin (Phair und Misteli, 2000, Dundr et al., 2000, Snaar et al., 2000, Chen und Huang, 2001). Zur Kontrolle und zum direkten Vergleich der Mobilitätsmessungen im verwendeten System wurden daher zunächst die FRAP-Analysen dieser beiden Proteine durchgeführt.

FRAP-Daten werden zur Bestimmung der Diffusionsrate und der mobilen Fraktion einer Population von GFP-Fusionsproteinen in dem untersuchten Kompartiment(en) der Zelle herangezogen. Das Schema in Abb. 5.8 verdeutlicht die Interpretation einer aus FRAP-Daten erstellten Fluoreszenzerholungskurve.

Die FRAP-Analysen von GFP-B23 (Abb. 5.9b) und GFP-Fibrillarin (Abb. 5.9c) zeigten in Übereinstimmung mit publizierten Arbeiten (siehe oben und 1.3.2) eine hohe Mobilität der Fusionsproteine zwischen Nukleolus und Nukleoplasma. Die Fluoreszenzaufnahmen dokumentieren die Erholung des GFP-B23-Signals in einem vollständig gebleichten Nukleolus (Abb. 5.9a). Nach zwei Minuten ist eine fast vollständige Erholung des Fluoreszenzsignals zu beobachten. Die Erholungskurve für GFP-B23 erreicht nach zwei bis drei Minuten ein Niveau von 80-90%. Die Hälfte der ursprünglichen Fluoreszenzintensität ist bereits nach 20 Sekunden erreicht ($t_{1/2}$). GFP-Fibrillarin besitzt eine ähnlich große mobile Fraktion, die Erholung von ~80% ist jedoch schon nach ca. einer Minute erreicht ($t_{1/2} \approx 10s$).

Die verschiedenen Literaturdaten für GFP-Fibrillarin weisen Unterschiede in der Größe der immobilen Fraktion auf (0-25%). Der in dieser Arbeit gemessene Wert von ca. 20% liegt in diesem Bereich. Die Ursache für diese Unterschiede ist unklar, da derzeit kein genaues molekulares Modell der scheinbar immobilen Proteine existiert (siehe 6.1). Die hier gezeigten Daten stammen aus FRAPs mit menschlichen Zellen, diese Ergebnisse wurden mit allen verwendeten Zellen unterschiedlicher Organismen reproduziert (Daten nicht gezeigt).

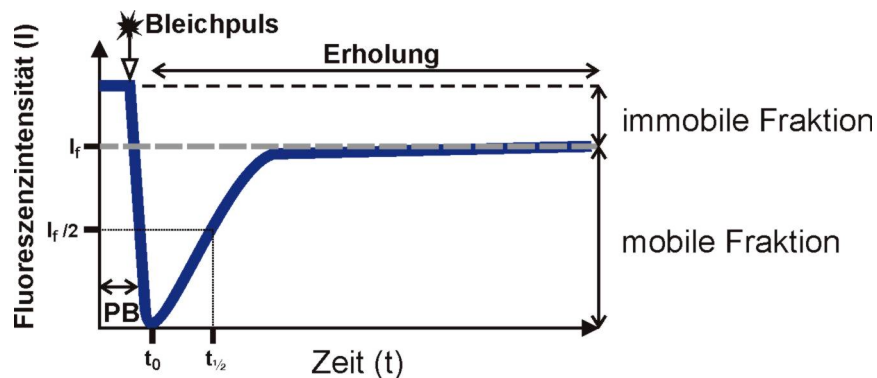


Abb. 5.8: FRAP-Schema. Schematische Darstellung einer FRAP-Messung. Die Fluoreszenzintensität des GFP-Signals wird in einem bestimmten Volumen der Zelle gemessen (PB, prebleach). Die GFP-Fluoreszenz wird an dieser Stelle durch einen Laserpuls gebleicht. Ab diesem Zeitpunkt (t_0) wird die Erholung des Fluoreszenzsignals in regelmäßigen Zeitabständen gemessen. Aus der resultierenden Kurve lässt sich der Anteil der mobilen GFP-Moleküle ablesen. Die Geschwindigkeit, mit der sich die Fluoreszenz erholt, ist ein Maß für die Diffusionsrate des untersuchten GFP-Fusionsproteins. Der Zeitpunkt, zu dem die Hälfte der Fluoreszenzerholung ($I_f/2$) erreicht ist ($t_{1/2}$), kann zur Bestimmung des effektiven Diffusionskoeffizienten benutzt werden (siehe White und Stelzer, 1999).

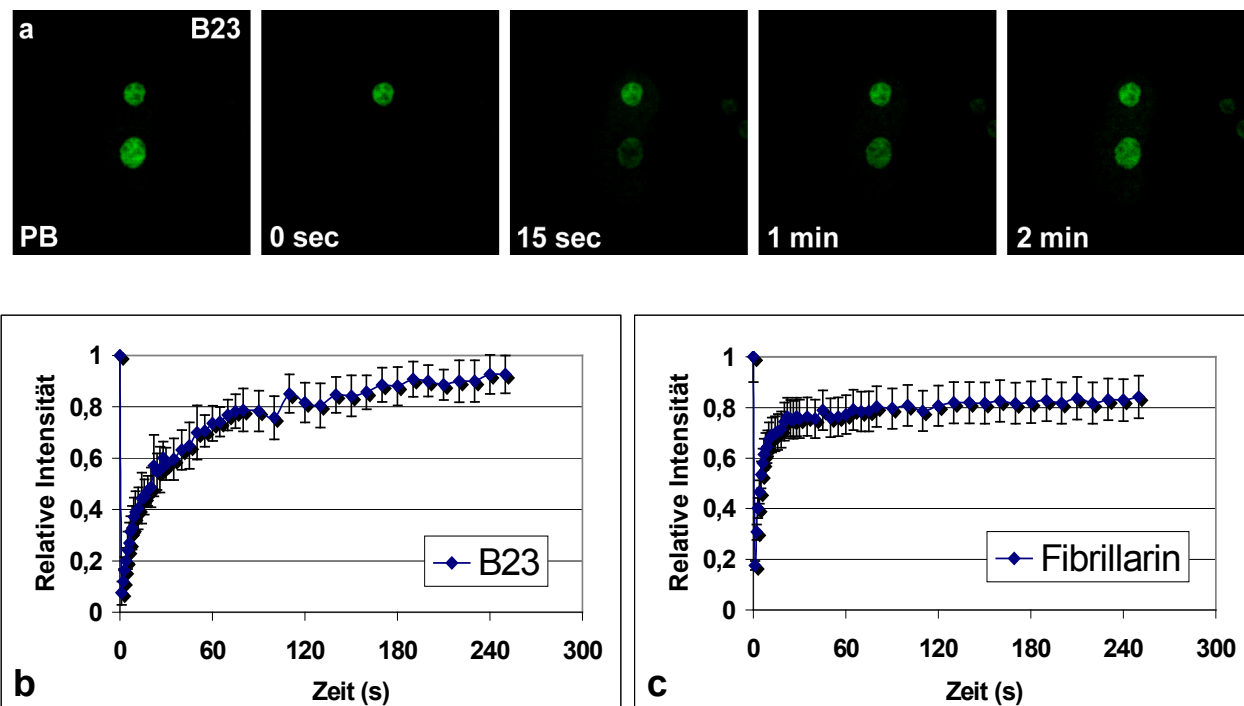


Abb. 5.9: FRAP von B23 und Fibrillarin. (a) Die FRAP-Analyse von GFP-hB23 im Nukleolus einer Hep2-Zelle zeigt den raschen Austausch des Proteins zwischen Nukleolus und Nukleoplasma. Nach wenigen Sekunden ist eine Akkumulation von GFP-B23 im Nukleolus zu beobachten. Nach zwei Minuten hat sich die nukleoläre Fluoreszenz praktisch komplett erholt. (b) Mobilität von GFP-hB23 in menschlichen Zellen (Hep2, HeLa). Die Erholung der Fluoreszenz ist nach ca. zwei Minuten praktisch komplett. ($t_{1/2} \approx 20$ s). (c) Mobilität von GFP-hFib in menschlichen Zellen. Die Erholung der Fluoreszenz erreicht nach ca. 60s ein Plateau bei ca. 80%. ($t_{1/2} \approx 10$ s).

Die Mobilität von GFP-RPA194 und GFP-RPA53 wurde in verschiedenen Kulturzelllinien gemessen. Für beide pol I-Untereinheiten wurde eine deutlich geringere Mobilität als bei Fibrillarin und B23 gemessen (Abb. 5.10a, b). In Nukleoli proliferierender Zellen erreichte die Fluoreszenzintensität beider pol I-Untereinheiten nach ca. 5 min ein Plateau von ~50-60% des Ursprungswerts. Die beiden GFP-Proteine unterschieden sich jedoch in der anfänglichen Erholungsrate. Die GFP-RPA53 Kurve zeigt innerhalb der ersten Minute eine schnellere Erholung als die von GFP-RPA194 (Abb. 5.10d, e, blaue Kurven).

Die gemessenen FRAP-Daten der GFP-pol I-Untereinheiten waren unabhängig von der Struktur des Nukleolus (siehe Abb. 5.1-5.2), d.h. FRAPs von pol I in kompakten FCs (Abb. 5.10a) und in Nukleoli mit dispersen FCs (Abb. 5.10b) zeigten identische Erholungskurven. Auch die FRAP-Messungen in Zellen unterschiedlicher Spezies ergaben die gleichen Ergebnisse (die Beispiele in Abb. 5.10 zeigen (a) Cos-, (b) PtK2- bzw. (c) Hep2-Zellen).

Die Mobilität der pol I-Untereinheiten wurde in Nukleoli von normalen teilungsaktiven Zellen und von AMD-behandelten Zellen verglichen (Abb. 5.10d, e, rote Kurven). Durch Zugabe von geringen AMD-Mengen zum Medium (0,05 µg/ml) wurde spezifisch die pol I-Transkription gehemmt (Piñol-Roma und Dreyfuss, 1991). In Abb. 5.10c ist die Fluoreszenzerholung in einem nach AMD-Behandlung segregierten Nukleolus zu den jeweils angegebenen Zeiträumen nach dem Bleichen gezeigt.

AMD verhindert durch die Bindung an die rDNA die Elongation des Transkriptionskomplexes (Simard et al., 1974, siehe auch 1.3.2). Erwartungsgemäß war deshalb die Mobilität der GFP-RPAs bei den nach AMD-Behandlung segregierten Nukleoli deutlich erhöht. Die mobilen Fraktionen vergrößerten sich auf ca. 80% bei GFP-RPA194 und auf 100% bei GFP-RPA53. Die Erholung der nukleolären Fluoreszenz erreichte hier jeweils nach ca. drei Minuten ein Plateau. Die Erholungsrate ist damit im Vergleich zu anderen nukleolären Proteinen immer noch niedriger (siehe oben).

Die anfängliche FRAP-Rate der GFP-RPAs in transkriptionsgehemmten Nukleoli ($t_{1/2}$ ca. 20s) ist vergleichbar mit der von B23 (zu FRAP nach AMD-Behandlung siehe Chen und Huang, 2001, 1.3.2). Dies weist darauf hin, daß die Diffusionsrate beim Influx der einzelnen pol I Untereinheiten im Nukleolus ähnlich hoch ist. Die anschließende Assoziation mit Komplexen im FC (siehe 1.3.2) resultiert in einer insgesamt verminderten Mobilität. In aktiven Nukleoli wird diese durch die Dauer der Transkription deutlich verringert. Interessanterweise ist in transkribierenden Nukleoli ein Unterschied zwischen RPA194 und RPA53 zu sehen. Während die beiden Untereinheiten insgesamt eine ähnliche Dynamik zeigen, erholt sich die GFP-RPA53 Fluoreszenz ($t_{1/2}$ ca. 30s) anfänglich schneller als die von GFP-RPA194 ($t_{1/2}$ ca. 90s). Dies könnte auf unterschiedliche Funktionen im Transkriptionskomplex hinweisen (siehe 5.1).

Zur genauen Interpretation der FRAP-Daten sind exaktere Modelle der molekularen Prozesse im Nukleolus notwendig (siehe 6.1). So ist die Tatsache, daß die GFP-pol I-Untereinheiten eine immobile Fraktion von ca. 50% aufweisen, nicht direkt erklärbar. Diese Fraktion könnte z.B. mit dem inaktiven Teil der pol I Moleküle zusammenhängen (zu Alternativen siehe 6.1). Schätzungsweise sind mehr als 50 % der rDNA Gene (Jackson et al., 1998) und der pol I Moleküle (Lampert und Feigelson, 1974) inaktiv. Im Gegensatz zu den durch AMD-Behandlung segregierten Nukleoli könnte der inaktive Teil in normalen Nukleoli gebunden bleiben (siehe Carmo-Fonseca et al., 2000 und 6.1), ähnlich wie die Transkriptionskomplexe während der Mitose in den NORs (1.3.1). Um dies zu überprüfen, ist der Vergleich mit Mobilitätsmessungen in NORs nötig, die bisher noch technische Schwierigkeiten bereiteten.

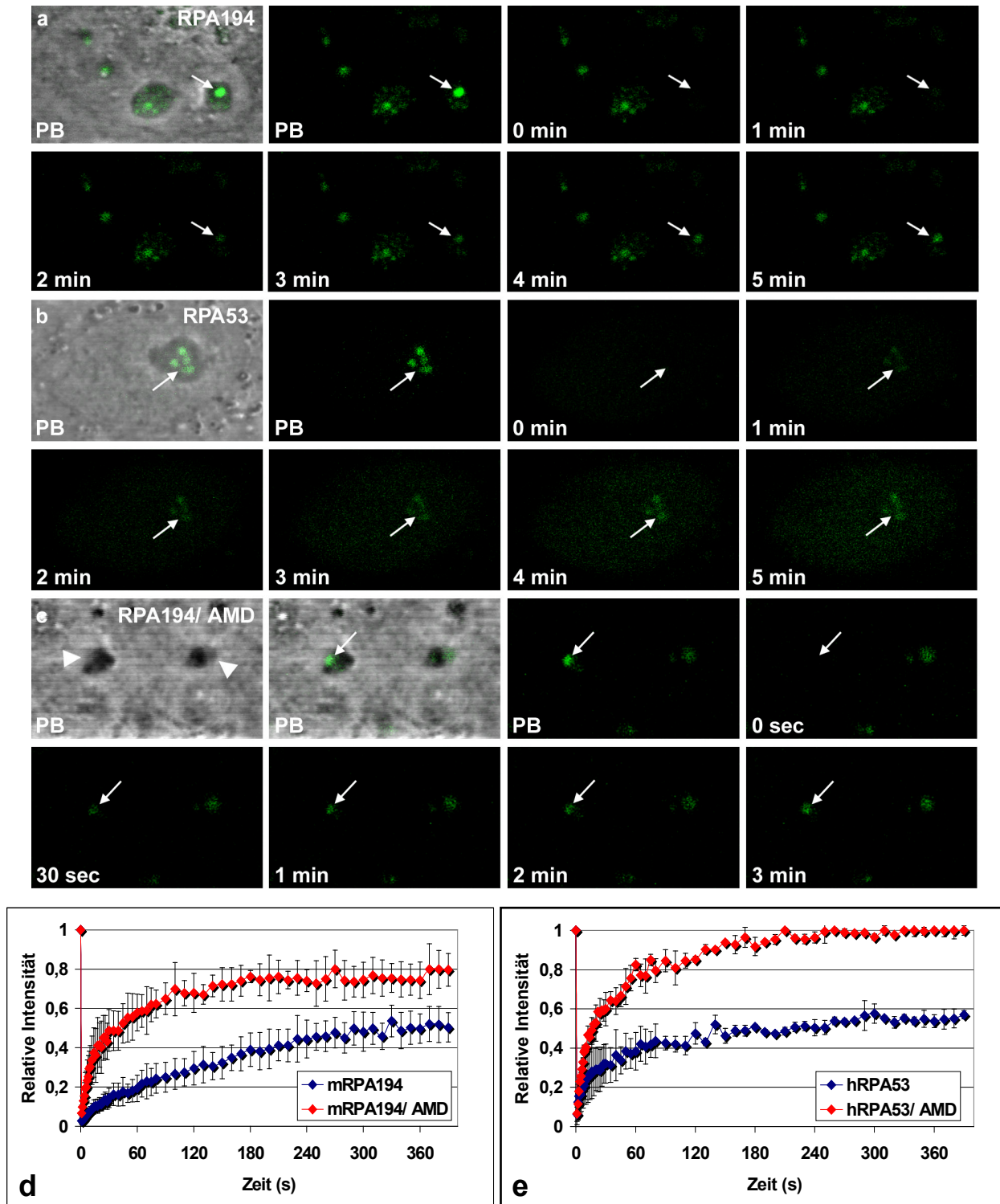


Abb. 5.10: FRAP-Analyse von pol I. (a) FRAP von GFP-mRPA194 in einem kompaktem FC. (b) FRAP von GFP-hRPA53 in einem Nucleolus mit mehreren FCs. (c) FRAP von GFP-mRPA194 in einem nach AMD-Behandlung segregierten Nucleolus. (d) Vergleich der Mobilität von GFP-mRPA194 in aktiven (blaue Kurve) und nach AMD-Behandlung segregierten Nucleoli (rote Kurve). In aktiven Nucleoli erreicht die Fluoreszenzerholung nach ca. 5 min 50%. Nach inhibierter pol I-Transkription ist die Mobilität des Proteins deutlich erhöht. Nach ca. 3 min ist ein Plateau bei 75-80% erreicht. (e) Vergleich der Mobilität von GFP-hRPA53 in aktiven (blaue Kurve) und segregierten Nucleoli (rote Kurve). Auch hier zeigt sich eine deutlich erhöhte Mobilität der Untereinheit in inaktivierten Nucleoli. In aktiven Nucleoli erreicht die Erholung nach ca. 5 min 50-60%, vergleichbar mit RPA194, allerdings ist die anfängliche Erholung im Vergleich schneller. In AMD behandelten Zellen ist die Fluoreszenz nach ca. 3 min vollständig erholt, ebenfalls vergleichbar mit RPA194, allerdings ist praktisch keine immobile Fraktion von GFP-RPA53 vorhanden.

5.1.1.3 Koexpression von pol I und Fibrillarin

Die topologische Anordnung der Substrukturen des Nukleolus sollte durch die Expression von „Marker“-Proteinen in lebenden Zellen visualisiert werden. Fibrillarin ist das charakteristische Protein der dichten fibrillären Komponente (DFC, Ochs et al., 1985). Dort ist es direkt an mehreren posttranskriptionellen Prozessen beteiligt, darunter prä-rRNA Prozessierung, prä-rRNA Methylierung und Zusammenbau von prä-Ribosomen (Tollervey et al., 1993, Venema und Tollervey, 1999). Fibrillarin ist Bestandteil des U3 snoRNPs, das beim ersten Prozessierungsschritt am 5'ETS des entstehenden rRNA-Transkripts beteiligt ist (Kass et al., 1990). Dadurch ergibt sich ein besonderes Interesse an der gleichzeitigen Lokalisierung von pol I im FC (siehe oben) und Fibrillarin im DFC, um die Grenze zwischen diesen Kompartimenten in lebenden Zellen zu untersuchen (siehe 1.1.1-1.1.2). Lazdins et al. (1997) haben aus FISH-Analysen gefolgert, daß sich das 5'-Ende des naszierenden prä-rRNA-Transkripts in lichtmikroskopisch sichtbarer Entfernung von der rDNA befindet (mindestens 0,2-0,5 µm). Daher war es wichtig, in der vorliegenden Arbeit den Transkriptionsort der rDNA (FC) und die Lokalisation der ersten Prozessierungsschritte im DFC in lebenden Zellen relativ zueinander sichtbar zu machen.

Die cDNA humanen Fibrillarins wurde in GFP- und RFP-Vektoren kloniert. Die exprimierten Fusionsproteine wurden in AMD-behandelten segregierten Nukleoli im DFC des Nukleolus lokalisiert (siehe Abb. 5.14 und 5.15), ebenso wie die entsprechenden endogenen Proteine, nachgewiesen durch Immunfluoreszenz. Das hochkonservierte Protein zeigte erwartungsgemäß in allen hier verwendeten Zelllinien dieselbe Lokalisation und Dynamik (siehe auch 5.1.1.2). Die transfizierten Zellen waren teilungsfähig und GFP/RFP-Fibrillarin war während der gesamten Mitose mit der Chromosomen-Peripherie assoziiert (Abb. 5.11 und 5.16). Diese Lokalisation entspricht der beschriebenen Fibrillarin-Verteilung während der M-Phase (siehe 1.3.1, Gautier et al., 1992, Gautier et al., 1994, Hernandez-Verdun und Gautier, 1994, Dundr et al., 1997).

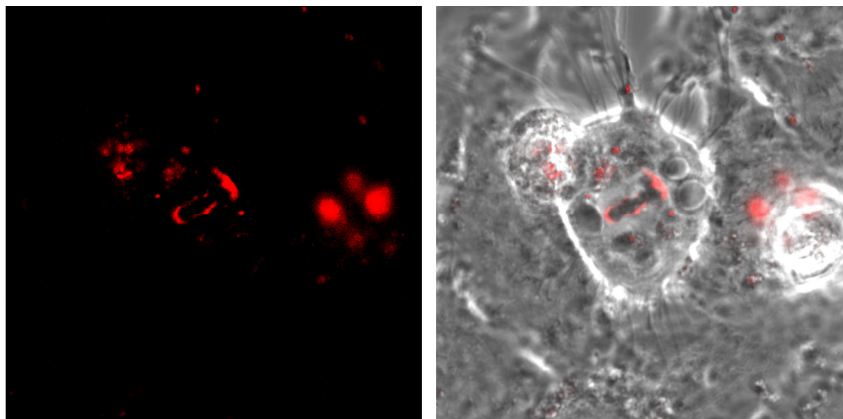


Abb. 5.11: *In vivo* Expression von RFP-Fibrillarin während der Mitose. Transfizierte Hep2-Zelle in der Metaphase (Mitte). RFP-Fibrillarin bleibt während der Mitose an der Chromosomen-Peripherie lokalisiert.

Nach Kotransfektion von pol I-Untereinheiten (RPA194 oder RPA53, siehe 5.1.1.1) und Fibrillarin erschienen die pol I und Fibrillarin enthaltenden Strukturkomponenten des Nukleolus als eng benachbarte, aber räumlich getrennte Kompartimente (Abb. 5.12 und 5.13). GFP-pol I zeigte die bekannte Verteilung in einzelnen kompakten fibrillären Zentren (Abb. 5.12) oder mehreren FCs (Abb. 5.13).

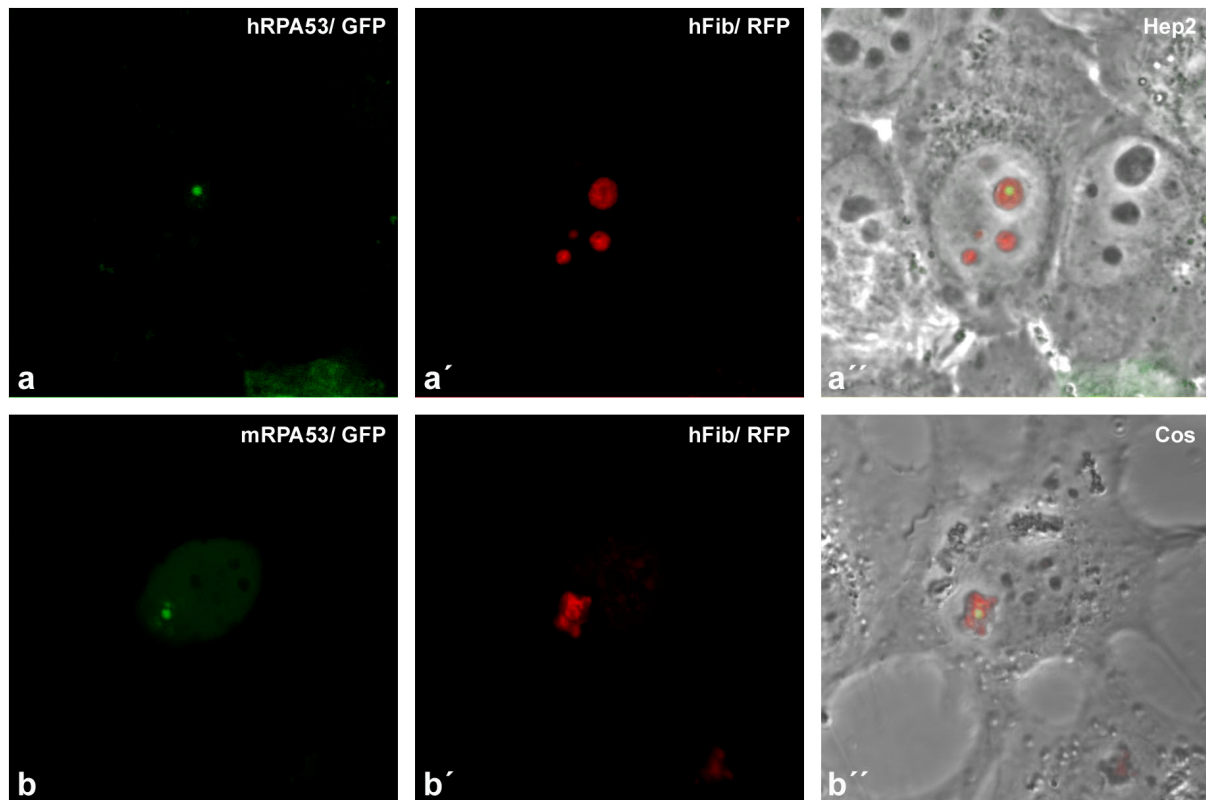


Abb. 5.12: Koexpression von pol I und Fibrillarin in kompakten Nucleoli. (a-a'') Mit GFP-hRPA53 (a) und RFP-hFibrillarin (a') kotransfizierte Hep2-Zelle. (b-b'') Mit GFP-mRPA53 (b) und RFP-hFibrillarin (b') kotransfizierte Cos-Zelle. (a'' und b'') Die pol I-Untereinheiten sind jeweils in einem kompakten FC konzentriert. RFP-Fibrillarin ist im DFC lokalisiert und umgibt die FCs, die in (a') und (b') ausgespart sind.

In beiden Fällen gab es keine Kolo­kalisierung von pol I und Fibrillarin. Pol I war in den kleinen runden FCs lokalisiert, die von dem Fibrillarin-enthaltendem DFC umgeben waren. Die FCs waren in den kompakten Nucleoli deutlich vom RFP-Fibrillarin ausgespart (Abb. 5.12, siehe auch die 3D-Darstellung solcher Fluoreszenzaufnahmen in Abb. 1.1 und Abb. 6.2). In Nucleoli mit zahlreichen kleineren FCs zeigten pol I und Fibrillarin eine, auch vom Zelltyp abhängige, variabelere Verteilung ohne erkennbare Kolo­kalisierung. Die kleineren FCs waren hier je nach aufgenommener Ebene ebenfalls als Fibrillarin-freie Bereiche zu erkennen (Abb. 5.13).

Diese Ergebnisse belegen zum ersten Mal in lebenden Zellen die Lokalisation von RNA-Polymerase I im direkten Vergleich zur Verteilung des DFC-Proteins Fibrillarin. Es konnten also die nukleolären Kompartimente der rDNA-Transkription (das fibrilläre Zentrum) und der rRNA-Prozessierung (die dichte fibrilläre Komponente) lichtmikroskopisch als distinkte Komponenten *in vivo* visualisiert werden. Die beobachtete Abgrenzung der nukleolären Kompartimente entspricht den in elektronenmikroskopischen Präparaten meist deutlich erkennbaren Strukturen (siehe 1.1).

Alle in 5.1.1 beschriebenen Ergebnisse stimmen mit bisherigen Untersuchungen in fixierten Zellen überein, in denen durch Antikörper gegen pol I, UBF und DNA, durch BrUTP Einbau und FISH (fluorescent in situ hybridization) die FCs als Ort der transkriptionell aktiven rRNA Gene identifiziert wurden (siehe Mais und Scheer, 2000). Da alle Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit mit lebenden Zellen durchgeführt wurden, sind mögliche Artefakte durch die verschiedenen Fixierungs- und Nachweismethoden ausgeschlossen.

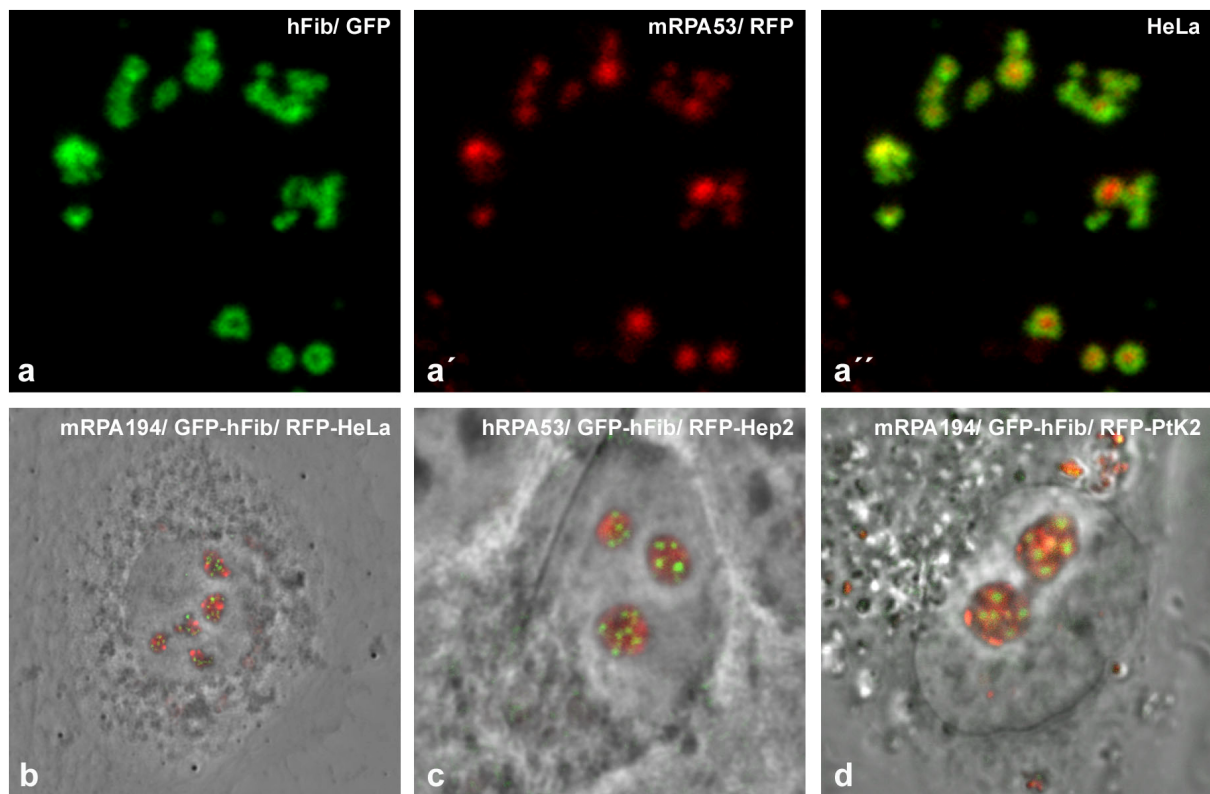


Abb. 5.13: Koexpression von pol I und Fibrillarin in Nucleoli mit mehreren FCs. (a-a'') Mit GFP-Fibrillarin (a) und RFP-mRPA53 (a') kotransfizierte HeLa-Zelle. (b) HeLa-Zelle mit GFP-mRPA194 und RFP-Fibrillarin transfiziert. (c) Hep-Zelle mit GFP-hRPA53 und RFP-Fibrillarin transfiziert. (d) Mit GFP-mRPA194 und RFP-Fibrillarin kotransfizierte PtK-Zelle. In allen Zellen gibt es Unterschiede zwischen pol I und Fibrillarin. In (a'') sind mehrere durch pol I markierte FCs zu sehen, die konzentrisch vom Fibrillarin-positiven DFC umgeben sind. Die von GFP-Fibrillarin ausgesparten Bereiche entsprechen den RFP-pol I markierten FCs (a'). Ein vergleichbares Verteilungsmuster zeigen auch die Beispiele (b-d), allerdings sind in diesen Fällen nur die Überlagerungen abgebildet.

5.1.2 Dichte fibrilläre und granuläre Komponente: Fibrillarin, B23 und ribosomale Proteine

Zur Untersuchung der Kompartimente DFC und GC wurde neben Fibrillarin das im GC lokalisierte nicht-ribosomale Protein B23 (NO38 bei *Xenopus*) in GFP- und RFP-Expressionsvektoren kloniert. Zusätzlich wurden die ribosomalen Proteine L10 und S14 kloniert, um deren Verteilung zu untersuchen. Außerdem stand GFP-L5 zur Verfügung (2.2.2).

5.1.2.1 Koexpression von Fibrillarin und B23

Zunächst sollte die Anordnung der nukleolären Strukturen DFC und GC in lebenden Zellen überprüft werden. Obwohl die Kompartimente in elektronenmikroskopischen Aufnahmen meist deutlich voneinander getrennt sichtbar sind und der Übergang wahrscheinlich einem bestimmten Schritt beim Zusammenbau der prä-Ribosomen entspricht (siehe Goessens, 1984, Hügle et al., 1985a), sind sie in der Immunfluoreszenz häufig kaum unterscheidbar, da sie eng miteinander verzahnt sind.

Die Proteine Fibrillarin und B23 waren in lebenden Interphase-Zellen heterogen verteilt (Abb. 5.14a-a'). Obwohl es Unterschiede in der Fluoreszenz der beiden Fusionsproteine gab, waren die Grenzen zwischen DFC und GC in der Überlagerung nicht so deutlich zu erkennen wie die zwischen FC und DFC (Abb. 5.14a'', vergleiche Abb. 5.12 und 5.13).

Üblicherweise wird deshalb die Lokalisation von DFC- und GC-spezifischen Proteinen mittels Immunfluoreszenz an segregierten Nukleoli durchgeführt. Nach Inhibition der pol I-Transkription durch Actinomycin D trennen sich FC und DFC in zwei kompakte, aneinandergrenzende Domänen, die bereits im Lichtmikroskop erkennbar sind (Jordan und McGovern, 1981).

Unter diesen Bedingungen wurden die koexprimierten Proteine Fibrillarin und B23 deutlich getrennt in DFC (RFP-Fibrillarin) und GC (GFP-B23) lokalisiert (Abb. 5.14b-b''). Die hier gezeigte Verteilung dieser beiden Proteine entspricht ebenfalls den Ergebnissen aus Immunlokalisationen (nicht gezeigt).

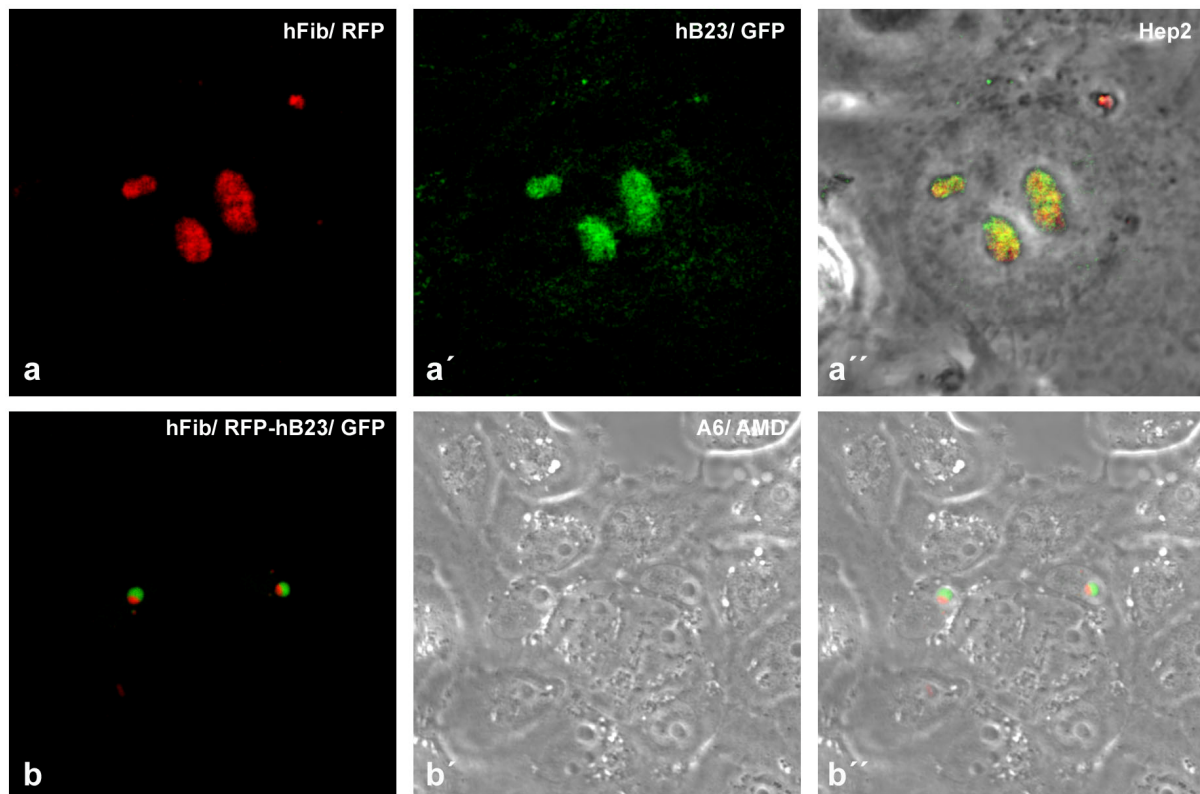


Abb. 5.14: Koexpression von Fibrillarin und B23. (a) RFP-Fibrillarin und (a') GFP-B23 in einer kotransfizierten Hep2-Zelle. (a'') In der Überlagerung ist eine räumliche Unterscheidung kaum möglich. (b-b'') A6-Zellen mit RFP-Fibrillarin und GFP-B23 transfiziert. Die Zellen wurden mit Actinomycin D behandelt, um spezifisch die pol I Transkription zu inhibieren. (b') DFC und GC sind in den segregierten Nukleoli als helle bzw. dunkle Phasenkontrast-Strukturen zu erkennen. (b'') RFP-Fibrillarin ist im DFC lokalisiert, GFP-B23 im GC.

5.1.2.2 Ribosomale Proteine

Der zeitliche und räumliche Zusammenbau der ribosomalen Proteine mit der prä-rRNA ist nicht im Detail bekannt (siehe 1.1.3). Die Lokalisierung ribosomaler Proteine sollte *in vivo* direkt mit der anderer nukleolärer Proteine verglichen werden (siehe oben). Dadurch sollten Anhaltspunkte für den Ort und Zeitpunkt der Integration ribosomaler Proteine erhalten werden (siehe 6.2).

In Abb. 5.15 ist die Koexpression von RFP-Fibrillarin und dem ribosomalen Protein GFP-L5 in menschlichen Zellen gezeigt. Das Fibrillarin-positive DFC umgab die fibrillären Zentren, die bei geeigneter Schnittebene als ausgesparte Bereiche sichtbar sind (Abb. 5.15a, vergleiche Abb. 5.13). Der von L5 markierte Bereich (b) umgab wiederum das DFC, wobei die beiden Proteine in einem Übergangsbereich kolokalisierten (Abb. 5.15a'', vergleiche Abb. 5.13a''). In segregierten Nukleoli wurde GFP-L5 eindeutig in der granulären Komponente lokalisiert (Abb. 5.15b-b''). In allen GFP-L5 exprimierenden Zellen war das ribosomale Protein sowohl im Nukleolus als auch im Cytoplasma lokalisiert (siehe Abb. 5.15 und 5.19).

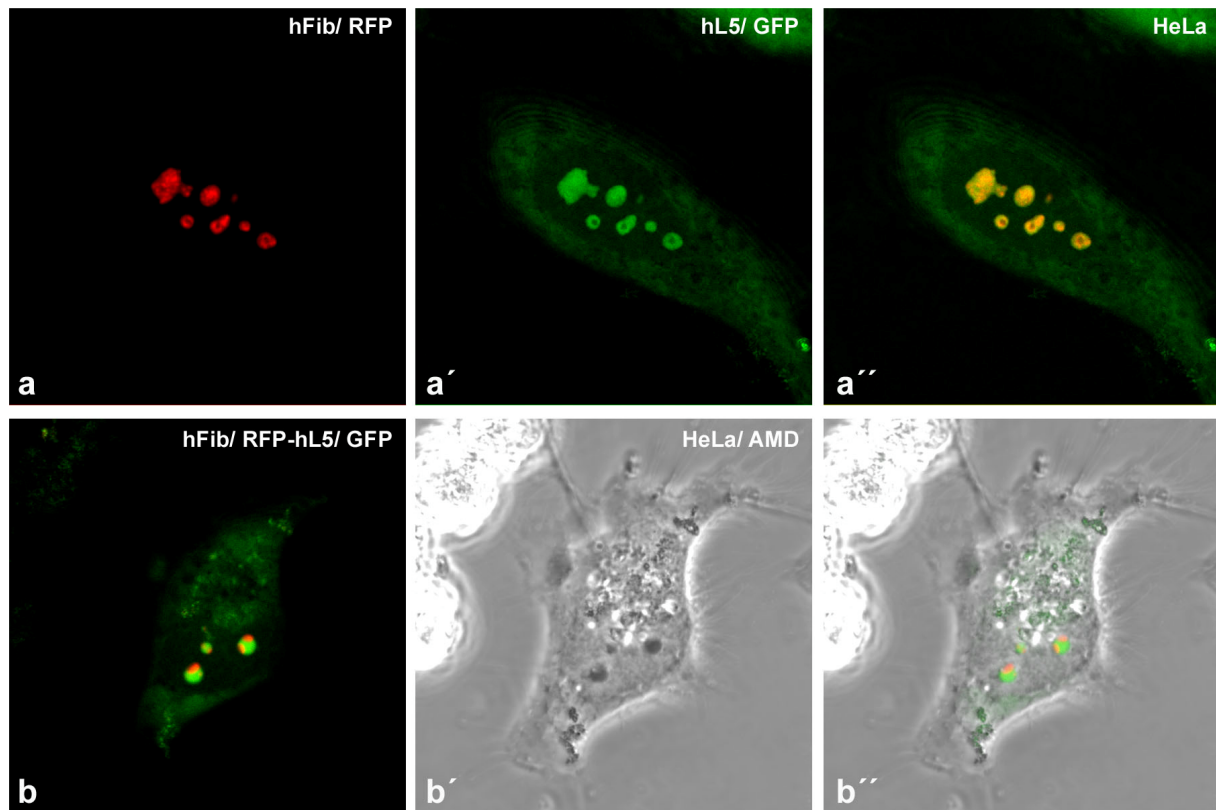


Abb. 5.15: Koexpression von Fibrillarin und L5. (a-a'') Koexpression von RFP-Fibrillarin und GFP-L5 in einer HeLa-Zelle. (b-b'') In den segregierten Nukleoli ist RFP-Fibrillarin im DFC lokalisiert und GFP-L5 im GC.

Die interessante, unterschiedliche Lokalisation der beiden Proteine in der Telophase ist in Abb. 5.16 dokumentiert (siehe auch 5.1.1.3). Während Fibrillarin mit den Chromosomen assoziiert ist (siehe auch Metaphase in Abb. 5.11), ist L5, charakteristisch für ein ribosomales Protein, in der gesamten Zelle verteilt. Beide Proteine sind in dieser Phase zusätzlich in einigen NDFs (nucleolus-derived foci) lokalisiert (siehe 1.3.1).

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß ein mit GFP fusioniertes ribosomales Protein wie das entsprechende endogene Protein in den Nukleolus importiert und offenbar in die Präribosomen integriert wird. Der Ort der Integration des Proteins L5, das relativ früh in die naszierende prä-ribosomale 60S Untereinheit eingebaut werden soll (siehe 1.1.3), ist die granuläre Komponente, bzw. der Übergangsbereich zwischen DFC und GC. Die GFP-L5 enthaltenden Ribosomen werden in das Cytoplasma exportiert und sind vermutlich funktionsfähig, da sie das Wachstum und die Lebensfähigkeit der transfizierten Zellen nicht einschränken (siehe Abb. 5.15a' und b, 5.16b).

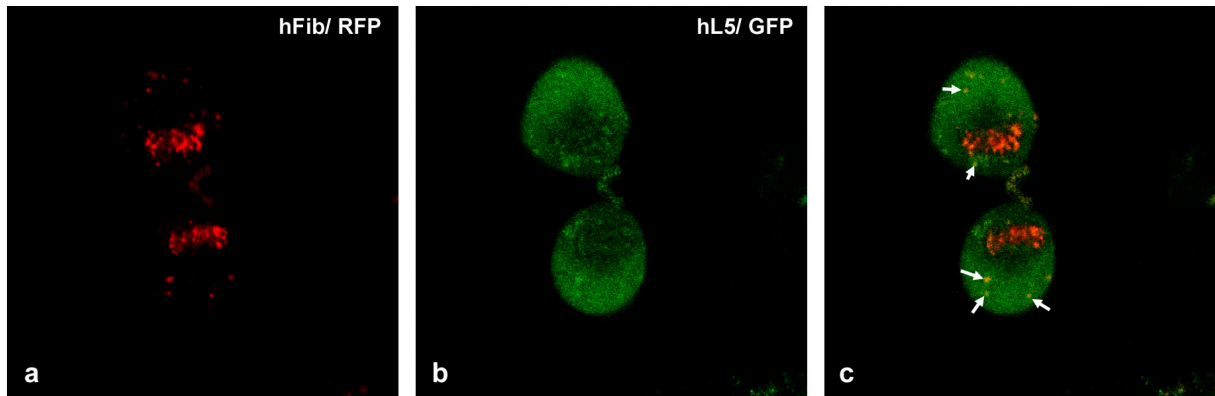


Abb. 5.16: Fibrillarin und L5 während der Mitose. Koexpression von RFP-Fibrillarin und GFP-L5 in einer HeLa-Zelle in Telophase. RFP-Fibrillarin ist noch mit den Chromosomen assoziiert (a), während GFP-L5 dispers in der Zelle verteilt ist (b). Beide Proteine kolokalisieren in einigen NDFs (c, Pfeile).

Im Verlauf dieser Arbeit wurden zwei weitere ribosomale Proteine (L4 und L10) kloniert, von denen bekannt war, daß sie relativ früh (L4) bzw. spät in die entstehenden Präribosomen integriert werden. L4 bindet bereits an die naszierenden prä-rRNA-Transkripte (Chooi und Leiby, 1981) und sollte somit einen geeigneten „Marker“ darstellen, um die topologische Verteilung der naszierenden Transkripte *in vivo* zu untersuchen.

GFP-L4 wurde wie L5 in Nukleolus und Cytoplasma lokalisiert (Abb. 5.17a). Nach Behandlung der Zellen mit AMD wurde das Fusionsprotein überraschenderweise ebenfalls in

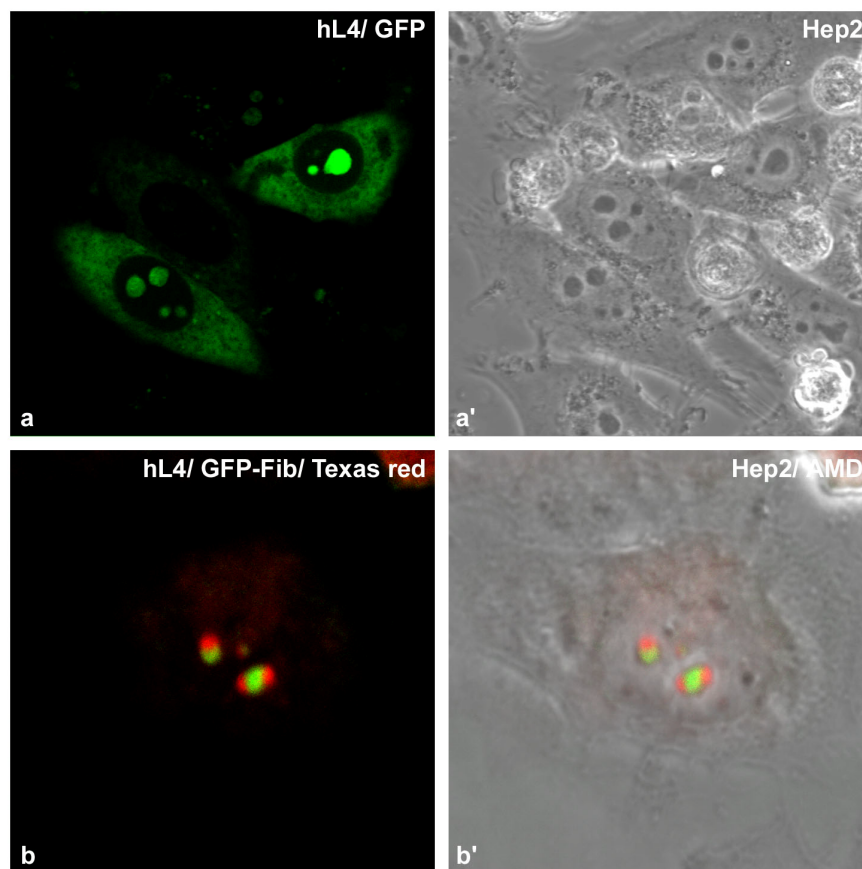


Abb. 5.17: Expression von GFP-hL4. (a-a') In Interphase Hep2-Zellen ist das ribosomale Protein in Nukleolus und Cytoplasma lokalisiert. (b-b') Fibrillarin-Immunfluoreszenz (rot) mit GFP-L4 transfizierten und AMD-behandelten Hep2-Zellen. GFP-L4 ist ausschließlich im GC lokalisiert (grün).

der granulären Komponente lokalisiert. Abb. 5.17b zeigt die eindeutig von Fibrillarin getrennte Lokalisation in den segregierten Nukleoli. Daher kann GFP-L4 nicht ohne weiteres als DFC-Marker verwendet werden. Es bleibt zu klären ob die früheren EM-Daten richtig sind (Chooi und Leiby, 1981). Andererseits kann nicht ausgeschlossen werden, daß die prä-rRNA-Transkripte nach AMD-Behandlung weiter prozessiert und mitsamt den gebundenen Proteinen in die granuläre Komponente transferiert werden, wo sie als stabile Intermediärprodukte akkumulieren (siehe Puvion-Dutilleul et al., 1997, Puvion-Dutilleul et al., 1992).

Das Protein L10 ist peripher mit Ribosomen assoziiert und wurde durch indirekte Immunfluoreszenz ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert. Daraus wurde geschlossen, daß L10 als eines der wenigen ribosomalen Proteine erst im Cytoplasma an die 60S Untereinheit bindet (Kruiswijk et al., 1978, Nguyen et al., 1998, siehe 1.2.1). Andererseits wurde bei der Hefe gezeigt, daß das Protein am Export von 60 S Untereinheiten aus dem Zellkern beteiligt ist und dort unter experimentellen Bedingungen auch akkumulieren kann (Gadal et al., 2001b, Karl et al., 1999, siehe 1.2.1). Daher war es wichtig, die intrazelluläre Verteilung von L10 eindeutig zu klären.

Zur Untersuchung von Transportprozessen stellen *Xenopus laevis* Oocyten ein hervorragendes Modellsystem dar. Zur Verwendung in zukünftigen Experimenten wurde daher neben dem menschlichen Protein auch das L10 Homolog von *Xenopus* kloniert (xL10). Die noch nicht charakterisierte Sequenz wurde von EST-Klonen abgeleitet (siehe Methoden) und ist zu 94% mit hL10 identisch (Abb. 5.18). Die beiden Proteine zeigten sowohl in menschlichen als auch in *Xenopus*-Zellen bei allen Versuchen die gleiche räumliche Verteilung.

Xenopus	1	MGRRPARCYRYCKNKPYPKSRFCRGVPDPKIRIFDLGRKKAKVDEFFPLCGHMVSDEYEQL
Mensch	1	MGRRPARCYRYCKNKPYPKSRFCRGVPDAKIRIFDLGRKKAKVDEFFPLCGHMVSDEYEQL
Hefe	1	MARRPARCYRYQKNKPYPKSRVNRVVPDSKIRIVDLGKKKATVDEFFPLCVHIVSNELEQL
Xenopus	61	SSEALEAARICANKYMKVSCGKDGFIHVRVRLHPPFHVNRINKMLSCAGADRLQTMRGAFG
Mensch	61	SSEALEAARICANKYMKVSCGKDGFIHVRVRLHPPFHVIRINKMLSCAGADRLQTMRGAFG
Hefe	61	SSEALEAARICANKYMTTVSGRDAFHLRVRVHPPFHVLRINKMLSCAGADRLQGMRGAWG
Xenopus	121	KPQGTVARVNIQGVIMSIRTKTONKEHVIEALRRAKFKFPGRQKIHISKKFGFTKFNADI
Mensch	121	KPQGTVARVHIQGVIMSIRTKLONKEHVIEALRRAKFKFPGRQKIHISKKWGFTKFNADI
Hefe	121	KPEGLAARVDIGQIIFSVIRTKDSNKNVVEGLRRARYKFPGQQKILSKKWGFTNLDRPE
Xenopus	181	FESMLAEKRLIPDGCYKYPNRRGPLDKWRATHAA-----
Mensch	181	FEDMVAEKRLIPDGCYKYPNRRGPLDKWRALHS-----
Hefe	181	YLKKREAGEVKDDGAFVVKFLSKKCSLENNIREFPPEYFAAQA

Abb. 5.18: Sequenzvergleich von L10 aus Mensch, *Xenopus* und Hefe. Die von der cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenz von xL10 (siehe Methoden) zeigt gegenüber hL10 96% Ähnlichkeit. Hefe-L10 zeigt gegenüber den anderen beiden Sequenzen 78% Ähnlichkeit. Identische Aminosäuren sind schwarz hinterlegt, ähnliche Aminosäuren sind grau hinterlegt.

In lebenden Zellen zeigte GFP-L10 unterschiedliche Verteilungen (Abb. 5.19). Meistens war eine ausschließlich cytoplasmatische Lokalisation zu beobachten (Abb. 5.19a, a'). In einigen Fällen wurde allerdings eine nukleoläre Akkumulation von L10 beobachtet. In manchen Zellen war das Protein zusätzlich zur regulären cytoplasmatischen Verteilung im Nukleolus lokalisiert (Abb. 5.19b, b'). In weiteren Fällen war kein cytoplasmatisches Protein nachweisbar und GFP-L10 war sowohl im Nukleolus als auch im Nukleoplasma lokalisiert. Das nukleoplasmatische L10 war dabei meist in mehreren extranukleolären Foci lokalisiert und zusätzlich in unterschiedlicher Quantität im Nukleoplasma verteilt (Abb. 5.19c, c'). Die Ursachen für diese Verteilungen sind noch unklar. Es bleibt nachzuweisen ob durch die Überexpression des Fusionsproteins der Export desselben, zumindest von überschüssigem GFP-L10 (Abb. 5.19b), blockiert wird.

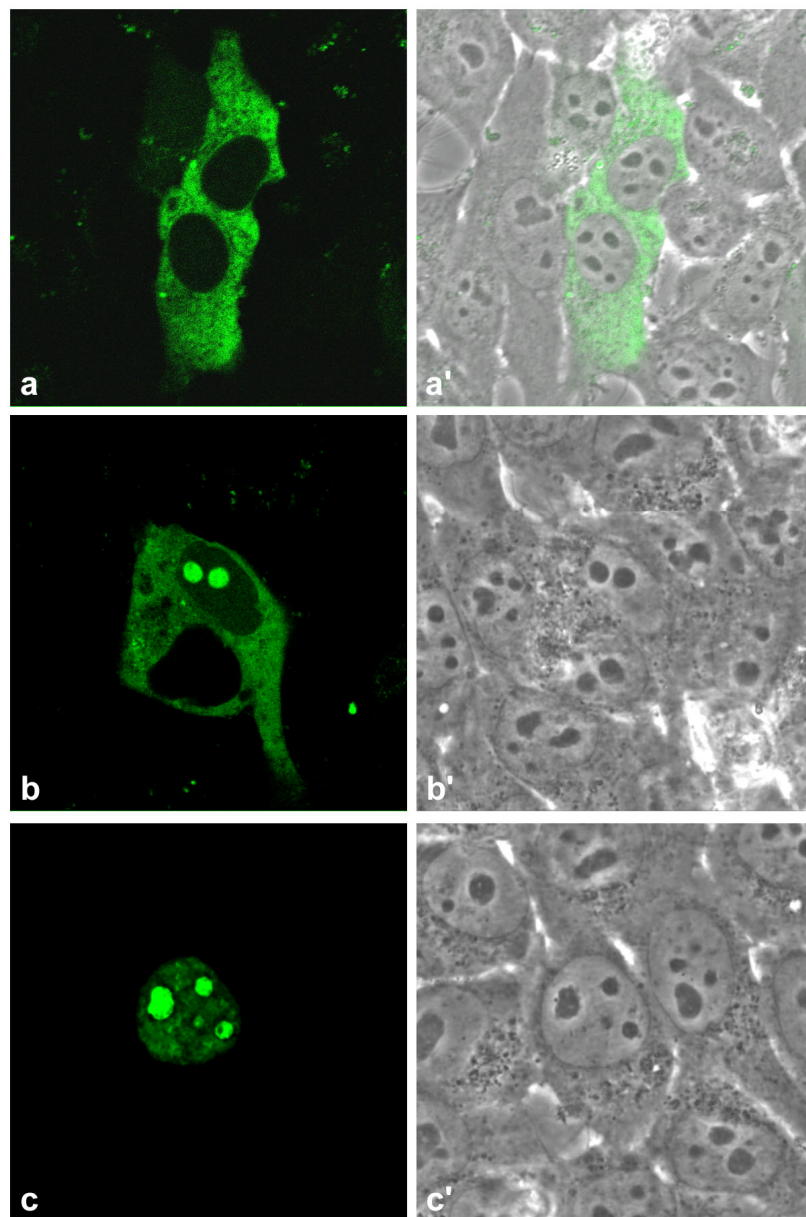


Abb. 5.19: *In vivo* Expression von GFP-L10. GFP-hL10 Lokalisation in lebenden Hep-Zellen. (a, a') L10 ist ausschließlich im Cytoplasma nachweisbar. (b, b') GFP-L10 wird in zwei Zellen im gleichen Maße im Cytoplasma exprimiert. Das Fusionsprotein ist in einer Zelle zusätzlich im Nukleolus lokalisiert, in der anderen nicht im Zellkern nachzuweisen. (c, c') Nukleoläre und nukleoplasmatische Akkumulation von GFP-L10 ohne nachweisbare cytoplasmatische Lokalisation.

Nach Fixierung der Zellen in Methanol/ Aceton ergab sich ein etwas anderes Bild. Unter diesen Bedingungen war GFP-L10 bei ca. 50% der Zellen sowohl im Nukleolus als auch im Cytoplasma lokalisiert (Abb. 5.20a, 5.22c). Diese Verteilung war also deutlich häufiger zu sehen als in lebend beobachteten Zellen (siehe Abb. 5.19b). Sie entsprach exakt derjenigen des ribosomalen Proteins L5 (Kotransfektion in Abb. 5.20, siehe auch Abb. 5.15).

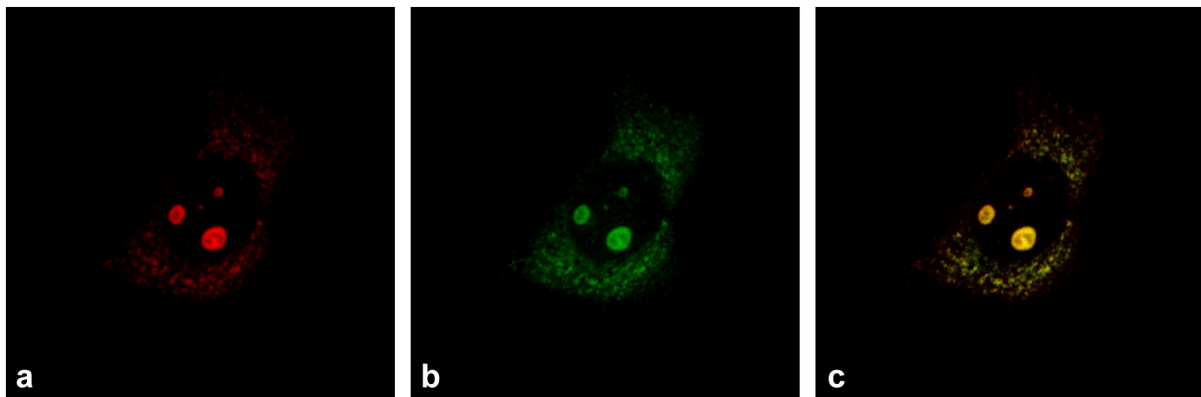


Abb. 5.20: Verteilung von L10 in fixierten Zellen. (a) RFP-xL10 ist nach der Fixierung von transfizierten A6-Zellen im Nukleolus sowie im Cytoplasma nachweisbar. (b) Die Verteilung des Proteins stimmt mit der GFP-hL5 Expression überein. (c) Die Überlagerung der beiden Aufnahmen zeigt die Kolokalisation der beiden Proteine im Nukleolus und im Cytoplasma.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß L10 doch im Nukleolus mit der 60 S Untereinheit assoziiert und sich sehr dynamisch verhält. Möglicherweise ist die nukleoläre Konzentration des Proteins im Fließgleichgewicht zu gering, um es in der Fluoreszenz nachzuweisen.

Die *in vivo*-Verteilung von GFP-L10 wurde weiterhin mit den Ergebnissen einer konventionellen Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen L10 (C17, Santa Cruz Biotechnology) verglichen. In Immunblots erkannte der Antikörper in isolierten Zellkernen, Cytoplasmafraktionen und Ribosomen ein Polypeptid von 25 kD (Abb. 5.21). Dieses Ergebnis bestätigte die Lokalisation von L10 im Zellkern.

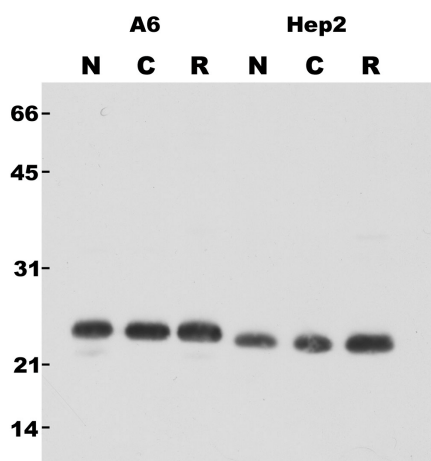


Abb. 5.21: Der Antikörper C17 erkennt das ribosomale Protein L10 von *Xenopus* (A6) und Säugerzellen (Hep2) im Western Blot. Die Proben waren: (N) Isolierte Zellkerne. (C) Cytoplasma-Fraktion (R) Isolierte cytoplasmatische Ribosomen. Das apparente Molekulargewicht von 25kD stimmt mit dem errechneten Wert für die Proteine hL10 und xL10 gut überein (ca. 24,6 kD).

In der Immunfluoreszenz zeigte der Antikörper C17 eine meist rein cytoplasmatische Verteilung (Abb. 5.22a), identisch mit der GFP-Fluoreszenz in Abb. 5.19a. In etlichen Zellen erschienen jedoch zusätzlich die Nukleoli umrandet (Abb. 5.22b, b', c'). Interessanterweise war dieses Muster auch in GFP-L10 transfizierten Zellen zu sehen und stimmte weitgehend mit der Verteilung des Fusionsproteins überein. Das nukleolär lokalisierte L10 wurde allerdings nicht vollständig erkannt, sondern vor allem die in der Peripherie des Nukleolus verteilten Fusionsproteine (Abb. 5.22c-c''). Noch deutlicher wird dieses Phänomen bei transfizierten Zellen, in denen das GFP-L10 fast vollständig im Kern akkumuliert ist (d-d''). Hier erkennt C17 das Fusionsprotein im Nukleoplasma und in der Peripherie des Nukleolus und nur in geringerem Ausmaß im Inneren des Nukleolus (d', d'').

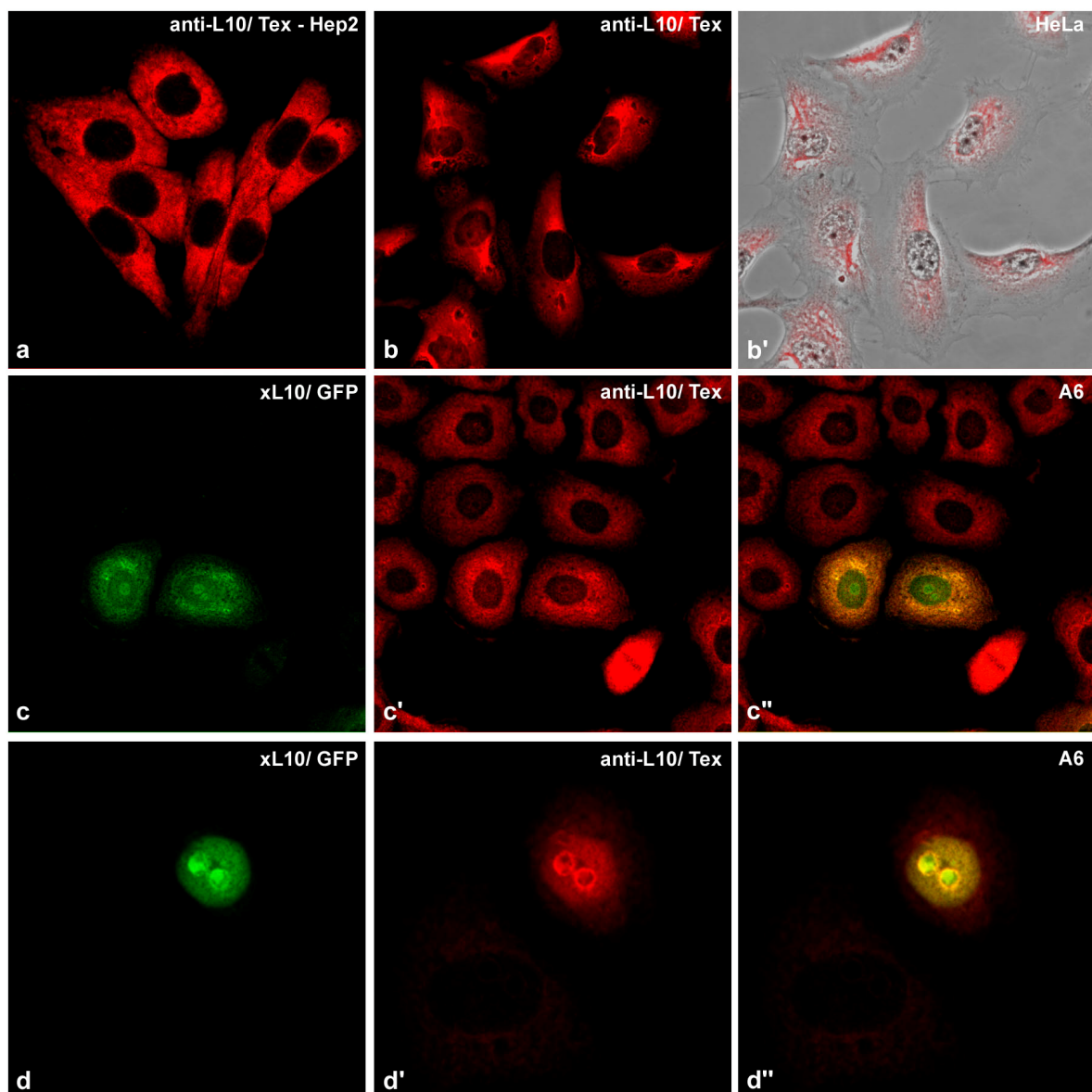


Abb. 5.22: Vergleich zwischen GFP-L10 Lokalisation und Immunlokalisation. (a) Immunfluoreszenz mit Antikörper C17 an Hep2-Zellen. L10 ist ausschließlich im Cytoplasma erkennbar. (b, b') Immunfluoreszenz mit C17 an HeLa-Zellen. Zusätzlich zur cytoplasmatischen Fluoreszenz ist teilweise eine Färbung des Nukleoplasmas in der nukleolären Peripherie zu erkennen. (c) GFP-xL10 Verteilung in fixierten A6-Zellen. (c', c'') Immunfluoreszenz mit C17. Der Antikörper erkennt das Fusionsprotein, die Fluoreszenz bleibt aber auf die Peripherie des Nukleolus beschränkt. Auch die nicht transfizierten Zellen zeigen eine schwächere perinukleoläre Fluoreszenz. (d) In einer GFP-xL10 stark überexprimierenden A6-Zelle ist der Export inhibiert. (d', d''). Durch die Immunfluoreszenz mit C17 wird wiederum hauptsächlich die nukleoläre Peripherie markiert.

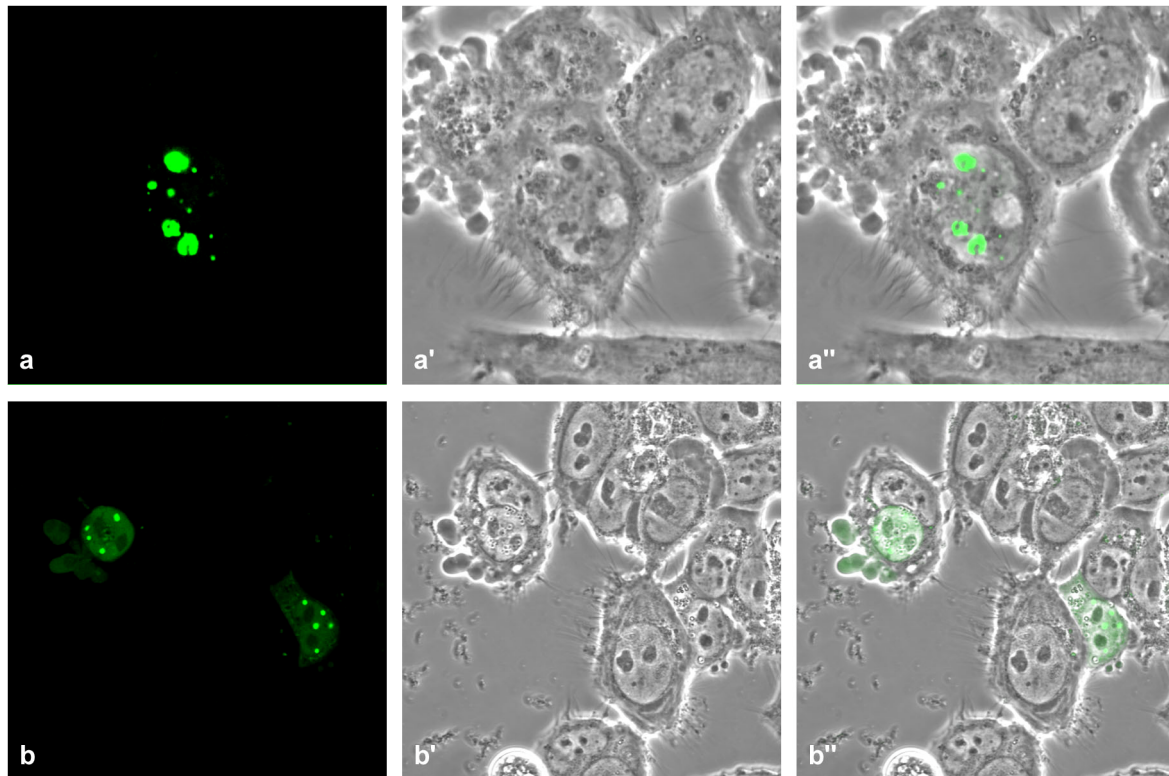


Abb. 5.23: Inhibition des Zellkern Exports von GFP-L10 durch Leptomycin B. GFP-L10 wurde in Hep2-Zellen exprimiert, die anschließend 1-16h mit 2,8 ng/ml LMB behandelt wurden, um den CRM1 spezifischen Exportweg zu blockieren. GFP-L10 akkumuliert im Nukleoplasma, wo das Protein in zusätzlichen Foci lokalisiert ist. Häufig ist das Fusionsprotein auch im Nukleolus lokalisiert (vergleiche Abb. 5.19c).

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Verteilung des ribosomalen Proteins L10 durch eine Reihe von experimentellen Parametern beeinflusst werden kann und nur durch eine Kombination der verschiedenen Lokalisierungsmethoden mit hinreichender Sicherheit aufklärbar ist. Auch wenn die bisherigen Ergebnisse eine Aussage über den genauen Ort der Integration von L10 in den Vorläufer der großen ribosomalen Untereinheit nicht zulassen, so zeigen sie wenigstens, daß dies im Zellkern geschieht, sehr wahrscheinlich in der nukleolären Peripherie oder an nukleoplasmatischen Präribosomen, kurz nach Verlassen des Nukleolus.

Der Export der großen ribosomalen Untereinheit erfolgt in Hefe über den CRM1-abhängigen Weg, mit dem Protein NMD3 als Adapter, das an L10 bindet (1.2.1). Um zu überprüfen ob dieser Exportweg auch für menschliches L10 gilt, wurden GFP-L10 exprimierende Zellen mit Leptomycin B (LMB) behandelt, das den CRM1-abhängigen Export hemmt (siehe 1.2.1). Dieser Versuch ergab eine Akkumulation der nukleoplasmatischen Präribosomen in Form von distinkten Foci außerhalb der Nukleoli und bei Zugabe von LMB direkt nach der Transfektion keine nachweisbare Lokalisation von L10 im Cytoplasma (Abb. 5.23). Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß menschliches L10 aller Wahrscheinlichkeit nach im Nukleolus an Präribosomen bindet und über den CRM1-abhängigen Exportweg aus dem Zellkern transportiert wird.

In Zukunft könnte also insbesondere die Expression von GFP-L10 in lebenden Zellen für die Untersuchung von Kern-Cytoplasma Transportprozessen nützlich sein (siehe 6.3).

5.2 Charakterisierung des nukleolären Proteins p52

Das Protein p52, ein *Xenopus laevis* Antigen des monoklonalen Antikörpers No56 (mAb56), sollte molekular charakterisiert werden. In der Immunfluoreszenz erkennt mAb56 ein nukleoläres Protein, das in der granulären Komponente lokalisiert ist und relativ spät in die nach der Mitose neu formierten Nukleoli integriert wird. Im Immunblot wird ein Polypeptid mit dem relativen Molekulargewicht von 52 kD erkannt (siehe 1.4.1, Krüger, 1998). Von diesem Antigen (p52) konnten bereits früher drei Peptidfragmente sequenziert werden, dessen Aminosäuresequenzen hohe Ähnlichkeit mit konservierten Bereichen an den Enden der α -helikalen Domäne von Cytokeratinen verschiedener Spezies (inklusive *Xenopus*) aufwiesen (Abb. 5.24, siehe auch Abb. 5.29).

Durch „Peptid-Scanning“ Analyse wurde das Epitop RQNHEYK von mAb56 identifiziert. Weiterhin wurden zwei Meerschweinchen-Seren gegen das C-terminale Peptid LLEVHDPQIGG hergestellt, das keine Homologie zu Cytokeratinen aufweist. Diese Antiseren reagierten im Immunblot ebenfalls mit einem 52 kD Polypeptid und lokalisierten ein nukleoläres Antigen in der Immunfluoreszenz (siehe 1.4.1).

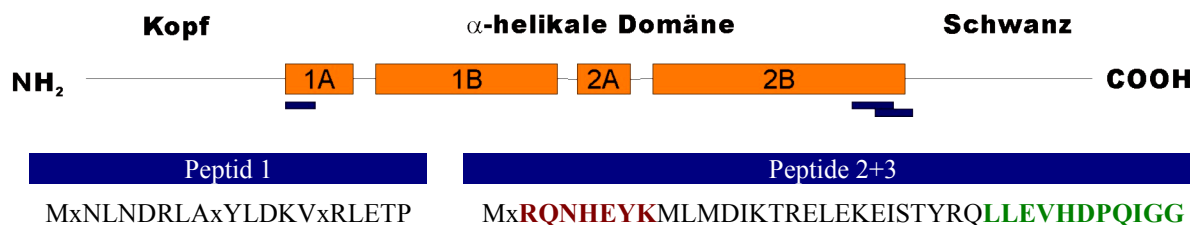


Abb. 5.24: Schematische Darstellung der Cytokeratinstruktur und Position der sequenzierten Peptidfragmente von p52. Das Epitop von mAb56 ist rot dargestellt, das Epitop der Peptid-Antikörper grün. x steht für eine nicht identifizierte Aminosäure.

Mit der Information dieser Aminosäuresequenzen konnte nun die für p52 kodierende DNA-Sequenz (cDNA) hergestellt, kloniert und sequenziert werden, um das Protein in vitro und in vivo zu exprimieren und genau charakterisieren zu können.

5.2.1 cDNA-Klonierung

Zur Identifizierung der cDNA Sequenz von p52 wurden cDNA-Expressionsbibliotheken mit den vorhandenen Antikörpern durchmustert (Krüger, 1998). Dieser Ansatz erbrachte leider kein spezifisches Ergebnis. Als Alternative blieb der Versuch der direkten Amplifikation der p52-cDNA durch RT-PCR mit Hilfe der aus den erhaltenen Peptidsequenzen abgeleiteten Nukleotidsequenzen. Zu Beginn dieses Versuches waren keine ansequenzierten EST-Klone (siehe 3.2.3) in den Datenbanken vorhanden, die den vorhandenen Aminosäuresequenzen entsprachen.

5.2.1.1 RT-PCR mit degenerierten Primern

Es wurde aus den bekannten Peptiden 1 und 3 (siehe Abb. 5.24) jeweils eine Sequenz von sieben Aminosäuren ausgewählt und die möglichen kodierenden DNA-Triplets ermittelt. Eine Mischung aus allen Oligonukleotiden wurde hergestellt und als „degenerierte“ Primer für die RT-PCR mit RNA aus *Xenopus*-Oocyten verwendet (siehe 3.2.3).

Es wurde ein PCR-Produkt von 918 bp Länge amplifiziert, kloniert und sequenziert (siehe Methoden). Die davon abgeleitete Peptidsequenz enthielt die bekannten Teilsequenzen von p52 und war dem Cytokeratin 19 von verschiedenen Spezies sehr ähnlich (siehe Abb.

5.29). Die 918 bp umfassende cDNA-Sequenz ist in der anschließend ermittelten Gesamtsequenz von xCK19/1 enthalten (siehe unten).

5.2.1.2 Klonierung der vollständigen cDNA

Um die komplette cDNA-Sequenz von p52 zu erhalten, wurden spezifische Primer aus der 918 bp Sequenz gewählt, um durch RACE das 5'-Ende bzw. das 3'-Ende der cDNA zu amplifizieren (siehe 3.2.4).

Bei diesen Versuchen wurden zwei unterschiedliche PCR-Produkte amplifiziert und sequenziert. Sie enthalten einen Teil des 5' untranslatierten Bereichs und den 3' untranslatierten Bereich bis zum poly(A) Schwanz. Es wurden weitere Primer ausgesucht, um die vollständigen cDNAs zu amplifizieren, klonieren und sequenzieren. Zusätzlich zu den zwei bereits identifizierten Sequenzen wurde hierbei ein drittes PCR-Produkt gefunden.

Die drei Nukleotidsequenzen besitzen ein durchgehendes Leseraster und kodieren für Proteine, die homolog zu dem Typ I Cytokeratin 19 verschiedener Spezies sind (siehe Abb. 5.29). Sie erhielten demnach die Bezeichnung xCK19/1-3 (Abb. 5.25-5.28).

In der vorliegenden Arbeit wurden die xCK19/1-3 kodierenden mRNAs in Oocyten und die xCK19/2-3 kodierenden mRNAs in A6 Zellen identifiziert, wobei xCK19/2-Oo. im Vergleich zu xCK19/2-A6 eine 15 Nukleotide lange, repetierte Sequenz fehlt (Abb. 5.27). Die Sequenzen waren nicht in öffentlichen Datenbanken enthalten. Mittlerweile sind EST-Klone veröffentlicht, die jeweils Teilsequenzen von xCK19/1-3 enthalten und mit den hier beschriebenen Sequenzen übereinstimmen.

5.2.2 *Xenopus laevis* Cytokeratin 19

Die Aminosäuresequenzen von xCK19/1-3 werden aufgrund der sehr hohen Ähnlichkeit untereinander hier als Isoformen des *Xenopus* Cytokeratin 19 bezeichnet. Ein *Xenopus* Ortholog von CK19 wurde bisher nicht veröffentlicht. Die wesentlichen Unterschiede in der Primärstruktur der in der vorliegenden Arbeit identifizierten Proteine bestehen in der Länge der nicht-helikalen Kopffregion und der C-terminalen Schwanzdomäne (Abb. 5.25).

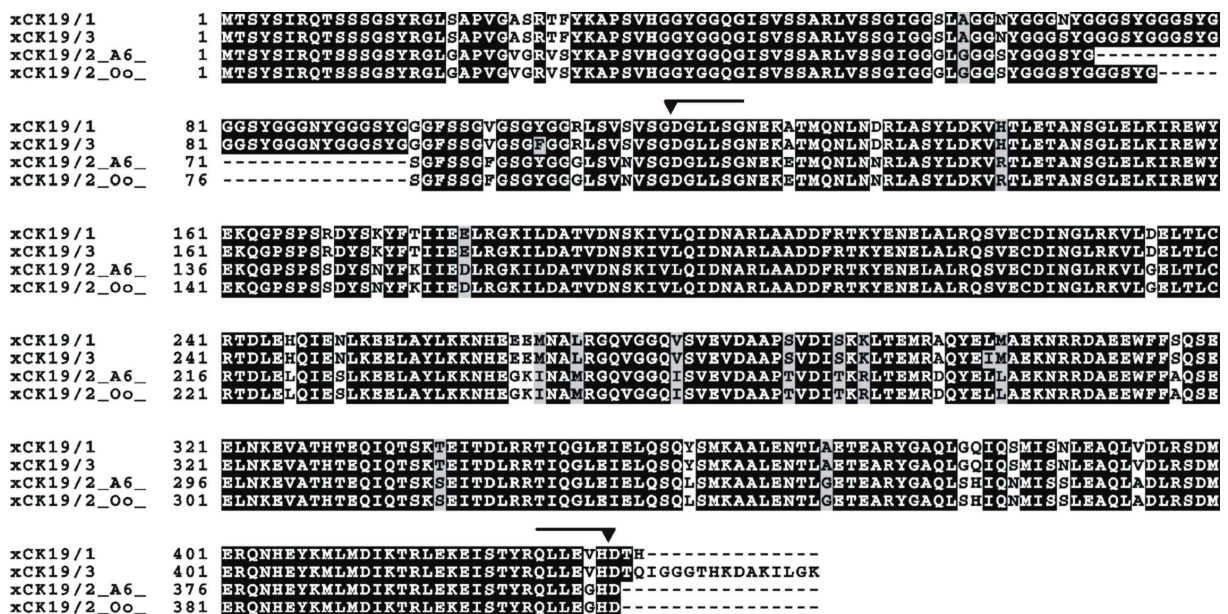


Abb. 5.25: Vergleich der Aminosäuresequenzen von xCK19/1-3. Identische Aminosäuren sind schwarz hinterlegt, ähnliche grau. Anfang und Ende der α -helikalen Domäne sind durch Pfeile markiert. XCK19/1 und /3 unterscheiden sich bis auf die C-terminale Region praktisch nicht. Die beiden Formen von xCK19/2, die in A6-Zellen und Oocyten gefunden wurden, sind bis auf eine Wiederholung der Sequenz GGSYG (Aminosäuren 71-75) identisch.

CCT	GAC	ACA	GCT	ACC	M	T	S	Y	S	I	R	Q	T	S	S	S	G	18
					ATG	ACC	TCC	TAC	AGC	ATT	CGC	CAG	ACA	AGC	TCC	TCC	GCC	54
S	Y	R	G	L	S	A	P	V	G	A	S	R	T	F	Y	K	A	36
TCT	TAT	AGA	GGC	TTG	AGT	GCC	CCT	GTT	GGA	GCT	AGC	AGA	ACG	TTC	TAC	AAA	GCC	108
P	S	V	H	G	G	Y	G	G	Q	G	I	S	V	S	S	A	R	54
CCA	AGT	GTC	CAT	GGT	GGC	TAT	GGG	GGC	CAG	GGC	ATT	TCT	GTT	TCT	GCC	AGA	162	
L	V	S	S	G	I	G	G	S	L	A	G	G	N	Y	G	G	G	72
TTG	GTT	TCT	TCT	GGC	ATA	GGT	GGG	AGC	CTT	GCT	GGT	GGT	AAC	TAT	GGA	GGT	GGT	216
N	Y	G	G	G	S	Y	G	G	G	S	Y	G	G	G	S	Y	G	90
AAC	TAT	GGA	GGT	GGT	AGC	TAT	GGA	GGT	GGT	AGC	TAT	GGA	GGT	GGT	AGC	TAT	GCC	270
G	G	N	Y	G	G	G	S	Y	G	G	G	F	S	S	G	V	G	108
GGT	GGT	AAC	TAT	GGA	GGT	GGT	AGC	TAT	GGT	GGT	GGG	TTT	AGC	AGT	GGT	GTT	GGT	324
S	G	Y	G	G	R	L	S	V	S	V	T	S	D	G	L	L	S	126
TCT	GGA	TAT	GGT	GGT	AGG	CTC	AGT	GTC	AGT	GTA	TCA	GGG	GAT	GGC	CTG	CTG	TCT	378
G	N	E	K	A	T	M	Q	N	L	N	D	R	L	A	S	Y	L	144
GGC	AAT	GAG	AAG	GCG	ACC	ATG	CAG	AAT	CTG	AAT	GAC	CGA	CTG	GCA	TCA	TAC	CTG	432
D	K	V	H	T	L	E	T	A	N	S	G	L	E	L	K	I	R	162
GAT	AAG	GTG	CAC	ACT	CTG	GAG	ACC	GCC	AAT	TCA	GGC	TTG	GAG	CTG	AAG	ATC	CGG	486
E	W	Y	E	K	Q	G	P	S	P	S	R	D	Y	S	K	Y	F	180
GAG	TGG	TAT	GAA	AAG	CAG	GGA	CCC	AGC	CCT	TCC	CGT	GAC	TAC	AGC	AAA	TAT	TTT	540
T	I	I	E	E	L	R	A	G	K	I	L	D	A	T	V	D	N	198
ACA	ATC	ATT	GAG	GAG	CTC	AGA	GGC	AAG	ATC	CTT	GAT	GAC	ACC	GTT	GAC	AAT	TCC	594
K	I	V	L	Q	I	D	N	A	R	L	A	A	D	D	F	R	T	216
AAG	ATT	GTA	CTG	CAA	ATT	GAT	AAT	GCC	AGG	CTG	GCT	GCA	GAT	GAC	TTC	AGA	ACC	648
K	Y	E	N	E	L	A	L	R	Q	S	V	E	C	D	I	N	G	234
AAG	TAT	GAG	AAT	GAG	TTG	GCC	CTG	AGA	CAG	AGT	GTG	GAA	TGT	GAC	ATC	AAT	GCC	702
L	R	K	V	L	D	E	L	T	L	C	R	T	D	L	E	H	Q	252
CTA	CGC	AAG	GTC	TTG	GAT	GAG	CTG	ACC	TTG	TGC	AGA	ACT	GAC	CTG	GAA	CAC	CAG	756
I	E	N	L	K	E	E	L	A	Y	L	K	K	N	H	E	E	E	270
ATT	GAA	AAC	TTG	AAG	GAA	GAG	CTG	GCT	TAC	CTG	AAG	AAG	AAT	CAT	GAA	GAG	GAA	810
M	N	A	L	R	G	Q	V	G	G	Q	V	S	V	E	V	D	A	288
ATG	AAC	GCA	TTG	CGT	GGA	CAA	GTT	GGT	GGG	CAA	GTC	AGT	GTT	GAA	GTG	GAT	GCG	864
A	P	S	V	D	I	S	K	K	L	T	E	M	R	A	Q	Y	E	306
GCA	CCG	TCG	GTG	GAT	ATT	TCC	AAG	AAA	TTG	ACA	GAA	ATG	AGG	GCA	CAG	TAT	GAG	918
L	M	A	E	K	N	R	R	A	D	A	E	E	W	F	F	S	Q	324
CTC	ATG	GCT	GAA	AAG	AAC	CGC	AGA	GAC	GCA	GAG	GAG	TGG	TTC	TTC	AGT	CAG	TCG	972
E	E	L	N	K	E	V	A	T	H	T	E	Q	I	Q	T	S	K	342
GAA	GAG	TTA	AAC	AAA	GAA	GTG	GCA	ACT	CAT	ACA	GAA	CAG	ATT	CAG	ACC	AGC	AAA	1026
T	E	I	T	D	L	R	R	T	I	Q	G	L	E	I	E	L	Q	360
ACG	GAG	ATC	ACA	GAC	CTG	AGA	CGC	ACA	ATC	CAA	GGG	CTG	GAA	ATA	GAA	CTG	CAG	1080
S	Q	Y	S	M	K	A	A	L	E	N	T	L	A	E	T	E	A	378
TCA	CAG	TAC	AGC	ATG	AAA	GCA	GCC	CTT	GAA	AAC	ACA	CTG	GCG	GAA	ACA	GAA	GCC	1134
R	Y	G	A	Q	L	G	Q	I	Q	S	M	I	S	N	L	E	A	396
CGT	TAT	GGA	GCC	CAG	CTA	GGG	CAA	ATA	CAG	AGT	ATG	ATC	AGT	AAC	CTA	GAA	GCA	1188
Q	L	V	D	L	R	S	D	M	E	R	Q	N	H	E	Y	K	M	414
CAG	CTT	GTA	GAC	CTG	CGA	AGT	GAC	ATG	GAG	CGG	CAG	AAC	CAC	GAA	TAC	AAG	ATG	1242
L	M	D	I	K	T	R	L	E	K	E	I	S	T	Y	R	Q	L	432
CTC	ATG	GAC	ATC	AAG	ACC	CGT	CTG	GAG	AAA	GAG	ATC	AGC	ACC	TAT	CGT	CAG	CTA	1296
L	E	V	H	D	T	H	TAA	AAT	CTT	AGG	AAA	GTG	AGG	CCA	CGT	GGG	GAC	439
CTA	GAA	GTG	CAT	GAT	ACA	CAC	TAA	AAT	CTT	AGG	AAA	GTG	AGG	CCA	CGT	GGG	GAC	1350
CTG	AGA	CAG	CCT	GCA	ATC	AAG	TCC	ACC	TTC	ACT	AAT	TGC	ATT	GAA	AAC	GCT	TAT	1404
GGG	GAG	TCC	ATC	ACA	CAC	AGA	TCC	ATT	ACT	TTT	CCC	ACT	GCC	ACA	AAA	TTG	ATG	1458
ATG	CTT	TAG	AAA	TTC	ACT	TGC	ATA	ACC	TCA	CTT	GTT	TAC	AAG	CTT	CAA	CTG	TCT	1512
<u>TAA</u>	<u>TAA</u>	<u>ATG</u>	GTT	TTT	GGG	CCA	AGC	ATT	AAA	AAG								1545

Abb. 5.26: Nukleotidsequenz von xCK19/1 mit der davon abgeleiteten Aminosäuresequenz. Das Startkodon (ATG) sowie das Stopkodon (TAA) sind fettgedruckt. Das Polyadenylierungssignal ist unterstrichen.

AGT	TAC	ACT	CCT	GTG	TTC	TGC	AAC	TCT	AAG	CCT	GAC	ACA	GCT	ACC	M	T	S	18
															ATG	ACC	TCC	54
Y	S	I	R	Q	T	S	S	S	G	S	Y	R	G	L	G	A	P	36
TAC	AGC	ATT	CGC	CAG	ACA	AGC	TCC	TCC	GGC	TCT	TAC	AGA	GGC	TTG	GGT	GCC	CCT	108
V	G	V	G	R	V	S	Y	K	A	P	S	V	H	G	G	Y	G	54
GTT	GGA	GTT	GGA	AGA	GTT	TCC	TAC	AAA	GCC	CCA	AGT	GTC	CAT	GGT	GCC	TAT	GGG	162
G	Q	G	I	S	V	S	S	A	R	L	V	S	S	G	I	G	G	72
GGC	CAG	GGT	ATC	TCT	GTG	TCT	TCT	GCC	AGG	TTG	GTT	TCC	TCT	GGC	ATA	GGT	GGG	216
G	L	G	G	G	S	Y	G	G	G	S	Y	G	(G	G	S	Y	G)	90
GGC	CTT	GGT	GGT	GGT	AGC	TAT	GGT	GGT	GGT	AGC	TAT	GGA	(GGT	GGT	AGC	TAT	GGC)	270
S	G	F	S	S	G	F	G	S	G	Y	G	G	G	L	S	V	N	108
AGT	GGG	TTT	AGC	AGT	GGT	TTT	GGT	TCT	GGA	TAT	GGT	GGT	GGG	CTT	AGT	GTC	AAT	324
V	S	G	D	G	L	L	S	G	N	E	K	E	T	M	Q	N	L	126
GTA	TCT	GGG	GAT	GC	CTG	CTG	TCT	GCC	AAT	GAG	AAG	GAG	ACC	ATG	CAG	AAT	CTT	378
N	N	R	L	A	S	Y	L	D	K	V	R	T	L	E	T	A	N	144
AAT	AAT	CGG	CTG	GCA	TCA	TAC	CTG	GAT	AAG	GTG	CGC	ACC	CTG	GAG	ACC	GCC	AAT	432
S	G	L	E	L	K	I	R	E	W	Y	E	K	Q	G	P	S	P	162
TCA	GGC	TTG	GAG	CTG	AAG	ATC	CGG	GAG	TGG	TAT	GAA	AAG	CAG	GGA	CCC	AGC	CCT	486
S	S	D	Y	S	N	Y	F	K	I	I	E	D	L	R	G	K	I	180
TCC	AGC	GAC	TAC	AGC	AAT	TAT	TTT	AAA	ATC	ATT	GAG	GAC	CTC	AGA	GGC	AAG	ATT	540
L	D	A	T	V	D	N	S	K	I	V	L	Q	I	D	N	A	R	198
CTT	GAT	GCC	ACC	GTT	GAC	AAT	TCC	AAG	ATT	GTG	TTG	CAA	ATT	GAT	AAC	GCC	AGG	594
L	A	A	D	D	F	R	T	K	Y	E	N	E	L	A	L	R	Q	216
CTG	GCT	GCA	GAT	GAC	TTC	AGG	ACC	AAG	TAT	GAG	AAT	GAG	TTG	GCC	CTC	AGA	CAG	648
S	V	E	C	D	I	N	G	L	R	K	V	L	G	E	L	T	L	234
AGT	GTG	GAA	TGT	GAT	ATC	AAT	GGC	CTG	CGC	AAG	GTC	TTG	GGT	GAG	CTG	ACC	TTG	702
C	R	T	D	L	E	L	Q	I	E	S	L	K	E	E	L	A	Y	252
TGT	AGA	ACC	GAC	CTG	GAA	CTC	CAG	ATT	GAA	AGC	CTG	AAG	GAA	GAG	CTG	GCT	TAC	756
L	K	K	N	H	E	G	K	I	N	A	M	R	G	Q	V	G	G	270
CTG	AAG	AAG	AAT	CAT	GAA	GGG	AAA	ATT	AAT	A	ATG	CGT	GGC	CAA	GTC	GGT	GGA	810
Q	I	S	V	E	V	D	A	A	P	T	V	D	I	T	K	R	L	288
CAA	ATC	AGC	GTT	GAA	GTG	GAT	GCG	GCG	CCA	ACG	GTG	GAC	ATT	ACT	AAG	AGA	TTG	864
T	E	M	R	D	Q	Y	E	L	L	A	E	K	N	R	R	D	A	306
ACA	GAA	ATG	AGA	GAC	CAA	TAT	GAG	CTC	TTG	GCA	GAA	AAG	AAC	CGC	AGA	GAT	GCA	918
E	E	W	F	F	A	Q	S	E	E	L	N	K	E	V	A	T	H	324
GAG	GAA	TGG	TTC	TTC	GCA	CAG	TCC	GAG	GAG	TTG	AAC	AAA	GAA	GTG	GCA	ACC	CAT	972
T	E	Q	I	Q	T	S	K	S	E	I	T	D	L	R	R	T	I	342
ACA	GAA	CAG	ATT	CAG	ACC	AAA	TCG	GAG	ATC	ACG	GAC	CTG	AGA	CGC	ACA	ATC	1026	
Q	G	L	E	I	E	L	Q	S	Q	L	S	M	K	A	A	L	E	360
CAG	GGC	CTG	GAA	ATA	GAA	CTG	CAG	TCA	CAG	CTC	AGC	ATG	AAA	GCC	GCA	TTG	GAA	1080
N	T	L	G	E	T	E	A	R	Y	G	A	Q	L	S	H	I	Q	378
AAC	ACA	CTT	GGG	GAA	ACA	GAA	GCC	CGT	TAT	GGA	GCC	CAG	CTA	TCG	CAT	ATA	CAG	1134
N	M	I	S	S	L	E	A	Q	L	A	D	L	R	S	D	M	E	396
AAC	ATG	ATC	AGT	AGC	TTA	GAA	GCA	CAG	CTT	GCG	GAC	CTC	CGA	AGT	GAC	ATG	GAG	1188
R	Q	N	H	E	Y	K	A	M	L	M	D	I	K	T	R	L	E	414
CGG	CAG	AAC	CAC	GAA	TAC	AAG	ATG	CTC	ATG	GAC	ATC	AAG	ACC	CGT	CTG	GAG	AAA	1242
E	I	S	T	Y	R	Q	L	L	E	G	H	D	*					427
GAG	ATC	AGT	ACC	TAT	CGT	CAG	CTA	CTA	GAA	GGG	CAT	GAC	TAA	AAT	CGG	AGG	GAA	1296
GTG	AGG	CCA	CTT	GTG	GAC	CTG	AGA	CAG	CCT	GCA	ATC	AAG	CCC	ACC	TTC	ACT	AAT	1350
TGC	TCA	GAA	AAA	GCT	TAT	GAG	GAG	ACC	ATC	ACA	CAA	GGA	ATC	CCT	TAC	TCT	TTC	1404
CAC	TGC	CAG	AGT	AAA	GGT	CTA	GCA	CCT	TGA	GAC	CAG	AAG	TCC	CTA	GAA	AAT	GAT	1458
GAT	GCT	TTA	GAA	ATT	CTC	TTG	CTT	AAC	CTC	ACT	AGT	TTA	TAT	GCT	TCA	GCT	ATC	1512
TTA	ATA	AAT	TCA	CGT	TTT	TGG	GCC	AAG	CAT	TTA	AAA	G						1549

Abb. 5.27: Nukleotidsequenz von xCK19/2-Oo. mit der davon abgeleiteten Aminosäuresequenz. Das Startkodon (ATG) sowie das Stopkodon (TAA) sind fettgedruckt. Das Polyadenylierungssignal ist unterstrichen. Die bei xCK19/2-A6 fehlende Wiederholungssequenz (GGSYG) ist kursiv und in Klammern gesetzt.

CCT	GAC	ACA	GCT	ACC	M	T	S	Y	S	I	R	Q	T	S	S	S	G	18
					ATG	ACC	TCC	TAC	AGC	ATT	CGC	CAG	ACA	AGC	TCC	TCC	GCC	54
S	Y	R	G	L	S	A	P	V	G	A	S	R	T	F	Y	K	A	36
TCT	TAT	AGA	GGC	TTG	AGT	GCC	CCT	GTT	GGA	GCT	AGC	AGA	ACG	TTC	TAC	AAA	GCC	108
P	S	V	H	G	G	Y	G	G	Q	G	I	S	V	S	S	A	R	54
CCA	AGT	GTC	CAT	GGT	GGC	TAT	GGG	GGC	CAG	GGC	ATT	TCT	GTT	TCT	GCC	AGA	162	
L	V	S	S	G	I	G	G	S	L	A	G	G	N	Y	G	G	G	72
TTG	GTT	TCT	TCT	GGC	ATA	GGT	GGG	AGC	CTT	GCT	GGT	GGT	AAC	TAT	GGA	GGT	GGT	216
S	Y	G	G	G	S	Y	G	G	G	S	Y	G	G	G	S	Y	G	90
AGC	TAT	GGA	GGT	GGT	AGC	TAT	GGA	GGT	GGT	AGC	TAT	GGA	GGT	GGT	AGC	TAT	GCC	270
G	G	N	Y	G	G	G	S	Y	G	G	G	F	S	S	G	V	G	108
GGT	GGT	AAC	TAT	GGA	GGT	GGT	AGC	TAT	GGT	GGT	GGG	TTT	AGC	AGT	GGT	GTT	GGT	324
S	G	F	G	G	R	L	S	V	S	V	TCA	GGG	D	G	L	L	S	126
TCT	GGA	TTT	GGT	GGT	AGG	CTC	AGT	GTC	AGT	GTA	S	GGG	GAT	GGC	CTG	CTC	TCT	378
G	N	E	K	A	T	M	Q	N	L	N	D	R	L	A	S	Y	L	144
GGC	AAT	GAG	AAG	GCG	ACC	ATG	CAG	AAT	CTG	AAT	GAC	CGA	CTG	GCA	TCA	TAC	CTG	432
D	K	V	H	T	L	E	T	A	N	S	G	L	E	L	K	I	R	162
GAT	AAG	GTG	CAC	ACT	CTG	GAG	ACC	GCT	AAT	TCA	GGC	TTG	GAG	CTG	AAG	ATC	CGG	486
E	W	Y	E	K	Q	G	P	S	P	S	R	D	Y	S	K	Y	F	180
GAG	TGG	TAT	GAA	AAG	CAG	GGA	CCC	AGC	CCT	TCC	CGT	GAC	TAC	AGC	AAA	TAT	TTT	540
T	I	I	E	E	L	R	A	G	K	A	L	D	A	T	V	D	N	198
ACA	ATC	ATT	GAG	GAG	CTC	AGA	GGC	AAG	ATC	CTT	GAT	GAC	ACC	GTT	GAC	AAT	TCC	594
K	I	V	L	Q	I	D	N	A	R	L	A	A	D	D	F	R	T	216
AAG	ATT	GTA	CTG	CAG	ATT	GAT	AAT	GCC	AGG	CTG	GCT	GCA	GAT	GAC	TTC	AGA	ACC	648
K	Y	E	N	E	L	A	L	R	Q	S	V	E	C	D	I	N	G	234
AAG	TAT	GAG	AAT	GAG	TTG	GCC	CTG	AGA	CAG	AGT	GTG	GAA	TGT	GAC	ATC	AAT	GCC	702
L	R	K	V	L	D	E	L	T	L	C	R	T	D	L	E	H	Q	252
CTG	CGC	AAG	GTC	TTG	GAT	GAG	TTG	ACC	TTG	TGC	AGA	ACT	GAC	CTG	GAA	CAC	CAG	756
I	E	N	L	K	E	E	L	A	T	L	K	K	N	H	E	E	E	270
ATT	GAA	AAC	TTG	AAG	GAA	GAG	CTG	GCT	YAC	CTG	AAG	AAG	AAT	CAT	GAA	GAG	GAA	810
M	N	A	L	R	G	Q	V	G	G	Q	V	S	V	E	V	D	A	288
ATG	AAC	GCA	TTG	CGT	GGA	CAA	GTT	GGT	GGG	CAA	GTC	AGC	GTT	GAA	GTG	GAT	GCG	864
A	P	S	V	D	I	S	K	K	L	T	E	M	R	A	Q	Y	E	306
GCA	CCG	TCG	GTG	GAT	ATT	TCC	AAG	AAA	TTG	ACA	GAA	ATG	AGG	GCA	CAG	TAT	GAG	918
I	M	A	E	K	N	R	R	A	D	A	E	E	W	F	F	S	Q	324
ATC	ATG	GCT	GAA	AAG	AAC	CGC	AGA	GAC	GCA	GAG	GAG	TGG	TTC	TTC	AGT	CAG	TCG	972
E	E	L	N	K	E	V	A	T	H	T	E	Q	I	Q	T	S	K	342
GAA	GAG	TTA	AAC	AAA	GAA	GTG	GCA	ACT	CAT	ACA	GAA	CAG	ATT	CAG	ACC	AGC	AAA	1026
T	E	I	T	D	L	R	R	T	I	Q	G	L	E	I	E	L	Q	360
ACG	GAG	ATC	ACA	GAC	CTG	AGA	CGC	ACA	ATC	CAA	GGG	CTG	GAA	ATA	GAA	CTG	CAG	1080
S	Q	Y	S	M	K	A	A	L	E	N	T	L	A	E	T	E	A	378
TCA	CAG	TAC	AGC	ATG	AAA	GCA	GCC	CTT	GAA	AAC	ACA	CTG	GCA	GAA	ACA	GAA	GCC	1134
R	Y	G	A	Q	L	G	Q	I	Q	S	M	I	S	N	L	E	A	396
CGT	TAT	GGA	GCC	CAG	CTA	GGG	CAA	ATA	CAG	AGT	ATG	ATC	AGT	AAC	CTA	GAA	GCA	1188
Q	L	V	D	L	R	S	D	M	E	R	Q	N	H	E	Y	K	M	414
CAG	CTT	GTA	GAC	CTC	CGA	AGT	GAC	ATG	GAG	CGG	CAG	AAC	CAC	GAA	TAC	AAG	ATG	1242
L	M	D	I	K	T	R	L	E	K	E	I	S	T	Y	R	Q	L	432
CTC	ATG	GAC	ATC	AAG	ACC	CGT	CTG	GAG	AAA	GAG	ATC	AGC	ACC	TAT	CGT	CAG	CTA	1296
L	E	V	H	D	T	Q	I	G	G	G	T	H	K	D	A	K	I	450
CTA	GAA	GTG	CAT	GAT	ACA	CAA	ATT	GGT	GGA	GGA	ACA	CAT	AAA	GAT	GCT	AAA	ATC	1350
L	G	K	*															453
TTA	GGG	AAG	TGA	GGC	CAC	GTG	GGG	ACC	TGA	GAC	AGC	CTG	CAA	TCA	AGT	CCA	CCT	1404
TCA	CTA	ATT	GCC	TTG	AAA	ACG	CTT	ATG	TGG	AGT	CCA	TCA	CAC	AGA	GAT	CCA	TTA	1458
CTT	TTC	CCA	CTG	CCA	C													1474

Abb. 5.28: Nukleotidsequenz von **xCK19/3** mit der davon abgeleiteten Aminosäuresequenz. Das Startkodon (ATG) sowie das Stopkodon (TGA) sind fettgedruckt.

Die errechneten Werte für die molekulare Massen und pI-Werte der *Xenopus* Cytokeratin 19 Isoformen sind in Tabelle 5.1 zusammengestellt.

Protein	Länge (Aminosäuren)	Molekulare Masse	pI
XCK19/1	434	47547	5,28
XCK19/3	448	48871	5,42
XCK19/2 (A6)	407	44783	5,29
XCK19/2 (Oo)	412	45204	5,29

Tabelle 5.1: Theoretische Molekulargewichte und pI-Werte der Cytokeratin 19 Isoformen in *Xenopus*.

Die xCK19-Isoformen wurden bei verbesserter zweidimensionaler Auftrennung von A6-Zellkernproteinen im Western Blot auch als unterschiedliche Antigene der p52 Antikörper erkannt und durch Massenspektrometrie identifiziert (siehe 5.2.5).

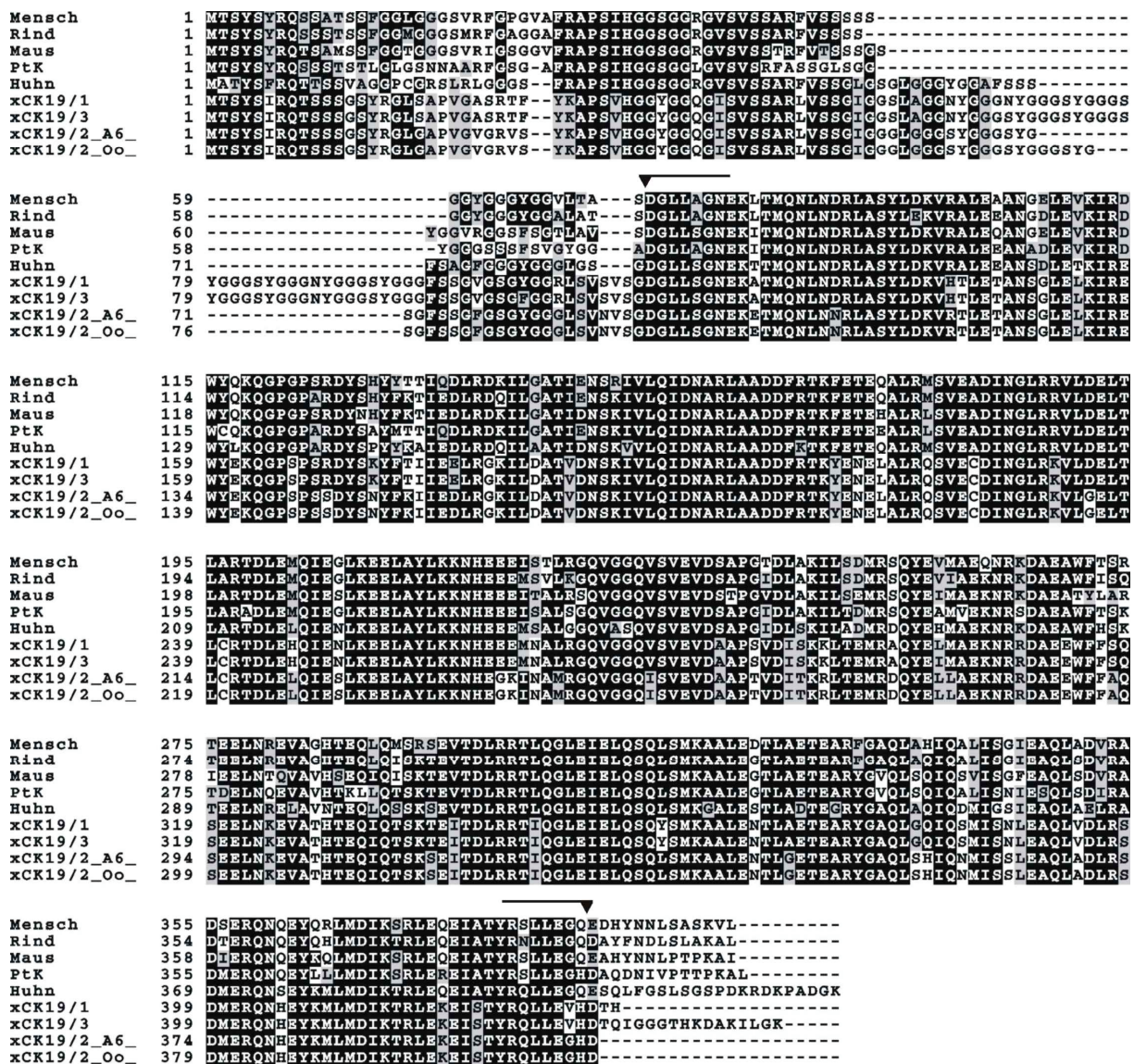


Abb. 5.29: Vergleich von xCK19/1-3 mit Cytokeratin 19 verschiedener Spezies. Identische Aminosäuren sind schwarz hinterlegt, ähnliche grau. Anfang und Ende der α -helikalen Domäne sind durch Pfeile gekennzeichnet. In dieser 315 Aminosäuren umfassenden Domäne weisen die verschiedenen CK19-Sequenzen ca. 90% Ähnlichkeit auf.

Beim Vergleich mit den bekannten Cytokeratin 19-Sequenzen von verschiedenen Spezies (Abb. 5.29) zeigt sich die bei Intermediärfilamenten typische starke Konservierung der zentralen alpha-helikalen Domäne. Die Kopf- und Schwanzregionen im N- bzw. C-terminalen Bereich sind normalerweise nicht helikal und im Gegensatz zur zentralen Domäne höchst variabel (siehe Schema in Abb. 5.24). Bei den xCK19 Proteinen fallen im N-terminalen Kopfbereich Wiederholungen der Sequenz GG(N/S)YG auf. Solche Glycin-reiche Regionen unbekannter Funktion sind in manchen anderen Cytokeratinen ebenfalls vorhanden.

Von besonderem Interesse ist die Tatsache, daß Cytokeratin 19 allgemein keine typische C-terminale Schwanzregion besitzt, sondern eine nur wenige Aminosäuren lange Verlängerung der alpha-helikalen Domäne. Bei den Proteinen xCK19/1 und xCK19/2 existiert auch diese Verlängerung praktisch nicht mehr. Diese Eigenschaft von Cytokeratin 19 scheint verantwortlich dafür zu sein, daß das Protein seine für gewöhnlich cytoplasmatische Lokalisation unter bestimmten Bedingungen verändert und in den Zellkern gelangt, obwohl es kein bekanntes nukleäres Lokalisationssignal (NLS) enthält (Bader et al., 1991). Dieses Verhalten wurde auch bei anderen Intermediärfilamenten beobachtet, bei denen die C-terminale Domäne entfernt wurde und ist in Anbetracht der möglichen nukleolären Lokalisation des hier untersuchten Antigens p52 von Bedeutung (siehe 6.4).

5.2.3 Expression der Cytokeratin 19 Isoformen

Zur weiteren Charakterisierung wurden die xCK19 Klone *in vitro* und *in vivo* exprimiert. Wenn nicht gesondert angegeben, ergaben die folgenden Versuche für alle Isoformen die gleichen Ergebnisse.

5.2.3.1 *In vitro* Expression im Retikulozytenlysat von Kaninchen

Im gekoppelten Transkriptions und Translations Ansatz wurde xCK19 im Retikulozytenlysat von Kaninchen unter Einbau von [^{35}S]-Methionin exprimiert. Wie das Autoradiogramm in Abb. 5.30a zeigt, kodierte die cDNA für ein 52 kD großes Polypeptid. Dieses wurde im Western Blot vom mAb56 erkannt (Abb. 5.30b).

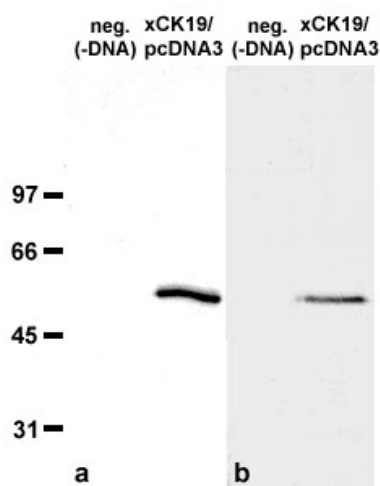


Abb. 5.30: *In vitro* Expression von xCK19.

(a) Autoradiogramm nach Transkription und Translation *in vitro*. Die cDNA xCK19/1 wurde transkribiert und das mRNA Produkt im gleichen Ansatz in ein 52kD Polypeptid translatiert.

(b) Western Blot. Das *in vitro* exprimierte Polypeptid wird von mAb56 erkannt.

Dieses Ergebnis zeigt, daß die cDNA für ein 52 kD Polypeptid kodiert, das vom mAb56 erkannt wird. Daher konnte davon ausgegangen werden, daß p52 dem *Xenopus* Cytokeratin 19 entspricht.

5.2.3.2 *In vivo Expression in Kulturzellen*

Um die Lokalisation von xCK19/p52 in lebenden Zellen beobachten zu können, wurden die cDNAs in GFP-Vektoren kloniert. Verschiedene Kulturzellen wurden mit diesen Konstrukten transfiziert. Zum Vergleich wurden *Xenopus* A6-Zellen auch fixiert und Immunfluoreszenzen mit mAb56 und einem Texas red gekoppelten Zweitantikörper durchgeführt.

Abb. 5.31-5.33 zeigen, daß xCK19-GFP weder in den Kern noch den Nukleolus gelangten, sondern vielmehr in das Intermediär-Filamentsystem der A6 Zellen eingebaut wurde. Die Immunfluoreszenzen mit mAb56 ergaben dagegen die bekannte nukleoläre Anfärbung in transfizierten und nicht transfizierten Zellen. Es war keine Kolokalisation zu erkennen, d.h. weder erkannte mAb56 das exprimierte xCK19-GFP noch befand sich das Fusionsprotein im Nukleolus (Abb. 5.32). Die Verteilung des xCK19-GFP im Filament-Netzwerk der Zelle entsprach dem Immunfluoreszenzmuster eines Cytokeratin Antikörpers (Abb. 5.33). Dieser Antikörper ist spezifisch für mehrere endogene Cytokeratine (siehe 2.1.4).

Als Ergebnis bleibt festzuhalten, daß sich alle Cytokeratin 19 GFP-Fusionsproteine wie „normale“ Cytokeratine verhielten und cytoplasmatische Filamente bildeten. Die Lokalisierung entsprach also nicht der von p52, welches ausschließlich im Nukleolus nachweisbar war.

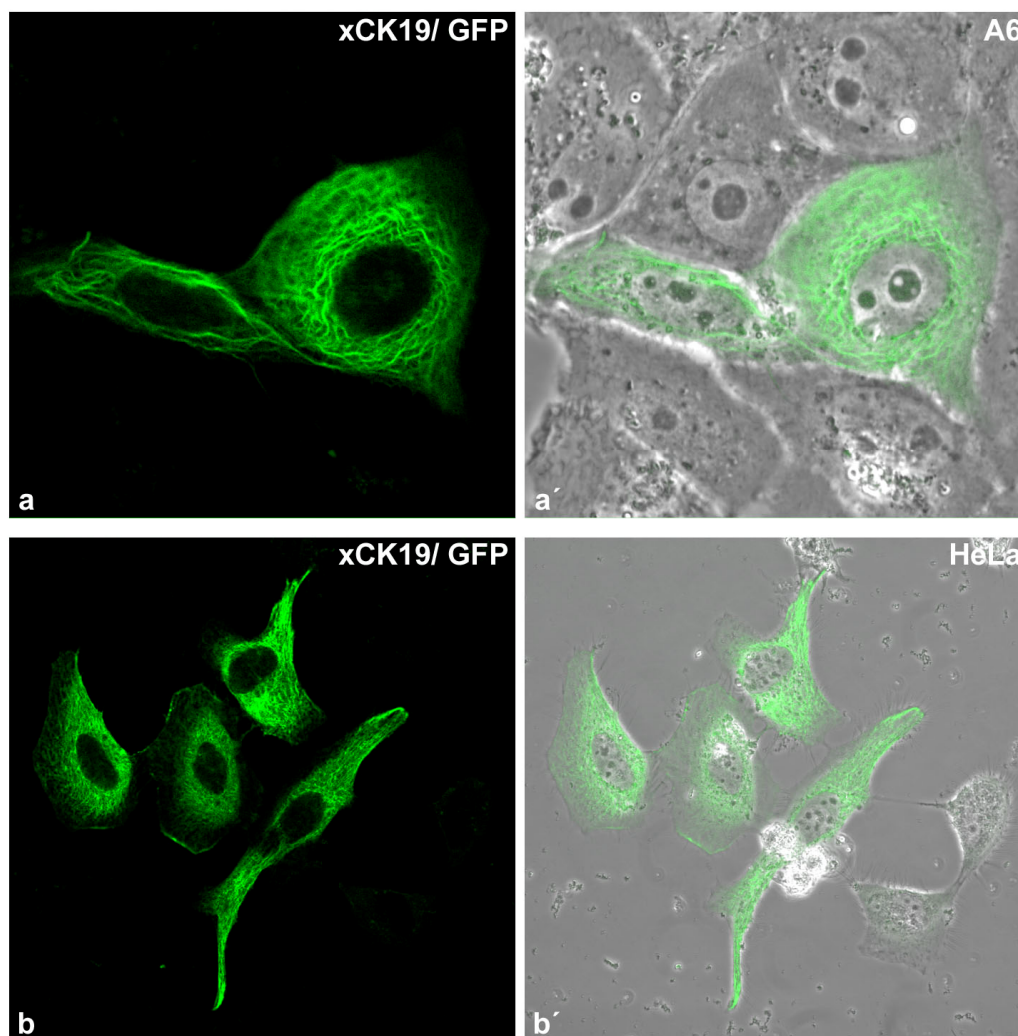


Abb. 5.31: Expression von GFP-xCK19 in lebenden Zellen. (a-a') *Xenopus* A6-Zellen. (b, b') HeLa-Zellen. Das Fusionsprotein wird in das cytoplasmatische Filament-Netzwerk verschiedener Kulturzelllinien integriert und ist vom Zellkern ausgeschlossen.

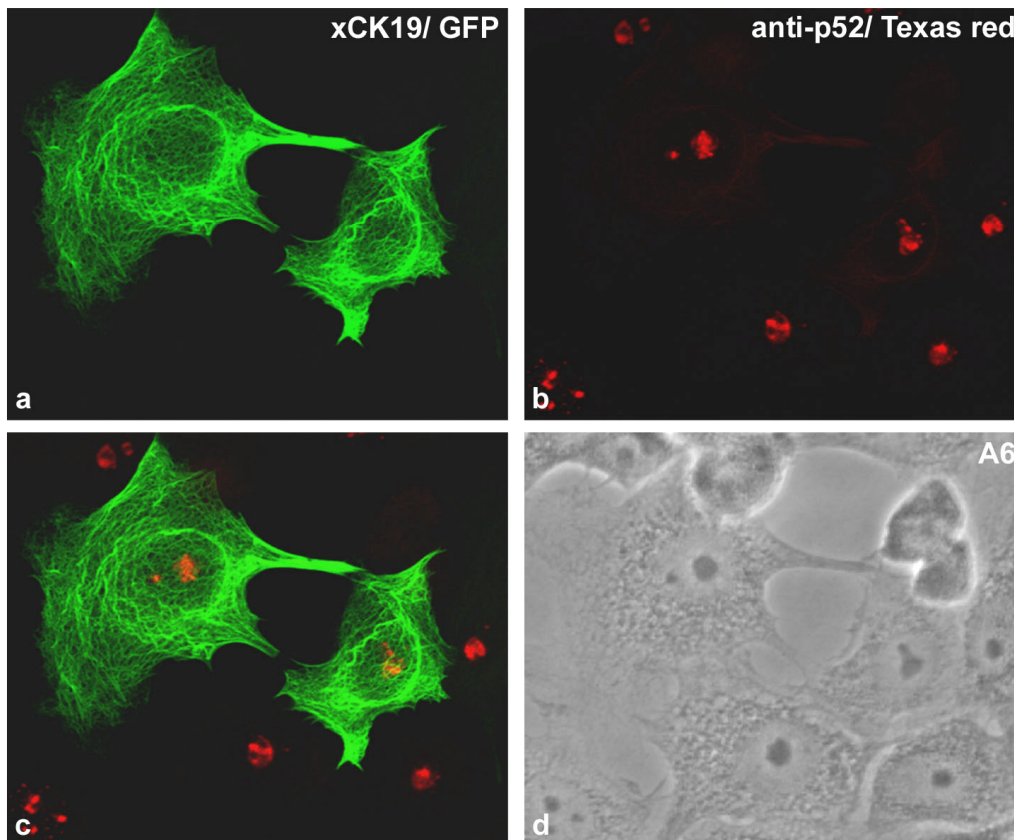


Abb. 5.32: Expression von GFP-xCK19 und Immunfluoreszenz mit mAb56. Die A6-Zellen wurden 24h nach der Transfektion fixiert. (a) GFP-xCK19 ist im cytoplasmatischen Filament-Netzwerk lokalisiert. (b) mAb56 färbt in der Immunfluoreszenz ausschließlich die Nukleoli an (rot). (c) In der Überlagerung der GFP und Texas red Aufnahmen ist keine Kolokalisation zu erkennen. (Durch die Fixierung sind die Zellen abgeflacht und es sind Filamente in der Ebene des Zellkerns sichtbar. Tatsächlich sind die Filamente vom Kern ausgeschlossen. (siehe die lebenden Zellen in Abb. 5.31 und Abb. 5.33). (d) Phasenkontrastaufnahme.

Bei einigen Zellen wurden GFP-xCK19-Aggregate beobachtet. Diese fanden sich zusätzlich zum Cytokeratin-Netzwerk (Abb. 5.34a), oder das Fusionsprotein wurde gar nicht in Filamente eingebaut (Abb. 5.34b). Die Aggregatbildung resultierte vermutlich aus der starken Überexpression des GFP-xCK19 (vergleiche die unterschiedlichen Expressionniveaus in Abb. 5.34a). Unterschiedliche Verteilungen wie in Abb. 5.34b könnten aber auch vom Zustand der Zelle und vom exprimierten Protein abhängen (siehe 6.4). Das in Abb. 5.34b gezeigte Fluoreszenzmuster wurde beispielsweise häufiger bei xCK19/2 als bei anderen Isoformen beobachtet.

Keine der mit GFP fusionierten xCK19-Isoformen wurden im Zellkern, geschweige denn im Nukleolus nachgewiesen. Um auszuschließen, daß das an einem spezifischen Ende angehängte GFP die Verteilung des Fusionsproteins beeinflusste, wurde GFP sowohl N- als auch C-terminal von xCK19 kloniert und exprimiert. Alle Versionen zeigten die gleiche Verteilung wie die oben beschriebenen.

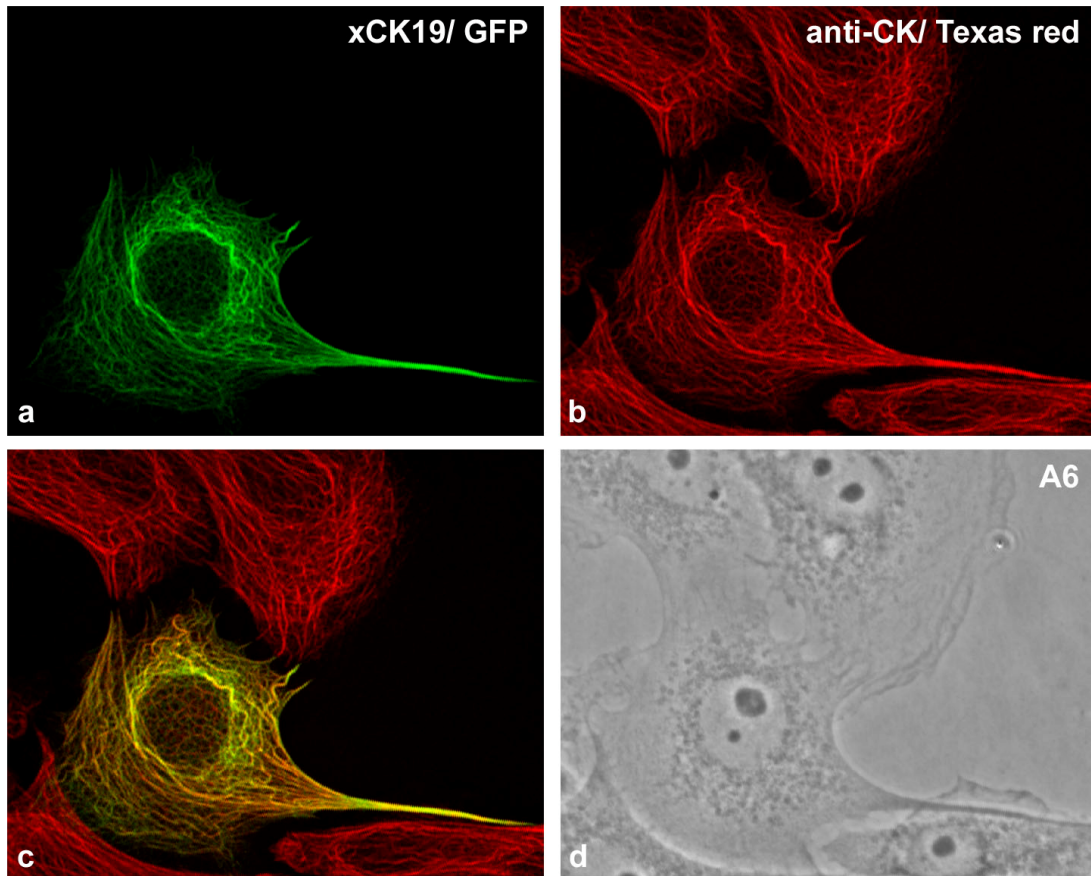


Abb. 5.33: Expression von GFP-xCK19 und Immunfluoreszenz mit einem Cytokeratin-Antikörper. (a) GFP-xCK19 wird in das endogene Cytokeratin-Netzwerk integriert, das (b) in der Immunfluoreszenz von einem Cytokeratin-Antikörper angefärbt ist. (c) Überlagerung der GFP und Texas red Aufnahmen. (d) Phasenkontrast.

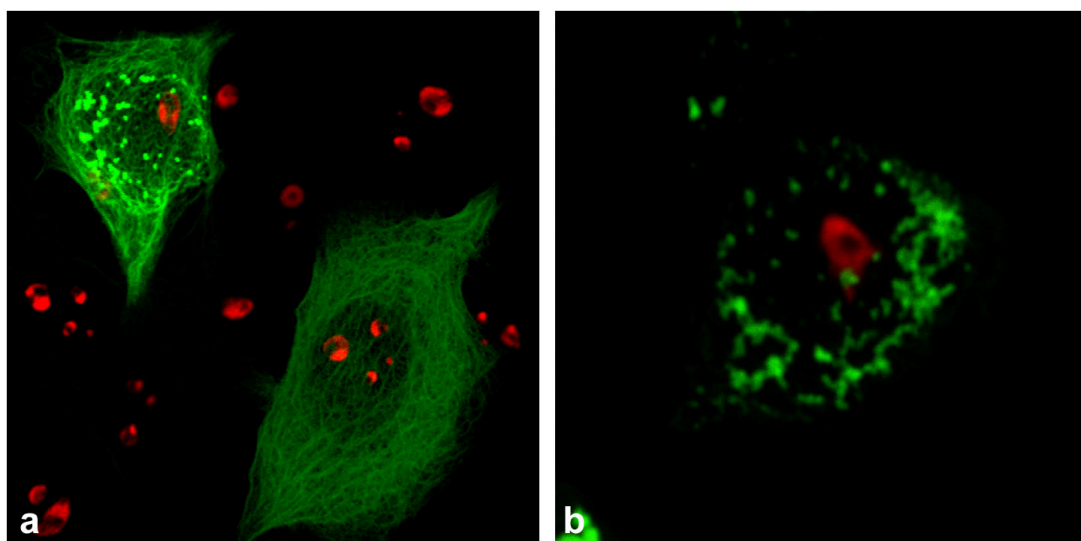


Abb. 5.34: Aggregatbildung von GFP-xCK19. Das GFP-Fusionsprotein findet sich entweder ausschließlich in Filamenten (a, rechte Zelle), in Filamenten und Aggregaten (a, linke Zelle) oder nur in cytoplasmatischen Aggregaten (b). Die Präparate wurden mit mAb56 und Texas red gegengefärbt.

Die bisher exprimierten Fusionsproteine zeigten eine cytoplasmatische Lokalisation. Es ist durchaus vorstellbar, daß der beobachtete Ausschluß vom Zellkern auf einem defekten Kernimport des chimären GFP-CK19 Proteins beruht. Um zu untersuchen, wie sich xCK19 nach der Translokation in den Zellkern verhält, wurde es als NLS-GFP-Fusionsprotein exprimiert. Die Sequenzen von Cytokeratinen enthalten keine bekannten Kern-Lokalisationssignale (siehe auch 5.2.2 und 6.4), in Übereinstimmung mit ihrer Lokalisation im Cytoplasma.

NLS-GFP-xCK19 bildete auffällige, im Vergleich zum cytoplasmatischen Cytokeratin-Netzwerk relativ dicke und wenig verzweigte Filamente im Zellkern. Die NLS-Proteine wurden zusätzlich auch weiterhin in das cytoplasmatische Filamentsystem integriert (Abb. 5.35, siehe auch 5.2.3.3). Die Fusionsproteine wurden also, als obligat heterodimerisierende Cytokeratine, mit den endogenen Partnern einerseits in cytoplasmatische IF-Netzwerke eingebaut und so trotz NLS im Cytoplasma zurückgehalten. Andererseits war das NLS ausreichend, um die GFP-Proteine vermutlich als Dimer oder Tetramer (siehe 6.4) in den Zellkern zu transportieren und dort Filamente zu bilden. Allerdings war eine nukleoläre Lokalisation eines *Xenopus* Cytokeratin 19 auch in diesen Versuchen nicht nachzuweisen.

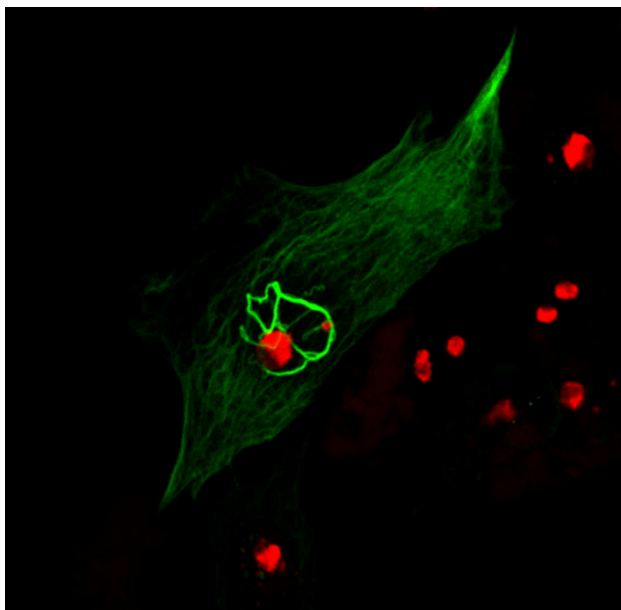


Abb. 5.35: Expression von NLS-GFP-xCK19 in A6-Zellen. Das in den Zellkern transportierte xCK19 bildet relativ dicke einfache Filamente, die oft im direkten Kontakt mit den Nukleoli stehen, aber nicht mit dem mAb56-Antigen (Immunfluoreszenz mit Texas red) kolokalisieren.

Um zu prüfen, ob das 27 kD große GFP generell die Lokalisation des untersuchten Proteins verändert, wurde dieses auch ohne Fusionspartner exprimiert. Da mAb56 das nukleoläre Antigen nur in *Xenopus*-Zellen erkennt, sollte das in Säugerzellen exprimierte xCK19 nachweisbar sein. Das Ergebnis war allerdings negativ. In filamentöser Form wird überexprimiertes wie endogenes xCK19, im Gegensatz zu dem denaturierten Protein im Immunblot (siehe 5.2.3.1), von den p52 Antikörpern nicht erkannt. Daher kann davon ausgegangen werden, daß xCK19 auch ohne Fusionspartner ausschließlich in das Filament-Netzwerk der Zelle eingebaut wird.

5.2.3.3 Koexpression von xCK19-GFP und nukleolären Fusionsproteinen

Die bisherigen Ergebnisse zeigten für die GFP-xCK19-Fusionsproteine ein von Cytokeratinen erwartetes Verhalten. Ein Typ I Cytokeratin, wie CK19, bildet mit einem Typ II Keratin, z. B. CK8, Heterodimere, die sich weiter zu Intermediärfilamenten organisieren. Bei der xCK19-Expression in den hier untersuchten Zellen ist der endogene Partner in entsprechender Form und Menge vorhanden, um Dimere zu bilden und damit die Integration der Fusionsproteine in Filamente zu ermöglichen. Um mögliche Assoziationen mit anderen Proteinen zu untersuchen, wurde GFP-xCK19 mit verschiedenen RFP-Fusionsproteinen (siehe 5.1.2) koexprimiert. Dabei konnte zusätzlich zum Einbau in das Cytokeratin-Netzwerk eine Assoziation der Fusionsproteine miteinander und zum ersten Mal eine Lokalisation von xCK19 im Nukleolus beobachtet werden.

In Abb. 5.36 ist die Koexpression von GFP-xCK19 und RFP-hB23 gezeigt. CK19 wurde in das IF-System eingebaut (a-c) und kolokalisierte außerdem in einigen Fällen mit B23 (a'-c') im Nukleolus (a''-c''). Die Fusionsproteine waren auch in PNBs assoziiert (c-c''). Bei einigen Kotransfektionen war jedoch keine Kolokalisation zu beobachten. In der gezeigten Koexpression von RFP-B23 und GFP-NLS-xCK19 waren die Nukleoli von der nukleoplasmatischen GFP-Fluoreszenz ausgespart (d-d'').

Auch bei der Kotransfektion mit RFP-Fibrillarin waren GFP-xCK19- und GFP-NLS-xCK19 Fusionsproteine im IF-Netzwerk und im Nukleolus lokalisiert (Abb. 5.37, a-c). Bei xCK19/2, das Filamente ineffizienter bildete als die anderen Isoformen (siehe auch 5.2.3.2), war das GFP-Protein auch bei Zellen in denen es nicht in das Cytoskelett eingebaut wurde, gemeinsam mit Fibrillarin im Nukleolus lokalisiert (obere und untere Zelle in b-b''). Wie bei der Koexpression mit B23 gab es Zellen, in denen die Fusionsproteine nicht kolokalisierten (d-d'').

Weiterhin wurden die pol I-Untereinheit RPA53 (siehe 5.1.1.1) und das ribosomale Protein L10 (siehe 5.1.2.2) zusammen mit xCK19 exprimiert. Auch diese überexprimierten Proteinpaare waren zumindest teilweise im Nukleolus lokalisiert (Abb. 5.38), wobei RFP-mRPA53 mit GFP-xCK19 eine abnormale Verteilung in Form von zahlreichen nukleoplasmatischen Pünktchen aufwies. GFP-CK19 war hier nicht im Cytoplasma nachweisbar (a-a''). RFP-xL10 zeigte eine nukleoläre Akkumulation in Zellen, bei denen der Kernexport des Fusionsproteins offenbar blockiert ist (siehe 5.1.2.2). GFP-xCK19 war nach der Koexpression in solchen Zellen sowohl mit L10 im Nukleolus lokalisiert, als auch ungestört im Cytokeratin-Netzwerk integriert (b-b'').

Die Kotransfektion mit nukleolären Proteinen zeigt *in vivo* die Möglichkeit der Translokation eines Cytokeratins in den Zellkern. Das hier untersuchte Cytokeratin 19 wird offensichtlich durch die direkte oder indirekte Assoziation mit nukleolären Proteinen in den Zellkern importiert und ist zusammen mit diesen Proteinen auch im Nukleolus lokalisiert. Allerdings wurde auch mit einem koexprimierten nicht-nukleolären Protein (RFP-HMGA1) eine Kolokalisation im Zellkern beobachtet (nicht gezeigt). Diese Assoziationen kommen nur bei der gleichzeitigen Überexpression beider Fusionsproteine zustande, d.h. die endogenen Proteine sind offenbar nicht in ausreichender Menge vorhanden, um exprimierte GFP-Cytokeratin Fusionsproteine in den Zellkern zu transportieren. Weiterhin bleibt GFP-CK19 mit dem jeweiligen koexprimierten Fusionsprotein im Zellkern assoziiert. Daher bleibt die Frage offen, ob die bei Doppeltransfektionen beobachtete Umverteilung eines Teils des GFP-CK19 in den Zellkern auch in der normalen Zelle eine Rolle spielt. Insbesondere bleibt außerdem die Identität des nukleolären p52 unklar.

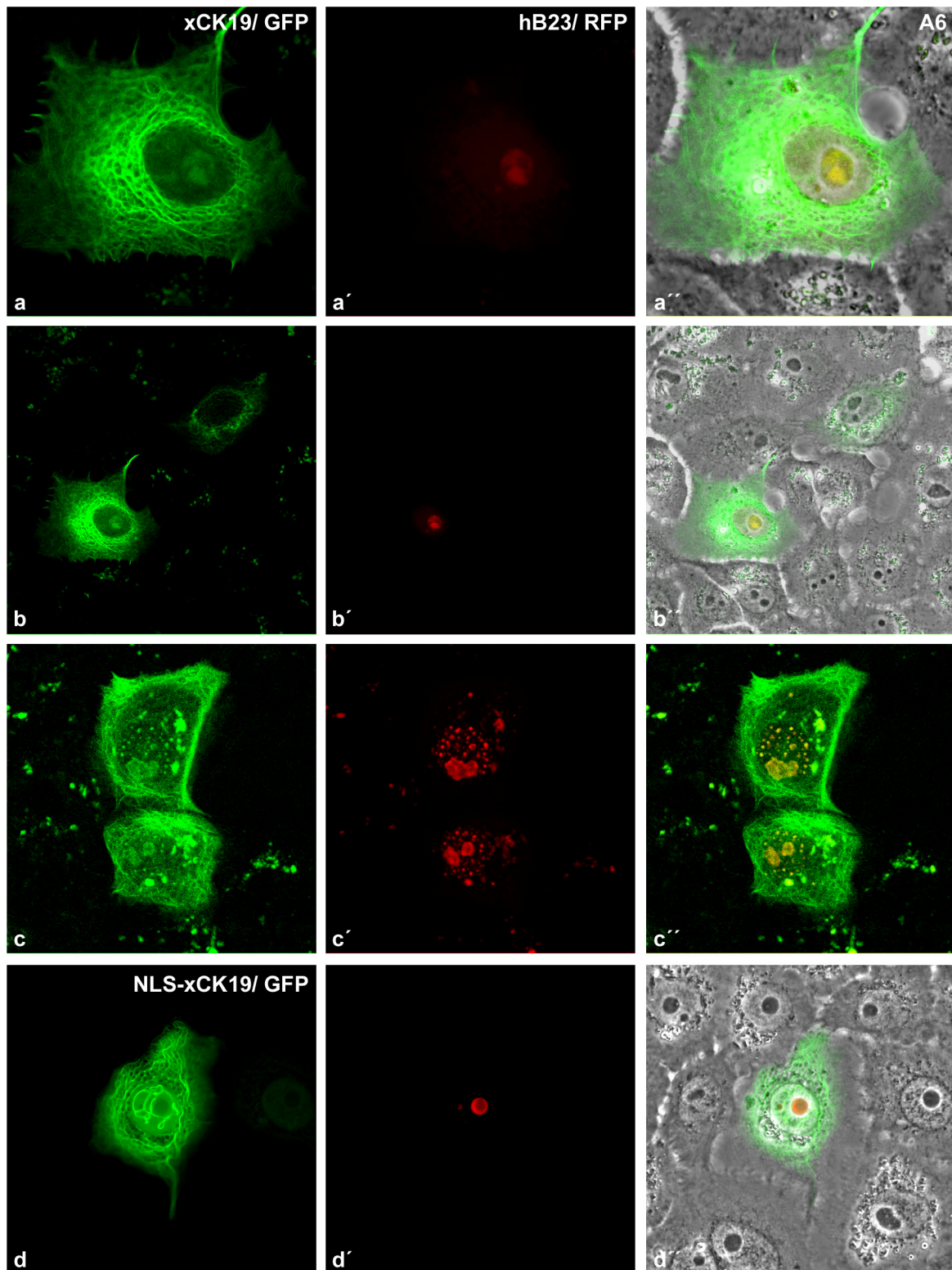


Abb. 5.36: Doppeltransfektionen von A6-Zellen mit CK19 und B23. (Reihen a-c) Ein Teil des GFP-xCK19 Fusionsproteins befindet sich zusammen mit RFP-hB23 in Nukleoli und PNBs (c-c''). (d-d'') Bei dieser mit GFP-NLS-xCK19 und RFP-hB23 kotransfizierten Zelle ist der Nukleolus allerdings frei von dem CK19-Fusionsprotein.

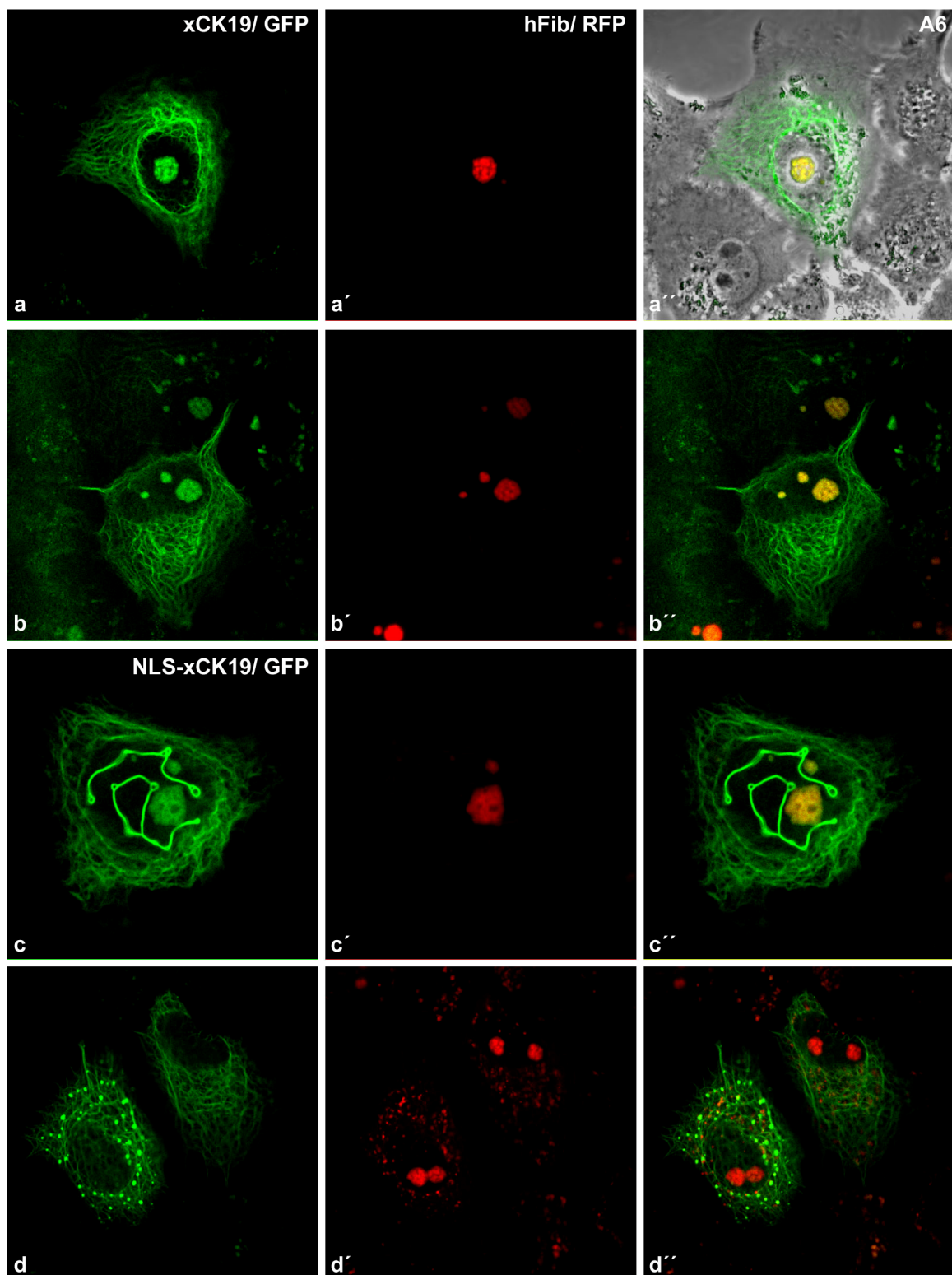


Abb. 5.37: Kotransfektion von A6-Zellen mit RFP-Fibrillarin und GFP-xCK19. (a-a'') GFP-xCK19/1 ist im IF-Netzwerk integriert und kolokalisiert im Nukleolus mit RFP-Fibrillarin. (b-b'') GFP-xCK19/2 ist sowohl zusätzlich zur Organisation in Filamenten als auch ohne cytoplasmatische Lokalisation mit RFP-Fibrillarin in Nukleoli assoziiert. (c-c'') GFP-NLS-xCK19/1 ist Bestandteil von cytoplasmatischen Filamenten, nukleoplasmatischen Filamenten und mit RFP-Fibrillarin im Nukleolus lokalisiert. (d-d'') GFP-xCK19 ist in einigen kotransfizierten Zellen nicht mit RFP-Fibrillarin assoziiert, sondern nur im Cytokeratin-Netzwerk nachweisbar. In der linken Zelle sind vermutlich durch Überexpression entstehende Aggregate beider Fusionsproteine zu sehen (vergleiche 5.34).

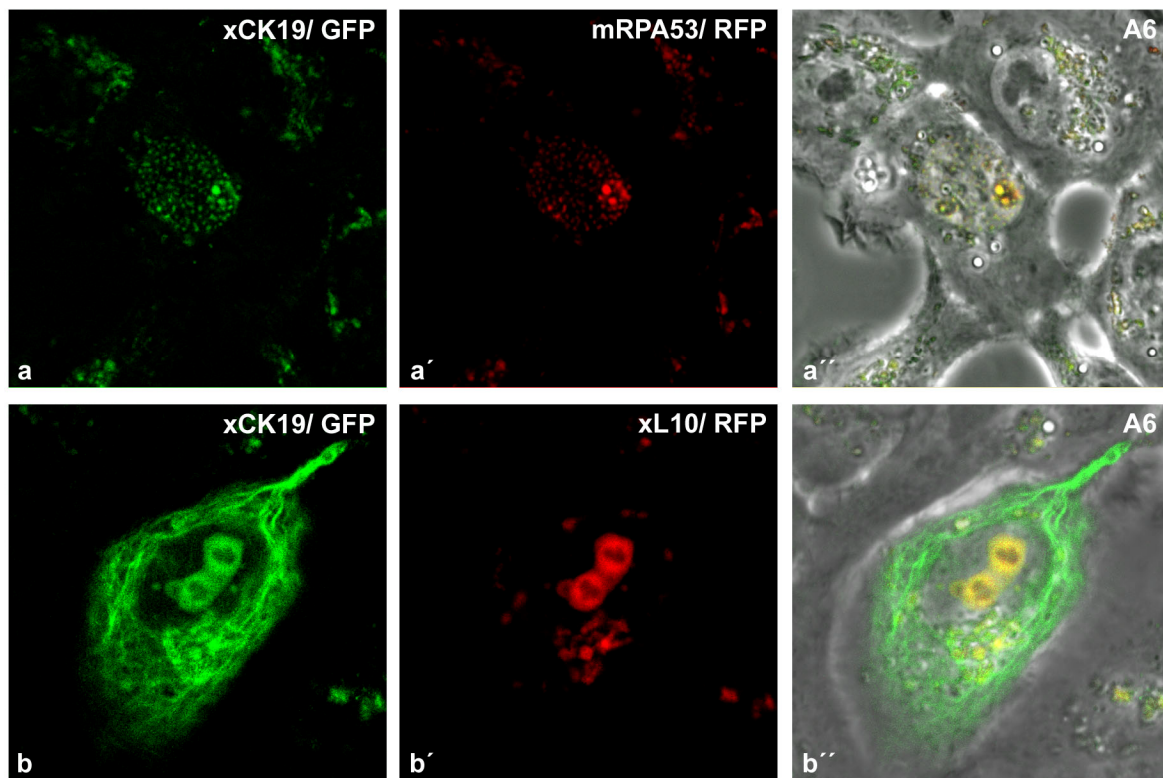


Abb. 5.38: Kotransfektion von A6-Zellen mit GFP-xCK19 und RFP-RPA53 und RFP-L10. (a-a'') GFP-xCK19 kolokalisiert mit RFP-mRPA53 in FCs und zahlreichen nukleoplasmatischen Pünktchen. Es ist keine cytoplasmatische Fluoreszenz nachweisbar. (b-b'') GFP-xCK19 ist im cytoplasmatischen IF-Netzwerk sowie mit RFP-xL10 in den Nukleoli lokalisiert.

5.2.4 Injektion in Kulturzellen und Oocyten

Da die Verteilung des in Kulturzellen exprimierten xCK19 nicht mit der Verteilung des nukleolären Proteins p52 übereinstimmte, wurde das Verhalten des isolierten Proteins nach Injektion in Kulturzellen und *Xenopus* Oocyten untersucht.

Die xCK19 Proteine wurden dazu entweder als rekombinante Proteine isoliert oder aus zweidimensionalen Proteingelen von A6-Zellkernen eluiert, um auch das Verhalten von endogenem, d.h. möglicherweise modifiziertem p52 zu überprüfen.

5.2.4.1 Isolierung des *in vitro* exprimierten xCK19 aus Bakterien

Um das Protein xCK19 in gereinigter Form zu erhalten, wurde es als Histidin (His-tag)- und als GST (Glutathion-S-Transferase)-Fusionsprotein in *E.coli* exprimiert. Das exprimierte Protein wurde dann über geeignete Affinitätsäulen gereinigt.

Das Protein His-xCK19/1 wurde nach IPTG-Induktion von den Bakterien in ausreichender Menge exprimiert, ließ sich aber kaum unter nativen Bedingungen als lösliches Protein extrahieren. Es wurde daher unter denaturierenden Bedingungen (8M Harnstoff) extrahiert und durch Dialyse gegen 0,25 M KCl enthaltenden Phosphatpuffer in löslicher Form renaturiert (Abb. 5.39).

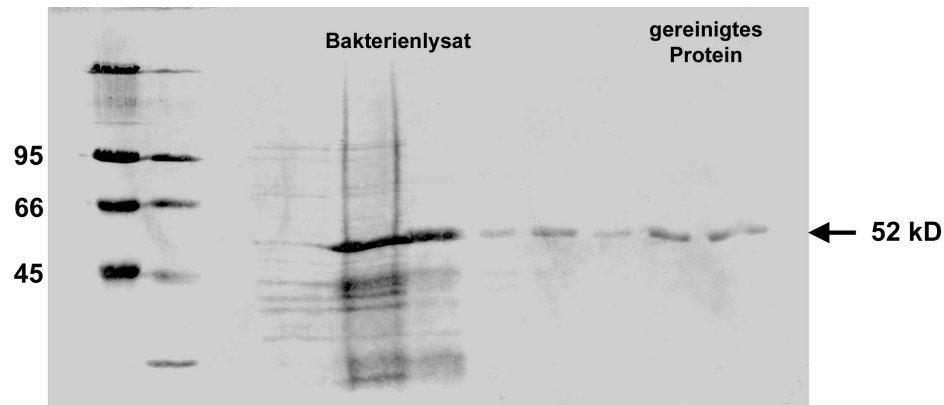


Abb. 5.39: Expression von His-xCK19/1 in *E. coli*. Auf das Coomassie gefärbte Gel sind Proben von einzelnen Schritten des Versuchsablaufs aufgetragen. Schon in der unbehandelten Probe der IPTG-induzierten Bakterien ist deutlich die Überexpression des 52 kD Proteins zu sehen. Rechts ist das unter denaturierenden Bedingungen isolierte, sowie das renaturierte gereinigte Protein aufgetragen.

GST-xCK19 wurde in Bakterien als ein Protein mit einem relativen Molekulargewicht von ca. 88 kD exprimiert (Abb. 5.40). Das Protein konnte unter nicht denaturierenden Bedingungen extrahiert und eluiert werden (15 mM Glutathion). Das isolierte Fusionsprotein wurde von p52-Antikörpern erkannt (Abb. 5.40).

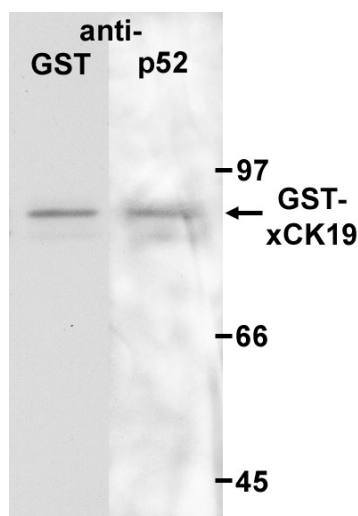


Abb. 5.40: Immunblots von GST-xCK19. Das in *E. coli* exprimierte GST-xCK19/1 wurde unter nicht denaturierenden Bedingungen isoliert und wird von GST- (links) sowie von p52- (rechts, PS2) Antikörpern erkannt.

Die dialysierten Proteine wurden in das Cytoplasma von Oocyten und Kulturzellen injiziert. Die Zellen wurden 30 Minuten bis 3 Stunden inkubiert, um den Import in den Zellkern zu ermöglichen. Mit den Kulturzellen wurden anschließend Immunfluoreszenzen mit His- bzw. GST-Antikörper durchgeführt, um das injizierte Protein nachzuweisen. In Zellen von Spezies außer *Xenopus* wurden außerdem Immunfluoreszenzen mit mAb56 durchgeführt, der p52 spezifisch in *Xenopus*-Zellen erkennt (siehe auch 5.2.3.2). Von den Oocyten wurden die manuell isolierten Zellkerne und das entsprechend getrennte Cytoplasma im Western Blot mit den jeweiligen Antikörpern auf die injizierten Proteine hin überprüft.

Die Proteine konnten leider weder im Zellkern noch im Cytoplasma nachgewiesen werden, auch nicht nach direkter Injektion in den Zellkern. Dies lässt vermuten, daß entweder die Konzentration des injizierten Proteins für den Nachweis zu gering war (höher konzentrierte Proteinlösungen waren für die Mikroinjektion zu zähflüssig), oder daß die bakteriell exprimierte Proteine in der Zelle nicht funktionsfähig waren und rasch abgebaut wurden.

5.2.4.2 Isolierung von xCK19 aus Proteingelen

Dem bakteriell exprimierten xCK19 fehlten möglicherweise bestimmte posttranslationelle Modifikationen. Immunpräzipitationen mit mAb56 zur Isolation von p52 im natürlichen Zustand waren leider nicht erfolgreich. Um p52 in möglicherweise modifizierter Form zu isolieren und injizieren zu können, wurde das Protein daher direkt nach der Auftrennung aus zweidimensionalen Gelen eluiert.

Die im Immunblot durch p52-Antikörper erkannten Polypeptide aus A6-Zellkernen (siehe 5.2.5) wurden aus mit Natriumacetat gefärbten 2D-Gelen ausgeschnitten und eluiert. Die eluierten Proteine wurden mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, um sie in Oocyten und A6-Zellen sichtbar zu machen, bzw. wurde nach Injektion in Ptk-Zellen mit mAb56 eine Immungoldlokalisation durchgeführt. Auch diese Versuche ergaben aber leider kein Ergebnis, da die injizierten Proteine nicht nachgewiesen werden konnten (siehe oben).

5.2.5 Identifikation der xCK19 Isoformen im Immunblot

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden, bei der Verwendung von frisch isolierten Zellkernen aus A6-Kulturzellen und verbesserter Auftrennung der Proteine durch 2D-PAGE, im Western Blot mit mAb56 und den Peptid-Antikörpern (PS1, PS2) mehrere positive Polypeptide nachgewiesen (Abb. 5.41). Die der Identifizierung von xCK19 zugrundeliegende Peptidsequenzierung wurde mit einem einzelnen Polypeptid (p52) durchgeführt (Krüger, 1998). Da dessen Identität als nukleoläres Protein bislang nicht bestätigt werden konnte, sollten die zusätzlich nachgewiesenen Antigene identifiziert werden.

Um auszuschließen, daß es sich um unterschiedliche Phosphorylierungszustände eines Proteins handelte, wurde der Kernextrakt vor der Elektrophorese mit Phosphatase inkubiert. Bei den dephosphorylierten Proben wurden nicht nur die gleichen, sondern sogar zusätzliche Antigene im Immunblot festgestellt (Abb. 5.41c). Die Polypeptide wurden massenspektrometrisch (MALDI-TOF) analysiert (Tabelle 5.2). Dabei wurden die drei Isoformen von xCK19 nachgewiesen, die auch durch RT-PCR identifiziert worden waren (5.2.2). In Abb. 5.42 ist deren Verteilung im 2D-Gel im Vergleich mit den errechneten Werten der Proteine xCK19/1-3 aus Tabelle 5.1 (5.2.2) gezeigt. Überraschenderweise wurde ein bei den dephosphorylierten Proben von mAb56 erkannt Polypeptid von ca. 60 kDa (Abb. 5.41c) als Cytokeratin 8 identifiziert. Dieses Ergebnis war erstaunlich, da das nachgewiesene Epitop von mAb56 (siehe 5.2) nicht in der CK8-Sequenz enthalten ist. Dem monoklonalen Charakter des Antikörpers zufolge sollte nur ein spezifisches Epitop erkannt werden und es bleibt nachzuweisen ob dieses Epitop durch eine andere Aminosäuresequenz imitiert werden kann.

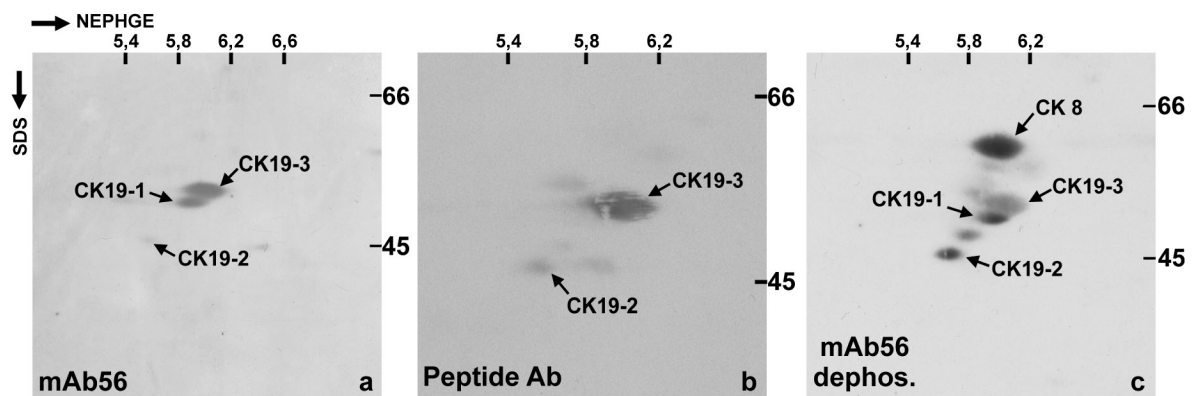


Abb. 5.41: 2D-Western Blots mit p52-Antikörpern. Immunblots von zweidimensional aufgetrennten Zellkernproteinen aus A6-Zellen. Die Antigene wurden durch MALDI-TOF identifiziert (siehe Tabelle 5.2). (a) mAb56 erkennt die xCK19 Isoformen 1-3. (b) Die Peptid-Antikörper erkennen xCK19/2 und /3. (c) Nach Dephosphorylierung der Probe wird überraschenderweise zusätzlich xCK8 vom mAb56 erkannt.

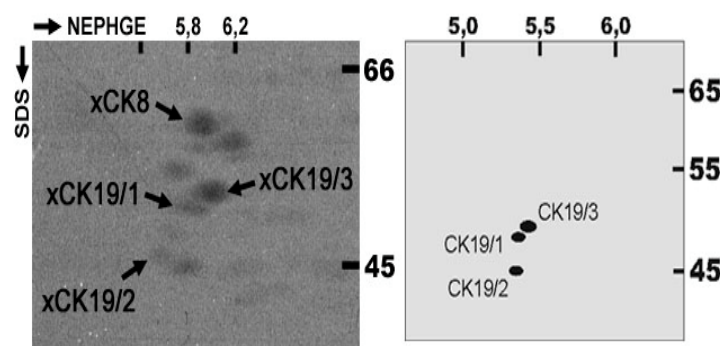


Abb. 5.42: Vergleich der experimentell bestimmten und errechneten Verteilung der xCK19-Isoformen im 2D-Gel. Die Verteilung der identifizierten Proteine im Coomassie-gefärbten 2D-Gel von A6-Zellkernen (links) stimmt mit der theoretischen Verteilung der Proteine xCK19/1-3 überein (rechts, Werte aus Tabelle 5.1, 5.2.2).

1	2	3	4	5	6	7	8		
Nr.	XCK19/1	XCK19/3	XCK19/2	Peptid	Modifikation	Theor. MW	Vorhanden in: XCK19/		
1	807	807		LAADDFR		807.40	1	2	3
2	818.44	818		QNHEYK		818.38	1	2	3
3			882.51	GLGAPVGVGR		882.52		2	
4			989.50	SEITDLRR		989.54		2	
5	1007.53	1007.54		MLMDIKTR		1007.54	1	2	3
6	1023.56	1023.55	1023.46	IREWYEK		1023.53	1	2	3
7	1041.63	1041.62	1041.54	IVLQIDNAR		1041.61	1	2	3
8	1183.64	1183.62		YFTIIEELR		1183.64	1		3
9	1236.63	1236.65	1236.61	TKYENELALR		1236.66	1	2	3
10	1242.53	1242.55		NHEEEMNALR		1242.55	1		3
11	1258.53	1258.51		nheemnalr	1Met-ox	1258.55	1		3
12	1370.65	1370.70		KNHEEEMNALR		1370.65	1		3
13			1374.65	AALENTLGETEAR		1374.69		2	
14	1388.62	1388.66		AALENTLAELEAR		1388.70	1		3
15	1463.63			EWYEQQGPSPSR		1463.69	1		3
16	1471.64	1471.66		EVATHTEIQITSK		1471.74	1	2	3
17	1511.72	1511.73		VHTLETANSGLELK		1511.81	1		3
18		1561.76		LSVSVSGDGLLSGNEK		1561.81	1		3
19		1715.81		qllevhdtqigggthk	pyroGlu	1715.87			3
20	1732.82	1732.83		IREWYEQQGPSPSR		1732.88	1		3
21	1786.84	1786.82	1786.86	APSVHGGYGGQGISVSSAR		1786.88	1	2	3
22	1829.84			IVLQIDNARLAADDFR		1829.99	1	2	3
23		1858.76		DAEEWFFSQSEELNK		1858.81	1		3
24	1869.80	1869.80		qnheykmlmdiktr	pyroGlu 1PO4	1869.84	1	2	3
25		1883.89		tiqgleielqsqysmk	1Met-ox	1883.94	1		3
26		2014.93		RDAEEWFFSQSEELNK		2014.92	1		3
27		2042.08		GQVGGQVSVEVDAAPSVDISK		2042.04	1		3
28		2186.13		TDLEHQIENLKEELAYLK		2186.13	1		3
29			2264.09	VSYKAPSVHGGYGGQGISVSSAR		2264.14		2	
30	2272.99	2273.03		qnheykmlmdiktrelk	1PO4 1Met-ox	2273.08	1	2	3
31	2283.15	2283.18		GKILDATVDNSKIVLQIDNAR		2283.27	1	2	3
32		2536.28		evathteiqtskteidlr	1PO4	2536.24	1		3
33		2563.31		ygaqlgqiismisnleaqvlrlr	1Met-ox	2563.32	1		3
34		2807.30		qtsssgsvrglsapvgasrtfkyk	5PO4	2807.03	1		3

Tabelle 5.2: Ergebnis der MALDI-TOF Analyse. Die im Immunblot erkannten Proteine (Abb. 5.41) wurden anhand ihrer Position und Verteilung im Coomassie gefärbten 2D-Gel identifiziert (Abb. 5.42) und ausgeschnitten. Die Proben wurden mit Trypsin verdaut und die Molekulargewichte der entstandenen Peptide wurden massenspektrometrisch ermittelt. Die erhaltenen Werte wurden mit den theoretischen Werten des Verdauens der Sequenzen xCK19/1-3 bzw. Datenbank-Sequenzen verglichen (Trypsin spaltet Polypeptide spezifisch nach den Aminosäuren Lysin (K) und Arginin (R)). In der Tabelle sind die Molekulargewichte der gemessenen und den Sequenzen xCK19/1-3 zugeordneten Peptide aufgeführt (Spalten 2-4). In Spalte 5 sind die Sequenzen der Peptide aufgeführt die, gegebenenfalls mit Modifikationen (Spalte 6), das in Spalte 7 errechnete Molekulargewicht besitzen. Die gemessenen Molekulargewichte der identifizierten Peptide stimmen innerhalb von 100 ppm (parts per million) mit den theoretischen Werten überein. In Spalte 8 ist angegeben, in welchen xCK19 Isoformen das jeweilige Peptid vorkommt. Aufgrund der Peptide 3, 4, 13 und 29 konnte xCK19/2 identifiziert werden, und Peptid 19 kommt nur in xCK19/3 vor. Einzelne Sequenzvorschläge wurden durch Peptidsequenzierung überprüft und bestätigten ausnahmslos die aufgeführten Sequenzen. PO4: Phosphorylierung von Serin (S), Threonin (T) oder Tryptophan (Y). Met-ox: Oxidation von Methionin (M). Pyro-Glu: N-terminales Glutamin (Q) modifiziert zu pyroGlutamat.

Durch die MALDI-TOF-Analyse sollten auch etwaige posttranslational modifizierte Formen von Cytokeratin 19 identifiziert werden, die möglicherweise eine veränderte zelluläre Lokalisation bedingen könnten. Insbesondere Phosphorylierungen spielen bei dem Löslichkeitsverhalten von Cytokeratinen eine Rolle. Es kommen dafür nur einzelne Phosphorylierungen spezifischer Aminosäuren in Betracht, da nach der kompletten Dephosphorylierung der Proteine keine unterschiedlichen Phosphorylierungszustände im Immunblot nachgewiesen werden konnten (siehe oben). Wenige möglicherweise phosphorylierte Peptide die den xCK19 Sequenzen zugeordnet wurden sind in Tabelle 5.2 aufgeführt. Deren Relevanz müsste im Einzelnen überprüft werden. Aus den massenspektrometrischen Ergebnissen ergaben sich auch keine Hinweise auf andere Modifikationen.

In A6-Zellkernen wurden also die in der vorliegenden Arbeit klonierten und exprimierten CK19 Isoformen, sowie ein weiteres Cytokeratin, als Antigene der p52-Antikörper identifiziert. Die Diskrepanz zwischen der in der Regel cytoplasmatischen Lokalisation der GFP-CK19/1-3 Proteine (5.2.3.2) und dem Nachweis der CK19 Isoformen in A6-Zellkernen wirft jedoch die Frage auf, ob die Cytokeratine lediglich als Bestandteile von cytoplasmatischen Verunreinigungen der hier untersuchten Zellkerne identifiziert wurden.

Die Möglichkeit, cytoplasmatische Verunreinigungen weitestgehend auszuschließen, besteht durch die manuelle Isolation des Kerninhalts von *Xenopus* Oocyten. Die amplifizierten Nukleoli in *Xenopus* Oocyten wurden in der Immunfluoreszenz von mAb56 und den Peptid-Antikörpern markiert (Krüger, 1998). Im Western Blot von handisolierten Oocytenkernen wurden von den Antikörpern, wie bei A6-Zellkernen, Proteine von 52 kD und 45 kD erkannt (Abb. 5.43). Die Kerne wurden weiter manuell in Kernhüllen und Kerninhalte aufgetrennt. Die Antigene waren im Kerninhalt deutlich nachweisbar, aber nur in Spuren in den isolierten Kernhüllen.

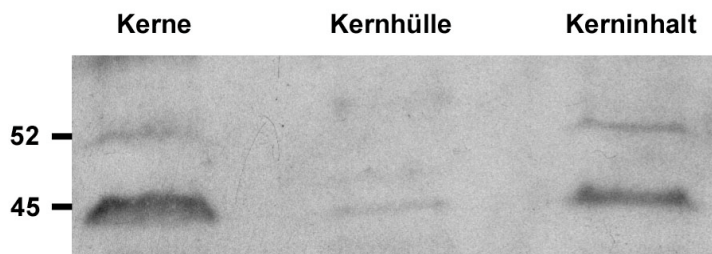


Abb. 5.43: p52 im Kern von *Xenopus* Oocyten. Western Blot von isolierten Oocytenkernen, isolierten Kernhüllen und den entsprechenden Kerninhalten mit mAb56.

Die im Kerninhalt nachgewiesenen Polypeptide sollten ebenfalls massenspektrometrisch analysiert werden. Die Menge der aus eindimensionalen Gelen isolierten Proteine (siehe Abb. 5.43) reichte aber leider nicht aus, um die Antigene eindeutig zu bestimmen.

Schließlich wurden die Antigene von mAb56 im Immunblot von *Xenopus* Eiextrakt nachgewiesen. Dieser Eiextrakt wird u.a. verwendet, um *in vitro* Kerne zu bilden. In diesen Kernen werden, aufgrund fehlender Transkription, keine Nukleoli gebildet. Nukleoläre Proteine sind daher in PNBs lokalisiert (1.3.1). In der Immunfluoreszenz markierte mAb56 solche PNBs (Krüger, 1998). Im Western Blot von im 2D-Gel aufgetrennten Eiextrakt-Proteinen wurden ebenfalls zwei Antigene von ca. 52 und 45 kD erkannt (nicht gezeigt). Auch hier konnten die Polypeptide aber leider nicht eindeutig durch Massenspektrometrie identifiziert werden.

Zusammenfassend bleibt die Existenz von Cytokeratin 19 im Zellkern bzw. im Nukleolus zweifelsfrei nachzuweisen. Anderenfalls muß davon ausgegangen werden, daß die p52 Antikörper in der Fluoreszenz und im Immunblot unterschiedliche Proteine erkennen.

6 Diskussion

Im Verlauf dieser Arbeit wurde eine Reihe von ribosomalen und nicht-ribosomalen nukleolären Proteine kloniert und als GFP/RFP-Fusionsproteine exprimiert, um ihr dynamisches Verhalten und ihre Assoziation mit nukleolären Strukturen in lebenden Kulturzellen zu analysieren. Insbesondere gelang es erstmalig, die Mobilität von pol I in Abhängigkeit vom Transkriptionszustand quantitativ zu erfassen. Weiterhin wurden neue Wege aufgezeigt, um die komplexen Abläufe der Ribosomenbiogenese *in vivo* zu untersuchen.

6.1 Lokalisation und Mobilität von RNA Polymerase I

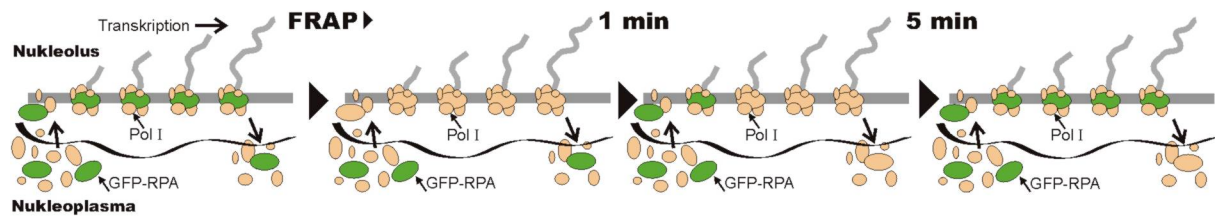
Zwei pol I spezifische Untereinheiten, RPA194 und RPA53, wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet (siehe 1.1.1 und 5.1.1). Neben den von anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellten Klonen der murinen pol I-Untereinheiten wurde erstmalig auch die menschliche Untereinheit RPA53 kloniert und exprimiert. Sie erwies sich zu 75% identisch zur entsprechenden Untereinheit der Maus und lokalisierte zusammen mit den anderen Fusionsproteinen korrekterweise in den fibrillären Zentren der Nukleoli, unabhängig von deren Organisation und den verwendeten Zelllinien. Auch die im Verlauf der vorliegenden Arbeit durch FRAP-Messungen gezeigten dynamischen Eigenschaften der Untereinheiten waren in allen verwendeten Zelltypen identisch. Dies sind weitere Belege dafür, daß die Polymerase-Untereinheiten verschiedener Organismen sehr stark konserviert sind. Menschliche Untereinheiten können sogar ihre Homologe in der Hefe funktionell ersetzen (Shpakovski et al., 1995, McKune et al., 1995).

Die Verteilung der exprimierten Untereinheiten in den FCs entsprach der Lokalisation von endogenem pol I, nachgewiesen durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Während der Mitose waren die Fusionsproteine in chromosomalen NORs lokalisiert, ebenso wie die endogenen Polymerase I-Moleküle (siehe 1.1.1 und 1.3.1). Die korrekte Lokalisation der GFP/RFP-Untereinheiten und die Lebensfähigkeit der transfizierten Zellen im Verlauf mehrerer Zellzyklen lassen vermuten, daß die Fusionsproteine in funktionelle Transkriptionskomplexe integriert wurden. Allerdings fehlt bis jetzt ein formaler Beweis.

Durch FRAP-Analysen ließen sich in der vorliegenden Arbeit erstmalig die dynamischen Eigenschaften von pol I in Abhängigkeit von der Transkriptionsaktivität bestimmen. In FCs proliferierender Interphase-Zellen erwiesen sich nach FRAP-Messungen ungefähr die Hälfte der gebleichten GFP-RPA194 und GFP-RPA53 Moleküle als mobil. Diese pol I Moleküle wurden innerhalb von ca. 5 Minuten zwischen dem FC und dem Nukleoplasma ausgetauscht. Die gleiche mittlere Verweildauer der beiden Proteine im Nukleolus bestätigt, daß es sich um Untereinheiten eines gemeinsamen Enzymkomplexes handelt. Die Kinetik der Fluoreszenzerholung beider Untereinheiten war jedoch unterschiedlich. GFP-RPA53 zeigte eine schnellere anfängliche Erholung als GFP-RPA194. Danach war eine langsamere Erholungsphase zu beobachten, nach der beide Untereinheiten ähnliche Plateaus erreichten. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die beiden Proteine sich als getrennte Untereinheiten zwischen Transkriptionsort und dem Nukleoplasma hin- und herbewegen und erst am Promoter der rRNA-Gene in einen gemeinsamen Initiationskomplex integriert werden. Das Konzept von vorgefertigten pol I „Holoenzymen“ ist mit diesen Befunden kaum vereinbar (Seither et al., 1998).

Die Interpretation der FRAP-Daten ist in Abb. 6.1 schematisch dargestellt. Die Assoziation der GFP-RPAs mit dem Nukleolus resultiert in einer relativ schnellen anfänglichen Fluoreszenzerholung, die in eine mit der Elongation korrelierende, langsame und lineare Erholungsphase übergeht. Nach der Transkription eines Gens dissoziiert der Enzymkomplex und die Untereinheiten diffundieren zurück in das Nukleoplasma. Die

a FRAP von aktiver pol I



b FRAP von inhibierter pol I

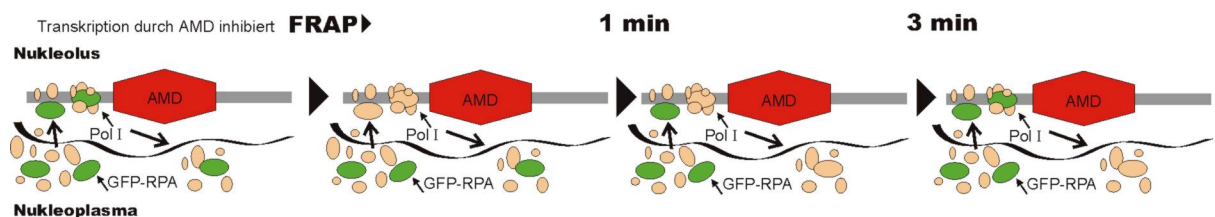


Abb. 6.1: Schematische Darstellung der FRAP Ergebnisse für pol I. (a) In dem vereinfachten Modell ist die Korrelation der Transkriptionsdauer eines rRNA-Gens durch den pol I-Enzymkomplex (gelb) mit der gemessenen Fluoreszenzerholung der mobilen Fraktion einer GFP-pol I-Untereinheit (grün) gezeigt. (Pol I ist im fibrillären Zentrum lokalisiert, zur besseren Übersicht wurden die Kompartimente des Nukleolus nicht dargestellt). Die Ergebnisse lassen auf einen Austausch der Untereinheiten zwischen Nukleolus und Nukleoplasma schließen. Aus dem Influx der Fusionsproteine in den Nukleolus resultiert eine erste schnelle Erholungsphase. Die folgende langsamere, weitgehend lineare Erholungsphase korreliert mit der Elongation. Die Fluoreszenz hat sich vollständig erholt, wenn das gesamte Gen nach dem Bleichen wieder mit GFP-markierten pol I-Molekülen besetzt ist. (b) Nach Zugabe des Transkriptionshemmers AMD können sich keine produktiven Transkriptionskomplexe ausbilden. Nach ihrer Bildung dissoziieren die Präinitiationskomplexe wieder und die pol I-Untereinheiten diffundieren zurück in das Nukleoplasma.

Fluoreszenzerholung erreicht ein Plateau, wenn die gebleichten Moleküle den Nukleolus verlassen haben und die rRNA-Gene wieder vollständig mit GFP-pol I besetzt sind (a).

In diesem Modell wird davon ausgegangen, daß die pol I Untereinheiten während der Elongation nicht ausgetauscht werden. Diese Annahme erscheint für die katalytische, DNA-bindende Untereinheit RPA194 logisch und kann vermutlich auch für RPA53 gemacht werden. Daher wird angenommen, daß die durch FRAP gemessene Kinetik der Fluoreszenzerholung direkt mit der Transkriptionsdauer eines rRNA-Gens zusammenhängt, zumal dieser Zeitraum mit *in vitro* bestimmten Transkriptionsraten vereinbar ist. Aus einer Transkriptionsgeschwindigkeit von $\sim 2,5$ kbp/min (Greenberg und Penman, 1966, Emerson, 1971) errechnet sich die Transkriptionsdauer von ca. 5 min für ein rRNA-Gen.

Die genaue Transkriptionsdauer kann durch die vorliegenden FRAP-Daten allerdings nicht bestimmt werden. Zunächst muß berücksichtigt werden, daß die Messungen bei 25°C durchgeführt wurden. Die Temperaturabhängigkeit der pol I-Transkription muß noch analysiert werden. Da die Geschwindigkeit enzymkatalysierter Reaktionen bei Temperaturerhöhungen zunimmt, ist zu vermuten, daß die Transkriptionsdauer bei 37°C geringer ist und für die beteiligten Moleküle eine entsprechend höhere Mobilität gemessen wird. Weiterhin ist für die quantitative Analyse einzelner Prozesse ein genaues kinetisches Modell erforderlich (siehe unten).

RPA53 wurde ursprünglich als PAF53 (polymerase associated factor) beschrieben und mit der Regulation des Transkriptionskomplexes in Verbindung gebracht (Hanada et al., 1996). Dabei wurde angenommen, daß die Assoziation von PAFs mit pol I dem Enzymkomplex spezifische Aktivität verleiht. Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, daß PAF53 kein locker assoziierter Regulationsfaktor, sondern eher eine Untereinheit von pol I ist (daher RPA53 genannt; Seither et al., 1997). In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis wurde auch in der vorliegenden Arbeit nach Kotransfektionen mit RPA194 kein pol I in den Nukleoli detektiert, das nicht mit PAF/RPA53 assoziiert war und somit eine inaktive Form des Enzyms repräsentieren könnte. Weiterhin zeigen die FRAP-Daten, daß RPA53 während der gesamten Elongationsphase mit dem Transkriptionskomplex assoziiert bleibt. RPA53 spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der Bildung des Initiationskomplexes, indem es die Bindung von pol I an UBF vermittelt (Hanada et al., 1996, Seither et al., 1997). Solche Funktionen könnten die unterschiedlichen anfänglichen Erholungsraten beeinflussen. Die genaue Abfolge bei der Bildung des Initiations- und Transkriptionskomplexes ist jedoch nicht bekannt. Daher ist die Ursache der deutlich höheren apparenten Mobilität von RPA53 in der ersten Minute der Fluoreszenzerholung unklar.

Über die scheinbar immobile Fraktion der jeweiligen untersuchten GFP-Fusionsproteine herrscht ebenfalls einige Unklarheit. Eine Möglichkeit ist, daß der beim FRAP gemessene immobile Teil über einen längeren Zeitraum an mehreren Prozessen beteiligt ist, bevor er wieder mit dem nukleoplasmatischen „Pool“ äquilibriert. So könnte der Befund, daß scheinbar 40-50% der GFP-RPA Moleküle immobil sind, damit zusammenhängen, daß ein bestimmter Anteil der pol I-Moleküle nach der Termination nicht in das Nukleoplasma zurückkehrt, sondern an neuen Initiationsvorgängen teilnimmt (Jansa et al., 2001, siehe auch Panov et al., 2001). Eine andere Möglichkeit ist die Existenz immobiler pol I Untereinheiten im FC, entweder in einem Speicher inaktiver Moleküle oder in nicht aktivierten Präinitiationskomplexen gebunden. Dagegen sprechen allerdings die FRAP-Daten von transkriptionell inaktiven Nukleoli.

Nach Actinomycin D (AMD)-Behandlung von Zellen war die Mobilität der Untereinheiten in transkriptionell inaktiven FCs deutlich höher, was durch das Fehlen von produktiven Transkriptionskomplexen bei blockierter Elongation erklärt werden kann (Abb. 6.1b). Die durch AMD blockierte Transkription resultiert in einem schnellerem Austausch der GFP-pol I Moleküle, wobei vermutlich noch Präinitiationskomplexe mit einer mittleren Lebensdauer von bis zu drei Minuten gebildet werden. Die praktisch vollständige Mobilität der inaktiven pol I Komponenten widerspricht einer Lagerung im Nukleolus. Da die pol I-Untereinheiten offenbar nicht im FC zurückgehalten werden und bei transkriptionell aktiven Nukleoli schnell aus dem Nukleoplasma rekrutiert werden, ist es wahrscheinlich, daß die Untereinheiten durch ihre direkte Reintegration in Initiationskomplexe an benachbarte Promoter als scheinbar immobile Fraktion gemessen werden.

Der Vergleich der Mobilität von pol I-Untereinheiten in Nukleoli mit unterschiedlich angeordneten FCs ergab keine erkennbaren Unterschiede. In einzelnen kompakten FCs und in mehreren dispers angeordneten kleineren FCs eines Nukleolus wurden praktisch identische FRAP-Daten gemessen. Diese unterschiedlich organisierten nukleolären Strukturen sollen mit der Transkriptionsaktivität im Zusammenhang stehen, da der kompakte Typ als typisch für konfluente Kulturzellen beschrieben wurde, bei denen die Ribosomensynthese verringert ist. Die kompaktere Form der nukleolären Komponenten wurde dabei mit der von inaktiven segregierten Nukleoli verglichen (siehe Shaw und Jordan, 1995). Da die Transkriptionsaktivität durch die Anzahl aktiv transkribierter rDNA-Gene, bzw. initiationskompetenter pol I-Moleküle bestimmt wird, kann durch die gemessene Mobilität der pol I-Moleküle keine Korrelation der nukleolären Struktur mit einer unterschiedlich hohen Transkriptionsaktivität nachgewiesen werden. Die Frage der Organisation der viele

Genkopien enthaltenden FCs bleibt weiterhin offen. Vermutlich sind aktive und inaktivierte rDNA-Gene zufällig verteilt, wie bei Hefe gezeigt wurde (Dammann et al., 1995, siehe auch 1.3.3).

In diesem Zusammenhang ist die Auflockerung kompakter nukleolärer Strukturen zu sogenannten „necklace“ Strukturen nach der Behandlung von Zellen mit DRB (5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole) interessant (siehe Le Panse et al., 1999). Während die rDNA-Transkription aufrechterhalten wird, entfaltet sich der Nukleolus und einzelne kleine FCs ähnlicher Größe werden sichtbar, die wie durch das DFC verbundene Perlen aufgereiht sind (Granick, 1975a, b, Scheer und Benavente, 1990, Le Panse et al., 1999). Diese mit pol I, Transkriptionsfaktoren und prä-rRNA-Transkripten assoziierten FCs repräsentieren vermutlich einzelne rDNA-Einheiten, die nach Entfernung des DRB wieder zur ursprünglichen Struktur des Nukleolus reorganisiert werden (Puvion-Dutilleul et al., 1983, Scheer et al., 1984, Haaf et al., 1991, Weisenberger und Scheer, 1995, Haaf und Ward, 1996, Le Panse et al., 1999). Obwohl die Verteilung aktiver und inaktiver rDNA-Gene auch hier nicht geklärt ist, weisen solche Ergebnisse darauf hin, daß die Struktur des Nukleolus nicht alleine von der rDNA-Transkription abhängt. Auch in diesen durch DRB induzierten Strukturen sollte die Mobilität von pol I noch untersucht werden.

Generell repräsentieren die beim FRAP gemessenen Daten die Gesamtheit einer bestimmten Population von GFP-Fusionsproteinen, unabhängig davon, ob sie in freier oder gebundener Form, aktiv oder inaktiv, sowie in verschiedenen Komplexen vorliegen. Es kann von diesem Gesamtwert der Mobilität nicht direkt auf einzelne molekulare Prozesse geschlossen werden, solange für diese kein vollständiges Modell existiert (siehe Phair und Misteli, 2001). Dies ist beim komplexen Prozeß der Initiation der rDNA-Transkription der Fall, und auch die Funktionen der meisten pol I-Untereinheiten und assoziierten Faktoren sind unbekannt (siehe Paule, 1998 und Einleitung). Weitere Vorgänge wie die Dissoziation des Transkriptionskomplexes nach der Termination und die Reinitiation am Promoter beeinflussen ebenfalls die Mobilität der pol I-Moleküle. Die Transkriptionseinheiten könnten z.B. räumlich so angeordnet sein, daß ein Teil der pol I-Moleküle direkt nach der Termination effektiv an den Promoter-Komplex des nächsten rDNA-Gens bindet (Moss et al., 1992, Jansa et al., 2001). Wie oben erwähnt kann dieses Modell nach den vorliegenden Daten für höchstens 50% der Population zutreffen. Weiterhin koexistieren aktive und inaktive Genkopien im Nukleolus (siehe Lucchini und Sogo, 1998, Jackson et al., 1998) und pol I Moleküle können in verschiedenen Aktivitätszuständen vorliegen (Aprikian et al., 2001, Miller et al., 2001, Seither et al., 2001). Ein komplettes, alle diese Punkte berücksichtigendes Modell der rDNA-Transkription müßte mit den kinetischen Eigenschaften der beteiligten Proteine vereinbar sein. Somit können FRAP-Daten als Kontrolle für solche Modelle herangezogen werden (siehe Misteli, 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Lokalisation von aktiv transkribierender RNA-Polymerase I in FCs bestätigt (siehe auch 6.2). Es wurde eine mit der Transkriptionsaktivität korrelierende Mobilität von pol I in diesem Kompartiment festgestellt, die mit dem Modell in Abb. 6.1 vereinbar ist. Dieses beinhaltet den Import einzelner pol I-Untereinheiten in das FC, den dortigen Zusammenbau zu einem Holoenzym, die Transkription eines rRNA-Gens, sowie die Dissoziation und den Export der Untereinheiten zurück in das Nukleoplasma.

Obwohl pol I in FCs lokalisiert ist, blieb der genaue rDNA-Transkriptionsort umstritten. Durch die Verwendung verschiedener Methoden zum Nachweis von naszierenden rRNAs wurden unterschiedliche Ergebnisse erzielt (Thiry et al., 2000, Cmarko et al., 2000). So wurde das FC als „Lageraum“ für inaktive pol I-Moleküle angesehen, während die Transkription im DFC stattfindend sollte. Gleichzeitig sollten diesem Modell zufolge die pol I-Enzymkomplexe als immobile Transkriptions-„Stationen“ vorliegen, durch die mobile rDNA durchgeschleust und transkribiert werden soll (Hozák et al., 1994).

Diese Modelle können durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weitgehend widerlegt werden. Die Mobilität der Enzymkomplexe wurde eindeutig nachgewiesen. Die Existenz eines inaktiven Speichers von pol I-Molekülen im fibrillären Zentrum ist nahezu ausgeschlossen, da die vorliegenden Daten einen vollständigen Austausch von inaktiver pol I mit dem Nukleoplasma zeigen. Alle im Verlauf dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse weisen auf das fibrilläre Zentrum als rDNA-Transkriptionsort hin, in Übereinstimmung mit BrUTP-Experimenten (Thiry et al., 2000; Mais und Scheer, 2000). Dies wird im nächsten Abschnitt durch die Darstellung von FC und DFC in lebenden Zellen noch verdeutlicht.

6.2 Darstellung der nukleolären Komponenten in der lebenden Zelle

Wie bisher diskutiert, wurde in der vorliegenden Arbeit das fibrilläre Zentrum durch die *in vivo* Lokalisation von aktiven GFP- oder RFP-markierten pol I-Untereinheiten als Ort der rDNA-Transkription identifiziert. Nach Expression von GFP- oder RFP-Fibrillarin wurde das DFC spezifisch markiert und bei der gleichzeitigen Expression mit GFP/RFP-pol I waren die jeweiligen Fusionsproteine zwar eng benachbart, aber dennoch räumlich eindeutig unterscheidbar. Die pol I-enthaltenden FCs waren teilweise oder vollständig vom DFC umgeben, in Übereinstimmung mit der nukleolären Ultrastruktur (Abb. 6.2). Diese zum ersten Mal direkt an lebenden Zellen gemachten Beobachtungen sind mit Ergebnissen vereinbar, die bisher nur aus der Lokalisation von rRNA-Transkripten abgeleitet wurden. Diese legen nahe, daß sich die naszierenden prä-rRNA Transkripte vom Ort der Transkription etwa 0,2-0,5 µm weit in das DFC erstrecken, wo die ersten Prozessierungsschritte stattfinden, an denen u.a. Fibrillarin beteiligt ist (Lazdins et al., 1997, Thiry et al., 2000).

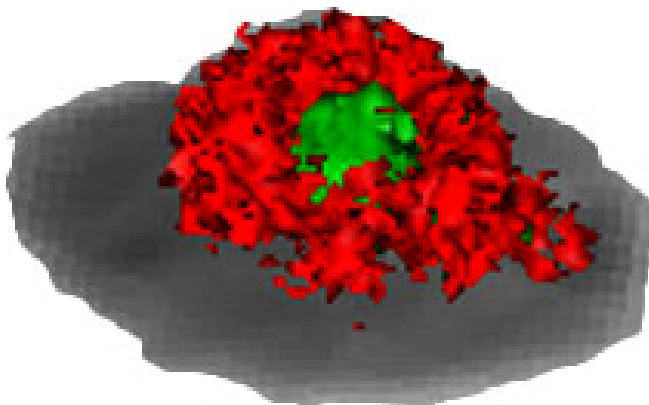


Abb. 6.2: Die Struktur des Nukleolus im 3D-Modell. 3D-Rekonstruktion aus konfokalen Fluoreszenzaufnahmen einer GFP-pol I und RFP-Fibrillarin exprimierenden Cos-Zelle (siehe Abb. 5.12). Pol I (grün) ist im fibrillären Zentrum lokalisiert, umgeben von der dichten fibrillären Komponente, durch Fibrillarin (rot) markiert. Die granuläre Komponente (grau) ist durch den Ausschnitt einer zweidimensionalen Phasenkontrastaufnahme in der entsprechenden Ebene dargestellt (siehe Abb. 1.1).

Gegenüber den bisherigen Methoden zur Lokalisierung von rRNA-Genen wie BrUTP-Einbau, FISH und EM-Immuncytochemie, die kritische Fixierungsschritte und damit Artefaktmöglichkeiten beinhalten, bietet die Expression von GFP/RFP-Fusionsproteinen den offensichtlichen Vorteil der direkten Darstellung nukleolärer Proteine und die Möglichkeit, ihre räumliche Verteilung in der lebenden Zelle unter verschiedenen physiologischen Bedingungen zu untersuchen.

Deshalb wurden auch Proteine der granulären Komponente zusammen mit Fibrillarin exprimiert, um die Lagebeziehung der beiden Komponenten GC und DFC relativ zueinander zu analysieren. In normalen Interphasezellen war die Zuordnung nicht eindeutig möglich. Bei der gleichzeitigen Lokalisation von Fibrillarin und B23 oder L5 wurde eine unregelmäßig vermischte Verteilung der Fusionsproteine sichtbar. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu

elektronenmikroskopischen Präparaten, in denen oft deutlich distinkte DFC und GC Regionen sichtbar sind und Immungoldlokalisationen die eine meist eindeutige Lokalisation nukleolärer Proteine in der einen oder anderen Komponente zeigen. Die beiden Kompartimente sind mittels Immunfluoreszenz meistens nicht so zu erkennen. Daher wurden die beiden Komponenten im Lichtmikroskop nach Segregation der Nukleoli durch Actinomycin D (AMD) sichtbar gemacht. Durch die Inhibition der pol I-Transkription durch AMD werden die fibrillären und granulären Kompartimente zu einfachen, kompakten, aneinandergrenzenden Domänen umstrukturiert (Jordan und McGovern, 1981). Die nukleolären Proteine sind deutlich in einem der Komponenten lokalisierbar. So ließen sich auch in lebenden Zellen GFP/RFP-Fusionsproteine spezifisch im DFC (Fibrillarin) oder im GC (B23, ribosomale Proteine L5, L10) nachweisen.

Diese Ergebnisse korrelieren mit den Funktionen der Proteine. Fibrillarin ist an den ersten Prozessierungsschritten beteiligt, B23 an späteren (siehe 1.1.3). L5 und L10 werden, wie wahrscheinlich die meisten ribosomalen Proteine, im GC zu den Präribosomen hinzugefügt (siehe 1.1.3 und 6.3). Mit den in dieser Arbeit exprimierten nukleolären Fusionsproteinen stehen also, in lebenden Zellen, Marker für die räumliche Zuordnung von Transkription, frühen Prozessierungsschritten und späteren Reifungsprozessen zur Verfügung. Dabei konnte eine klar definierte Grenze zwischen FC und DFC gezeigt werden, die den Transkriptionsort und den umgebenden Bereich der ersten Prozessierungsschritte festlegt. Hingegen ist der Übergang zwischen DFC und GC in aktiv transkribierenden Nukleoli fließend. Diese Ergebnisse können mit der Lokalisation nukleolärer Proteine aufgrund ihrer komplexen und dynamischen Protein-Protein und Protein-RNA Wechselwirkungen während der Ribosomenbiogenese erklärt werden, die vermutlich größtenteils die Struktur des Nukleolus bestimmen (siehe 1.3).

Es wäre von Interesse eine Reihe weiterer nukleolärer Proteine als GFP/RFP-Fusionsproteine zu exprimieren, diese relativ zueinander zu lokalisieren und zu untersuchen inwieweit dadurch eine lineare Korrelation mit den Funktionen der Proteine bei der Ribosomensynthese erstellt werden kann.

6.3 Ribosomale Proteine

Im Verlauf dieser Arbeit konnten drei ribosomale Proteine in lebenden Zellen exprimiert und lokalisiert werden. L4, L5 und L10 wurden als GFP- bzw. RFP-Fusionsproteine im Nukleolus und im Cytoplasma nachgewiesen. Die Ergebnisse lassen auf einen Einbau der chimären Proteine in Präribosomen, sowie deren Export und Reifung zu funktionellen Ribosomen schließen. Dies wurde auch in anderen Arbeiten für verschiedene GFP-markierte ribosomale Proteine gezeigt, u.a. bei der Hefe (Hurt et al., 1999, Lalucque und Silar, 2000).

GFP-L5 war in allen untersuchten Zellen im Nukleolus und im Cytoplasma lokalisiert. In segregierten Nukleoli wurde es als Bestandteil des GCs nachgewiesen. L5 bildet einen Komplex mit der 5S rRNA, der zu einem relativ frühen Zeitpunkt des Zusammenbaus der großen prä-ribosomalen Untereinheit in diese rekrutiert werden soll (Deshmukh et al., 1993, Pittman et al., 1999, Dechampesme et al., 1999, siehe 1.1.3). Die nach diesem Syntheseschritt entstandenen prä-ribosomalen Komplexe können demnach der granulären Komponente zugeordnet werden.

GFP-L4 war wie GFP-L5 im Nukleolus und im Cytoplasma lokalisiert. In segregierten Nukleoli wurde es überraschenderweise ebenfalls in der granulären Komponente lokalisiert. L4 ist nach EM-Lokalisationen als an naszierende prä-rRNA-Transkripte bindendes Protein beschrieben worden (Chooi und Leiby, 1981). Daher sollte überprüft werden ob GFP-L4 als Marker für das DFC verwendet werden kann. Dies ist nach AMD-Behandlung nicht der Fall. Falls die früheren EM-Daten korrekt sind, ist es möglich, daß die prä-rRNAs mitsamt den

gebundenen Proteinen nach der Transkriptionshemmung weiter prozessiert werden und im GC akkumulieren (siehe Puvion-Dutilleul et al., 1997, Puvion-Dutilleul et al., 1992).

Über den Ort der Assoziation von L10 mit der großen ribosomalen Untereinheit gibt es in der Literatur Widersprüche, die in dieser Arbeit geklärt werden konnten. Im Gegensatz zu der für menschliches L10 gemachten Annahme, dieses Protein würde erst im Cytoplasma mit den ribosomalen Untereinheiten assoziieren (Nguyen et al., 1998), wurde gezeigt, daß es bei Hefe im Nukleolus in Ribosomen integriert wird und eine wichtige Rolle beim Export der 60S Untereinheit spielt (Gadal et al., 2001b, siehe 1.2.1). Weiterhin wurde menschliches L10 in Nukleolin-bindenden RNP-Komplexen nachgewiesen (Yanagida et al., 2001).

Die in der vorliegenden Arbeit klonierten und exprimierten menschlichen und *Xenopus* GFP/RFP-L10 Fusionsproteine waren in lebenden Zellen typischerweise ausschließlich im Cytoplasma nachweisbar. Interessanterweise konnte aber in einigen Zellen eine Akkumulation des Proteins in Nukleoli beobachtet werden, wobei meist keine cytoplasmatische Fluoreszenz detektierbar war. Diese Ergebnisse ließen den Schluß zu, daß L10 im Nukleolus mit den ribosomalen Untereinheiten assoziierte und in manchen Zellen dort akkumulierte, da der Export der Präribosomen blockiert war, vermutlich direkt oder indirekt durch die Überexpression des Fusionsproteins. Somit kann davon ausgegangen werden, daß auch in Zellen mit funktionierendem Ribosomenexport L10 bereits im Nukleolus in die Vorstufe der großen ribosomalen Untereinheit eingebaut wird. Da die L10-haltigen Präribosomen jedoch sofort den Nukleolus verlassen, sind die L10-Fließgleichgewichtskonzentrationen dort so gering, daß sie nicht nachweisbar sind. Tatsächlich konnte L10 eindeutig im Nukleolus und im Nukleoplasma nach experimenteller Hemmung des Ribosomenexports aus dem Zellkern nachgewiesen werden (siehe unten). In Zellen, die GFP/RFP-L10 im Nukleolus und im Cytoplasma exprimierten, kolokalisierte das Protein vollständig mit GFP/RFP-L5.

Untersuchungen mit einem L10-Antikörper zeigten ebenfalls, daß L10 kein rein cytoplasmatisches Protein ist. L10 wurde durch Immunblots in isolierten Zellkernen von humanen und *Xenopus*-Kulturzellen nachgewiesen. In der Immunfluoreszenz wurde in den meisten Zellen nur das Cytoplasma markiert. In einigen Zellen konnte jedoch eine schwache Fluoreszenz im Nukleoplasma detektiert werden, die oft in der Peripherie des Nukleolus konzentriert war. Exprimiertes GFP-L10 wurde durch den Antikörper ebenfalls erkannt, es wurden aber Zugänglichkeitsprobleme im Nukleolus offenbar.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit widerlegen die Annahme, daß L10 erst im Cytoplasma an die große ribosomale Untereinheit bindet (Nguyen et al., 1998). Sie stehen dagegen in Übereinstimmung mit Befunden bei der Hefe, daß L10 ein funktionelles NLS besitzt, bereits bei der rRNA-Prozessierung im Nukleolus beteiligt ist und durch die Bindung an NMD3 beim Export der großen Untereinheit durch CRM1 beteiligt ist (Gadal et al., 2001b, 1.2.1). Zu dieser Funktion paßt auch die Tatsache, daß L10 nur peripher mit der 60S Untereinheit assoziiert ist und sich leicht dissoziieren läßt (Loftus et al., 1997, Dick et al., 1997). Interessanterweise ist auch in der Hefe die Gleichgewichtskonzentration im normalen Nukleolus zu gering, um GFP-L10 nachzuweisen (Gadal et al., 2001b). Offenbar bindet das Protein im Nukleolus nur an Export-kompetente Untereinheiten und wird auf diese Weise rasch wieder aus dem Nukleolus entfernt (Ho et al., 2000b). Solange der Export aufrecht erhalten bleibt, akkumuliert GFP-L10 erst im Cytoplasma in detektierbaren Mengen. Wird hingegen der Export blockiert, verschiebt sich das Gleichgewicht hin zur Akkumulation im Nukleolus und Nukleoplasma.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß der Export von L10 und der 60S Untereinheit auch bei höheren Eukaryoten über den CRM1-abhängigen Weg erfolgt. Nach der Zugabe von Leptomycin B, das die Bindung von CRM1 an die Exportsequenz hemmt (1.2.1), zu GFP-L10 exprimierenden Kulturzellen akkumulierte das Fusionsprotein im Nukleoplasma

und im Nukleolus. Eine Akkumulation im Nukleoplasma, meistens in Form von einigen distinkten punktförmigen Aggregaten, wurde in allen Zellen beobachtet, hingegen war GFP-L10 nur in einigen Zellen auch im Nukleolus lokalisiert. Dies könnte auch auf die spezielle Rolle von L10 beim Zellkernexport hinweisen, da das ribosomale Protein GFP-S9 (zur Verfügung gestellt von Andrea Ewald) in Vergleichsexperimenten immer im Nukleolus akkumulierte (unveröffentlichte Daten).

In weiterführenden Experimenten soll das menschliche Homolog von NMD3 kloniert und als Fusionsprotein exprimiert werden. Dadurch kann die räumliche Verteilung von L10, NMD3 und den 60S Untereinheiten in lebenden Zellen höherer Eukaryoten untersucht werden. Außerdem sollen durch die Manipulation der exprimierten Sequenzen weitere Erkenntnisse über die Transportmechanismen gewonnen werden, an denen diese Proteine beteiligt sind. So kann die Rolle des NLS in L10 untersucht werden. Außerdem kann durch die Deletion des NES in NMD3 spezifisch der Export der großen Untereinheit blockiert werden (Ho et al., 2000a). Dadurch könnte u.a. die Akkumulation von L10 und anderen ribosomalen Proteinen überprüft werden und mit der Inhibition des CRM1-abhängigen Exportwegs durch Leptomycin B verglichen werden, der bisher einzige nachgewiesene Exportweg für ribosomale Untereinheiten (Ho et al., 2000a). Möglicherweise können auch, durch die Koimmunpräzipitation akkumulierter Präribosomen (siehe Ho et al., 2000a, b), weitere Adapter-Proteine identifiziert werden. Die Untersuchung ribosomaler Proteine der 40S Untereinheit (z.B. S9, siehe oben) könnte Aufschluß über den wahrscheinlich ebenfalls über CRM1 verlaufenden Export der kleinen Untereinheit geben (siehe Moy und Silver, 2002).

6.4 Cytokeratin 19 im Nukleolus?

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die Charakterisierung eines neuen Proteins, das durch den monoklonalen Antikörper mAb56 und Peptid-Antikörper in der Immunfluoreszenz im Nukleolus von *Xenopus laevis* lokalisiert wurde (siehe 1.4.1). Im Verlauf dieser Arbeit wurden, über Immunblots und MALDI-TOF Analysen, die Antigene dieser Antikörper als Isoformen des Cytokeratin 19 (CK19) identifiziert. Dieses Ergebnis war überraschend, insofern Intermediärfilament-Proteine (ausgenommen Lamine) normalerweise ausschließlich cytoplasmatisch sind.

Es sind jedoch schon seit einiger Zeit viele eigentlich cytoplasmatische Proteine auch im Nukleoplasma lokalisiert worden (siehe Klymkowsky, 1999 und Referenzen darin, Pestic-Dragovich, 2000, Olave et al., 2002, Percipalle et al., 2002). Darunter auch mit der nukleären Matrix assoziiertes Cytokeratin 8 (Aligué et al., 1990, siehe auch 1.3.3) und an Chromatin gebundenes Cytokeratin 19 (Ward et al., 1984). Die physiologische Relevanz der nukleären Lokalisation bleibt allerdings meist unklar und die Untersuchungen können durch Veränderungen während Fixierung und Immunlokalisierung erschwert werden (Melan und Sluder, 1992, Mertens et al., 1996, Klymkowsky, 1999). Da IF-Proteine *in vitro* an DNA binden, wurden ihre mögliche *in vivo* Lokalisation und mögliche Funktionen im Zellkern diskutiert (siehe 1.4.2, Traub und Shoeman, 1994). Der einzige Hinweis auf nukleoläre IF-Proteine ist eine vor kurzem durchgeführte Proteom-Analyse des Nukleolus (Andersen et al., 2002).

Obwohl die Existenz einer Zellkernmatrix umstritten ist, könnten filamentbildende Proteine im Zellkern, zumindest lokal, strukturelle bzw. organisatorische Funktionen ausüben (siehe 1.3.3). Insbesondere Keratine weisen eine hohe funktionelle und strukturelle Variabilität auf und spielen wahrscheinlich, neben der wichtigen mechanischen Funktion, bei diversen Prozessen eine Rolle (siehe 1.4.2).

Die Spezifität der mit den verschiedenen Antikörpern erhaltenen Ergebnisse in Immunfluoreszenz und Immunblot war im Vorfeld dieser Arbeit durch Mikrosequenzierung,

Peptid-Kompetition und Epitopbestimmung überprüft worden (1.4.1). Im Verlauf dieser Arbeit wurden die cDNA-Sequenzen der Antigene durch RT-PCR ermittelt und, in Übereinstimmung mit der massenspektrometrische Analyse, als Isoformen des *Xenopus* CK19-Homolog identifiziert. Schließlich wurde gezeigt, daß das *in vitro* exprimierte CK19 von den verwendeten Antikörpern erkannt wird.

Als nächster Schritt wurden die CK19-Isoformen als GFP-Fusionsproteine exprimiert, um ihre nukleoläre Lokalisation in lebenden Zellen zu bestätigen. Im Gegensatz zu den biochemischen Ergebnissen konnte jedoch GFP-CK19 weder im Kern noch in Nukleoli nachgewiesen werden, vielmehr wurden die Fusionsproteine in der Regel mit den endogenen Cytokeratinen in das cytoplasmatische IF-Netzwerk der Zelle integriert. Dieses Ergebnis stimmte mit der Tatsache überein, daß die Primärstruktur aller identifizierten *Xenopus* CK19-Isoformen, im Vergleich mit den entsprechenden Cytokeratinen anderer Spezies, stark konserviert ist. Dies ist, wie bei allen IF-Proteinen, besonders in der zentralen α -helikalen Domäne der Fall, welche die wichtigste Struktur für die IF-Polymerisation darstellt (Coulombe, 1993, Fuchs und Weber, 1994, Wu et al., 2000, Coulombe und Omary, 2002). Das in das Filamentsystem integrierte GFP-CK19 wurde nicht von mAb56 oder den Peptid-Antiseren erkannt. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit der Tatsache, daß die Antikörper keine endogenen Cytokeratin-Netzwerke erkennen (siehe 1.4). Es kann also davon ausgegangen werden, daß bei den in Filamenten organisierten Proteinen die entsprechenden Epitope maskiert sind.

Eine mögliche Schlußfolgerungen aus diesen Ergebnissen ist, daß die Antikörper in der Immunfluoreszenz und im Immunblot zwei völlig unterschiedliche Proteine erkennen. Diese Möglichkeit ist zwar aufgrund der identischen Eigenschaften von mAb56 und zwei Peptid-Antiseren sowie der Peptidkompetition des nukleolären Antigens (siehe 1.4.1) recht unwahrscheinlich, kann aber nicht hundertprozentig ausgeschlossen werden.

Alternativ erkennen die Antikörper nur eine nichtfilamentöse Form von CK19 im Nukleolus. In diesem Fall stellt sich die Frage, wie und in welcher Form ein zur Filamentbildung fähiges Cytokeratin in den Zellkern und den Nukleolus gelangt und warum exogenes GFP-CK19 nicht. Die Identifikation von CK19 ist in diesem Zusammenhang besonders interessant.

Die Funktion dieses Proteins ist noch unklar. Es wird in einer Vielzahl von verschiedenen epithelialen Zellen exprimiert, ohne eine klare Abhängigkeit von deren Struktur und Funktion zu zeigen und weist variable kontextabhängige Eigenschaften beim Filamentzusammenbau auf (siehe Fradette et al., 1998). Auffälliges Merkmal der Primärstruktur von CK19 ist das Fehlen der C-terminalen Schwanzdomäne (Bader et al., 1986, siehe 5.2.2). In Transfektionsexperimenten wurden IF-Proteine mit deletierten C-terminalen Domänen im Nukleoplasma lokalisiert, ohne die Fähigkeit zur Filamentbildung zu verlieren (siehe 1.4.2, Bader et al., 1991, Eckelt et al., 1992, Rogers et al., 1995). Cytokeratine bilden obligat Heterodimere aus Typ I und Typ II Proteinen. Typ II CK8 ist ein natürlicher Partner für Typ I CK18 und 19 (Übersicht siehe Coulombe und Omary, 2002). Auch das wildtypisch schwanzlose CK19 wurde mit einem C-terminal trunkierten CK8 koexprimiert und im Nukleoplasma in Aggregaten oder Filamenten nachgewiesen. Es wurde daraus geschlossen, daß eine durch die C-terminale Domäne vermittelte cytoplasmatische Verankerung existiert, nach deren Wegfall die vermutlich als Dimere oder Tetramere vorliegenden löslichen Cytokeratine in den Zellkern gelangen können, um dort unter bestimmten Bedingungen wieder Filamente zu bilden. Allerdings ist kein natürlich vorkommendes Typ II Cytokeratin ohne C-terminale Domäne bekannt und wie der Import der NLS-losen Cytokeratine erfolgt, bleibt unbekannt. Am wahrscheinlichsten ist ein Import über die Bindung an bestimmte nukleäre Proteine (Bader et al., 1991).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Typ I CK19 alleine exprimiert, d.h. Partner in Form von Typ II Cytokeratinen müssen in den verwendeten Zellen in ausreichenden Mengen vorhanden sein, um Dimere zu bilden und GFP-CK19 in der Regel in das cytoplasmatische IF-Netzwerk zu integrieren. Aussichtsreichster Kandidat ist in diesem Fall CK8 (Bader et al., 1988), das interessanterweise ebenfalls im Verlauf der vorliegenden Arbeit durch Immunblots in Zellkernen (5.2.5) und bei einer Proteom-Analyse im Nukleolus identifiziert wurde (Andersen et al., 2002). Die Signifikanz dieser Befunde bleibt allerdings unklar. Es bleibt festzuhalten, daß in der vorliegenden Arbeit allein exprimiertes GFP-CK19 in Intermediärfilamente eingebaut und im Cytoplasma verankert wurde.

Durch das Hinzufügen eines NLS, also durch die Expression von GFP-NLS-CK19, wurde das Protein in den Zellkern importiert und bildete dort auch Filamente. Dies zeigt in Übereinstimmung mit CK8/CK18-NLS Transfektionen, bei denen ebenfalls ausgedehnte Filamentsysteme im Zellkern gebildet wurden (Reichenzeller et al., 2000), daß ein NLS-enthaltendes Protein ausreicht, um die cytoplasmatische Retention zu überwinden und die Cytokeratinpaare in den Zellkern zu transportieren. Die nukleären GFP-NLS-CK19-Filamente scheinen oft mit der nukleolären Peripherie in Kontakt zu sein, eine Lokalisation des Fusionsproteins im Nukleolus konnte aber nicht beobachtet werden.

Falls ein nukleoläres CK19 existiert, müßte es in nichtfilamentöser Form vorliegen. Um das Protein an der Filamentbildung zu hindern und in löslicher Form zum Nukleolus zu transportieren, könnte es posttranslational modifiziert werden und/oder mit anderen (NLS-enthaltenden) Proteinen oder Komplexen assoziieren. Bei im Verlauf dieser Arbeit durchgeführten Koexpressionen mit GFP-CK19 und nukleolären RFP-Fusionsproteinen (Fibrillarin, B23, L10), wurde tatsächlich eine teilweise nukleoläre Lokalisation des Cytokeratins beobachtet. Eine Kolokalisation wurde aber auch nach der Koexpression von GFP-CK19 mit nicht-nukleolären RFP-Proteinen beobachtet (Lamin, HMG1). Bei der Koexpression könnte ein Teil der GFP-CK19 Proteine mit dem jeweiligen RFP-Protein assoziieren, um von diesem huckepack in den Zellkern transportiert zu werden. Obwohl dies eine plausible Möglichkeit für den Import von CK19 in den Zellkern ist, sind die Interaktionen offenbar nicht spezifisch. Die überexprimierten Fusionsproteine bleiben zudem im Zellkern miteinander assoziiert, d.h. das importierte CK19 wird nicht spezifisch zur granulären Komponente des Nukleolus dirigiert.

Die Identität des nukleolären Proteins „p52“ bleibt also leider ungeklärt. In weiteren Versuchen sollten zunächst die im Kerninhalt von Oocyten nachgewiesenen Proteine identifiziert werden, um die Lokalisation von CK19 im Zellkern eindeutig zu bestätigen. Weiterhin könnte ein neuer Antikörper gegen das gesamte *in vitro* exprimierte Protein hergestellt werden, um weitere Lokalisationsexperimente durchzuführen.

7 Zusammenfassung

Die Funktion des Nukleolus als Organell der prä-rRNA Synthese und des Zusammenbaus von Ribosomen ist in den letzten vier Jahrzehnten intensiv erforscht worden. Bis heute sind jedoch längst nicht alle Einzelschritte dieser komplexen Prozesse im Detail bekannt. Insbesondere ist die funktionelle Architektur des Nukleolus nach wie vor ungenügend aufgeklärt. Jedoch erbrachten in jüngster Zeit neue Analysetechniken unerwartete Erkenntnisse über Strukturen und Funktionen des Nukleolus. Insbesondere „Photobleaching“-Experimente nach Expression von nukleolären GFP (green fluorescent protein)-Fusionsproteinen zeigten, daß die Nukleoli hoch dynamische Strukturen sind, trotz ihrer kompakten und scheinbar stabilen Organisation. Weiterhin wurden etliche Proteine im Nukleolus identifiziert, die offenbar keine Rolle bei der Ribosomenbiogenese spielen und somit vermuten lassen, daß Nukleoli neben der Produktion von Ribosomen auch noch andere Funktionen haben. Schließlich zeigte eine Proteomanalyse, daß es noch eine Vielzahl unbekannter nukleolärer Proteine gibt. Am detailliertesten sind die Prozesse der Ribosomenbiogenese bisher aufgrund der hervorragenden genetischen und biochemischen Analysemöglichkeiten bei der Hefe untersucht worden. Aus zellbiologischer Sicht besteht bei diesem Organismus jedoch der Nachteil einer wenig ausgeprägten nukleolären Struktur, der die topologische Untersuchung nukleolärer Prozesse erschwert.

In der vorliegenden Arbeit wurden Fusionsprodukte aus verschiedenen nukleolären Proteinen mit fluoreszierenden Proteinen (GFP und dsRed: rot fluoreszierendes Protein) in lebenden Zellen von Säugern und *Xenopus laevis* exprimiert und lokalisiert. Dadurch standen „Marker“ für die drei Hauptkomponenten des Nukleolus zur Verfügung. Die dynamischen Eigenschaften dieser Fusionsproteine wurden quantitativ mit Hilfe von „Photobleaching“-Experimenten analysiert (FRAP: fluorescence recovery after photobleaching).

Im einzelnen wurde durch die Untersuchung von RNA-Polymerase I der rDNA Transkriptionsort im fibrillären Zentrum des Nukleolus bestätigt. Die kinetischen Analysen von zwei pol I-Untereinheiten (RPA194 und RPA53) durch FRAP in transkriptionell aktiven und inaktiven Nukleoli erlaubten direkte Rückschlüsse auf die Transkriptionsdauer der rRNA-Gene *in vivo*. Die individuellen pol I-Untereinheiten bewegen sich rasch zwischen Nukleoplasma und Nukleolus und interagieren in den fibrillären Zentren mit dem rDNA-Promoter. Dann werden sie in produktive Transkriptionskomplexe integriert, die während der Elongationsphase, die bei Raumtemperatur etwa fünf Minuten dauert, stabil bleiben und erst nach der Termination dissoziieren. Zumindest ein Teil der Untereinheiten wandert anschließend in das Nukleoplasma. Die Ergebnisse widersprechen Modellen, welche die dichte fibrilläre Komponente als Transkriptionsort ansehen oder immobile RNA Polymerase I-Moleküle postulieren.

Die Identifizierung des fibrillären Zentrums als rDNA-Transkriptionsort wurde durch die Koexpression der pol I-Untereinheiten mit Fibrillarin, einem Leitprotein der dichten fibrillären Komponente, ermöglicht. Durch die Expression der beiden Proteine als unterschiedlich fluoreszierende Fusionsproteine konnten die Orte der Transkription (die fibrillären Zentren) und die Orte der ersten Prozessierungsschritte, an denen Fibrillarin beteiligt ist (die dichte fibrilläre Komponente), in lebenden Zellen als direkt benachbarte, aber räumlich getrennte Kompartimente identifiziert werden.

Die Rolle der granulären Komponente als Ort späterer Prozessierungsschritte und Integration ribosomaler Proteine wurde durch die Expression von B23 und der ribosomalen Proteine L4, L5 und L10 verdeutlicht. Dabei wurde die nukleoläre Lokalisation von L10 erstmals belegt. In der Literatur wurde bisher angenommen, L10 würde erst im Cytoplasma mit Ribosomen assoziieren. Dies ist nicht der Fall, wie insbesondere Experimente mit Leptomycin B gezeigt haben. Diese Droge hemmt den CRM1-abhängigen Kernexport und

fürte zu einer deutlichen Akkumulation von L10-haltigen Präribosomen im Nukleoplasma von menschlichen Zellen.

Schließlich sollte ein neues nukleoläres Protein von *Xenopus laevis* molekular charakterisiert werden, das mit verschiedenen Antikörpern in der granulären Komponente des Nukleolus lokalisiert wurde. Durch massenspektrometrische Analysen nach zweidimensionaler Gelelektrophorese wurden die Antigene überraschenderweise als Cytokeratin-Homologe identifiziert. Im Verlauf dieser Arbeit wurden drei bisher unveröffentlichte Cytokeratin 19 Isoformen von *Xenopus* kloniert, sequenziert und als GFP-Fusionsproteine exprimiert. Diese wurden allerdings wie reguläre Cytokeratine in cytoplasmatische Intermediärfilamente integriert und konnten, auch nach Translokation in den Zellkern durch ein experimentell eingefügtes Lokalisationssignal, nicht im Nukleolus nachgewiesen werden. Nach der Kotransfektion mit verschiedenen Zellkern-Proteinen wurde Cytokeratin 19 mit diesen in den Zellkern und mit nukleolären Proteinen in den Nukleolus transportiert. Obwohl diese Versuche auf einen „Huckepack“-Transportmechanismus für ein normalerweise cytoplasmatisches Protein hinweisen, konnte Cytokeratin 19 nicht spezifisch in der granulären Komponente des Nukleolus lokalisiert werden. Daher konnte bisher, trotz intensiver Bemühungen, die Identität des in der Immunfluoreszenz nachgewiesenen nukleolären Proteins leider nicht aufgeklärt werden.

Summary

The function of the nucleolus as the site of pre-rRNA synthesis and ribosome assembly has been intensively studied over the last four decades. Yet to date, not all steps of these complex processes are known in detail. Especially the functional architecture of the nucleolus remains to be sufficiently clarified. Recently however, modern analysis techniques have brought surprising insights into structures and functions of the nucleolus. On the one hand, nucleoli, regarded as compact and stable structures, were shown to be quite dynamic by photobleaching experiments after expression of nucleolar GFP fusion proteins. Furthermore, a number of proteins were identified in the nucleolus that are apparently not involved in ribosome biogenesis, indicating additional nucleolar functions. Finally, proteomic analysis showed several unknown proteins to be localized in the nucleolus. Due to excellent possibilities of genetic and biochemic analysis, the steps of ribosome biogenesis have been examined in most detail in yeast. However, from a cell biological view, this organism has the disadvantage of a poorly defined nucleolar structure which aggravates the topological analysis of nucleolar processes.

In the present work, nucleolar proteins were expressed as fusions with fluorescent proteins (GFP: green fluorescent protein or dsRed: red fluorescent protein) in living mammalian and *Xenopus laevis* cells. These tagged proteins were used as markers for the three main components of the nucleolus. The dynamic properties of the fusion proteins were analyzed quantitatively in photobleaching experiments (FRAP: fluorescence recovery after photobleaching).

The analysis of RNA polymerase I allowed the conclusion that the fibrillar centers are the site of rDNA transcription. The kinetic FRAP analysis of two pol I subunits (RPA194 and RPA53) in transcriptionally active and inactive nucleoli allowed an estimate of the transcription time of rDNA genes *in vivo*. The individual pol I subunits move rapidly between the nucleoplasm and the nucleolus and associate at rDNA promoter sites. Then they are integrated into productive transcription complexes, which remain stable for the elongation phase of about five minutes at room temperature, and dissociate after termination. At least part of the subunits migrate to the nucleoplasm. The obtained results disagree with models that assume the site of transcription to be in the dense fibrillar component, as well as proposing immobile RNA Polymerase I molecules.

The designation of the fibrillar center as site of rDNA transcription was further corroborated by the coexpression of pol I subunits with fibrillarin, a major protein of the dense fibrillar component. Using two differently fluorescing tags, the sites of transcription (fibrillar centers) and the sites of early processing steps, in which fibrillarin participates (dense fibrillar components), could be identified in living cells as closely neighbored but clearly separated compartments.

The granular component as the site of late processing steps and assembly of ribosomal proteins was visualized by the expression of B23 and ribosomal proteins L4, L5 and L10. In the course of this work L10 was shown to be localized in the nucleolus for the first time. In the literature, human L10 was assumed to associate with ribosomes only in the cytoplasm. This is not the case, as was shown in particular by experiments with Leptomycin B. This drug inhibits the CRM1 dependent nuclear export pathway and resulted in a clear accumulation of L10 containing preribosomes in the nucleoplasm of human cells.

Finally, a novel nucleolar protein (p52) of *Xenopus laevis* was studied in detail. Antigens of various p52 antibodies, localized in the granular component of nucleoli by immunofluorescence were surprisingly identified as cytokeratin homologs by two-dimensional immunoblot analysis and mass spectrometry. In the course of this work three hitherto unpublished Cytokeratin 19 isoforms of *Xenopus* were cloned, sequenced and expressed as GFP-fusion proteins. However, these proteins behaved like regular cytokeratins and were integrated into intermediate filaments. They were not detectable in the nucleolus, even after translocation into the nucleus by means of an experimentally added localization signal. Following cotransfection with various nuclear RFP-fusion proteins, GFP-CK19 was transported into the nucleus and localized with its coexpressed partner. When coexpressed with nucleolar proteins, Cytokeratin 19 was also transported into the nucleolus. Although these experiments indicate a possible piggyback transport mechanism for a normally cytoplasmic protein, Cytokeratin 19 was not specifically located in the granular component of the nucleolus. Therefore, despite all efforts, until now the identity of the nucleolar protein originally identified by immunofluorescence remains to be clarified.

8 Literaturverzeichnis

- Aitchison JD, Rout MP.** The road to ribosomes. Filling potholes in the export pathway.
J Cell Biol. **2000** Nov 27;151(5):F23-6.
- Aligué R, Bastos R, Serratos J, Enrich C, James P, Pujades C, Bachs O.** Increase in a 55-kDa keratin-like protein in the nuclear matrix of rat liver cells during proliferative activation.
Exp Cell Res. **1990** Feb;186(2):346-53.
- Andersen JS, Lyon CE, Fox AH, Leung AK, Lam YW, Steen H, Mann M, Lamond AI.** Directed proteomic analysis of the human nucleolus.
Curr Biol. **2002** Jan 8;12(1):1-11.
- Aprikan P, Moorefield B, Reeder RH.** New model for the yeast RNA polymerase I transcription cycle.
Mol Cell Biol. **2001** Aug;21(15):4847-55.
- Auger-Buendia MA, Longuet M, Tavitian A.** Kinetic studies on ribosomal proteins assembly in preribosomal particles and ribosomal subunits of mammalian cells.
Biochim Biophys Acta. **1979** Jun 20;563(1):113-28.
- Bader BL, Jahn L, Franke WW.** Low level expression of cytokeratins 8, 18 and 19 in vascular smooth muscle cells of human umbilical cord and in cultured cells derived therefrom, with an analysis of the chromosomal locus containing the cytokeratin 19 gene.
Eur J Cell Biol. **1988** Dec;47(2):300-19.
- Bader BL, Magin TM, Freudenmann M, Stumpp S, Franke WW.** Intermediate filaments formed de novo from tail-less cytokeratins in the cytoplasm and in the nucleus.
J Cell Biol. **1991** Dec;115(5):1293-307.
- Bader BL, Magin TM, Hatzfeld M, Franke WW.** Amino acid sequence and gene organization of cytokeratin no. 19, an exceptional tail-less intermediate filament protein.
EMBO J. **1986** Aug;5(8):1865-75.
- Balakin AG, Smith L, Fournier MJ.** The RNA world of the nucleolus: two major families of small RNAs defined by different box elements with related functions.
Cell. **1996** Sep 6;86(5):823-34.
- Bataille N, Helser T, Fried HM.** Cytoplasmic transport of ribosomal subunits microinjected into the *Xenopus laevis* oocyte nucleus: a generalized, facilitated process.
J Cell Biol. **1990** Oct;111(4):1571-82.
- Bell P, Dabauvalle MC, Scheer U.** In vitro assembly of prenucleolar bodies in *Xenopus* egg extract.
J Cell Biol. **1992** Sep;118(6):1297-304.
- Benavente R, Dabauvalle MC, Scheer U, Chaly N.** Functional role of newly formed pore complexes in postmitotic nuclear reorganization.
Chromosoma. **1989** Oct;98(4):233-41.
- Benavente R, Krohne G, Stick R, Franke WW.** Electron microscopic immunolocalization of a karyoskeletal protein of molecular weight 145 000 in nucleoli and perinucleolar bodies of *Xenopus laevis*.
Exp Cell Res. **1984** Mar;151(1):224-35.
- Benavente R, Rose KM, Reimer G, Hugle-Dorr B, Scheer U.** Inhibition of nucleolar reformation after microinjection of antibodies to RNA polymerase I into mitotic cells.
J Cell Biol. **1987** Oct;105(4):1483-91.
- Benavente R.** Postmitotic nuclear reorganization events analyzed in living cells.
Chromosoma. **1991** May;100(4):215-20.

- Berezney R, Mortillaro MJ, Ma H, Wei X, Samarabandu J.** The nuclear matrix: a structural milieu for genomic function.
Int Rev Cytol. **1995**;162A:1-65.
- Beven AF, Lee R, Razaz M, Leader DJ, Brown JW, Shaw PJ.** The organization of ribosomal RNA processing correlates with the distribution of nucleolar snRNAs.
J Cell Sci. **1996** Jun;109 (Pt 6):1241-51.
- Biggiogera M, Kaufmann SH, Shaper JH, Gas N, Amalric F, Fakan S.** Distribution of nucleolar proteins B23 and nucleolin during mouse spermatogenesis.
Chromosoma. **1991** Mar;100(3):162-72.
- Bridger JM, Kill IR, Lichter P.** Association of pKi-67 with satellite DNA of the human genome in early G1 cells.
Chromosome Res. **1998** Jan;6(1):13-24.
- Brown JD.** Ribosome biogenesis: stripping for AAAction?
Curr Biol. **2001** Sep 4;11(17):R710-2.
- Carles C, Riva M.** Yeast RNA polymerase I subunits and genes.
In: *Transcription of ribosomal RNA genes by eukaryotic RNA polymerase I.* Ed.: Paule MR, Springer, **1998**: 9-38.
- Carmo-Fonseca M, Mendes-Soares L, Campos I.** To be or not to be in the nucleolus.
Nat Cell Biol. **2000** Jun;2(6):E107-12.
- Cerdido A, Medina FJ.** Subnucleolar location of fibrillar and variation in its levels during the cell cycle and during differentiation of plant cells.
Chromosoma. **1995** May;103(9):625-34.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC.** Green fluorescent protein as a marker for gene expression.
Science. **1994** Feb 11;263(5148):802-5.
- Chen D, Huang S.** Nucleolar components involved in ribosome biogenesis cycle between the nucleolus and nucleoplasm in interphase cells.
J Cell Biol. **2001** Apr 2;153(1):169-76.
- Choi WY, Leiby KR.** An electron microscopic method for localization of ribosomal proteins during transcription of ribosomal DNA: a method for studying protein assembly.
Proc Natl Acad Sci U S A. **1981** Aug;78(8):4823-7.
- Chung CT, Niemela SL, Miller RH.** One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution.
Proc Natl Acad Sci U S A. **1989** Apr;86(7):2172-5.
- Cmarko D, Verschure PJ, Rothblum LI, Hernandez-Verdun D, Amalric F, van Driel R, Fakan S.** Ultrastructural analysis of nucleolar transcription in cells microinjected with 5-bromo-UTP.
Histochem Cell Biol. **2000** Mar;113(3):181-7.
- Coulombe PA, Omary MB.** 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments.
Curr Opin Cell Biol. **2002** Feb;14(1):110-22.
- Coulombe PA.** The cellular and molecular biology of keratins: beginning a new era.
Curr Opin Cell Biol. **1993** Feb;5(1):17-29.
- Dammann R, Lucchini R, Koller T, Sogo JM.** Transcription in the yeast rRNA gene locus: distribution of the active gene copies and chromatin structure of their flanking regulatory sequences.
Mol Cell Biol. **1995** Oct;15(10):5294-303.
- Daneholt B.** A look at messenger RNP moving through the nuclear pore.
Cell. **1997** Mar 7;88(5):585-8.

- Dechampesme AM, Koroleva O, Leger-Silvestre I, Gas N, Camier S.** Assembly of 5S ribosomal RNA is required at a specific step of the pre-rRNA processing pathway.
J Cell Biol. **1999** Jun 28;145(7):1369-80.
- Deshmukh M, Tsay YF, Paulovich AG, Woolford JL Jr.** Yeast ribosomal protein L1 is required for the stability of newly synthesized 5S rRNA and the assembly of 60S ribosomal subunits.
Mol Cell Biol. **1993** May;13(5):2835-45.
- Dick FA, Karamanou S, Trumpower BL.** QSR1, an essential yeast gene with a genetic relationship to a subunit of the mitochondrial cytochrome bc1 complex, codes for a 60 S ribosomal subunit protein.
J Biol Chem. **1997** May 16;272(20):13372-9.
- Douset T, Wang C, Verheggen C, Chen D, Hernandez-Verdun D, Huang S.** Initiation of nucleolar assembly is independent of RNA polymerase I transcription.
Mol Biol Cell. **2000** Aug;11(8):2705-17.
- Duncan R, Hershey JW.** Identification and quantitation of levels of protein synthesis initiation factors in crude HeLa cell lysates by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis.
J Biol Chem. **1983** Jun 10;258(11):7228-35.
- Dundr M, Meier UT, Lewis N, Rekosh D, Hammarskjold ML, Olson MO.** A class of nonribosomal nucleolar components is located in chromosome periphery and in nucleolus-derived foci during anaphase and telophase.
Chromosoma. **1997** Jun;105(7-8):407-17.
- Dundr M, Misteli T, Olson MO.** The dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus.
J Cell Biol. **2000** Aug 7;150(3):433-46.
- Dundr M, Misteli T.** Functional architecture in the cell nucleus.
Biochem J. **2001** Jun 1;356(Pt 2):297-310.
- Dundr M, Olson MO.** Partially processed pre-rRNA is preserved in association with processing components in nucleolus-derived foci during mitosis.
Mol Biol Cell. **1998** Sep;9(9):2407-22.
- Eckelt A, Herrmann H, Franke WW.** Assembly of a tail-less mutant of the intermediate filament protein, vimentin, in vitro and in vivo.
Eur J Cell Biol. **1992** Aug;58(2):319-30.
- Eichler DC, Craig N.** Processing of eukaryotic ribosomal RNA.
Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. **1994**;49:197-239.
- Eisinger DP, Dick FA, Trumpower BL.** Qsr1p, a 60S ribosomal subunit protein, is required for joining of 40S and 60S subunits.
Mol Cell Biol. **1997** Sep;17(9):5136-45.
- Emerson CP.** Regulation of the synthesis and the stability of ribosomal RNA during contact inhibition of growth.
Nat New Biol. **1971** Jul 28;232(30):101-6.
- Feldherr CM, Kallenbach E, Schultz N.** Movement of a karyophilic protein through the nuclear pores of oocytes.
J Cell Biol. **1984** Dec;99(6):2216-22.
- Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj IW.** CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals.
Cell. **1997** Sep 19;90(6):1051-60.
- Fradette J, Germain L, Seshiah P, Coulombe PA.** The type I keratin 19 possesses distinct and context-dependent assembly properties.
J Biol Chem. **1998** Dec 25;273(52):35176-84.

- Franke WW, Kleinschmidt JA, Spring H, Krohne G, Grund C, Trendelenburg MF, Stoehr M, Scheer U.** A nucleolar skeleton of protein filaments demonstrated in amplified nucleoli of *Xenopus laevis*.
J Cell Biol. **1981** Aug;90(2):289-99.
- Franke WW, Winter S, von Overbeck J, Gudat F, Heitz PU, Stahli C.** Identification of the conserved, conformation-dependent cytokeratin epitope recognized by monoclonal antibody (lu-5).
Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol. **1987**;411(2):137-47.
- Fuchs E, Weber K.** Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease.
Annu Rev Biochem. **1994**;63:345-82.
- Fukuda M, Asano S, Nakamura T, Adachi M, Yoshida M, Yanagida M, Nishida E.** CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal.
Nature. **1997** Nov 20;390:308-311.
- Gadal O, Strauss D, Braspenning J, Hoepfner D, Petfalski E, Philippsen P, Tollervey D, Hurt E.** A nuclear AAA-type ATPase (Rix7p) is required for biogenesis and nuclear export of 60S ribosomal subunits.
EMBO J. **2001** Jul 16;20(14):3695-704.
- Gadal O, Strauss D, Kessl J, Trumpower B, Tollervey D, Hurt E.** Nuclear export of 60S ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence-containing factor, Nmd3p, that associates with the large subunit protein Rpl10p.
Mol Cell Biol. **2001** May;21(10):3405-15.
- Ganot P, Jady BE, Bortolin ML, Darzacq X, Kiss T.** Nucleolar factors direct the 2'-O-ribose methylation and pseudouridylation of U6 spliceosomal RNA.
Mol Cell Biol. **1999** Oct;19(10):6906-17.
- Gautier T, Fomproix N, Masson C, Azum-Gelade MC, Gas N, Hernandez-Verdun D.** Fate of specific nucleolar perichromosomal proteins during mitosis: cellular distribution and association with U3 snoRNA.
Biol Cell. **1994**;82(2-3):81-93.
- Gautier T, Robert-Nicoud M, Guilly MN, Hernandez-Verdun D.** Relocation of nucleolar proteins around chromosomes at mitosis. A study by confocal laser scanning microscopy.
J Cell Sci. **1992** Aug;102 (Pt 4):729-37.
- Gerber JK, Gogel E, Berger C, Wallisch M, Muller F, Grummt I, Grummt F.** Termination of mammalian rDNA replication: polar arrest of replication fork movement by transcription termination factor TTF-I.
Cell. **1997** Aug 8;90(3):559-67.
- Ginisty H, Amalric F, Bouvet P.** Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing.
EMBO J. **1998** Mar 2;17(5):1476-86.
- Ginisty H, Sicard H, Roger B, Bouvet P.** Structure and functions of nucleolin.
J Cell Sci. **1999** Mar;112 (Pt 6):761-72.
- Goessens G.** Nucleolar structure.
Int Rev Cytol. **1984**;87:107-58.
- González-Melendi P, Wells B, Beven AF, Shaw PJ.** Single ribosomal transcription units are linear, compacted Christmas trees in plant nucleoli.
Plant J. **2001** Aug;27(3):223-33.
- Görlich D.** Nuclear protein import.
Curr Opin Cell Biol. **1997** Jun;9(3):412-9.

- Granick D.** Nucleolar necklaces in chick embryo fibroblast cells. I. Formation of necklaces by dichlororibenzimidazole and other adenosine analogues that decrease RNA synthesis and degrade preribosomes.
J Cell Biol. **1975** May;65(2):398-417.
- Granick D.** Nucleolar necklaces in chick embryo fibroblast cells. II. Microscope observations of the effect of adenosine analogues on nucleolar necklace formation.
J Cell Biol. **1975** May;65(2):418-27.
- Grummt I.** Regulation of mammalian ribosomal gene transcription by RNA polymerase I.
Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. **1999**;62:109-54.
- Haaf T, Hayman DL, Schmid M.** Quantitative determination of rDNA transcription units in vertebrate cells.
Exp Cell Res. **1991** Mar;193(1):78-86.
- Haaf T, Ward DC.** Inhibition of RNA polymerase II transcription causes chromatin decondensation, loss of nucleolar structure, and dispersion of chromosomal domains.
Exp Cell Res. **1996** Apr 10;224(1):163-73.
- Hadjiolov AA.** The nucleolus and ribosome biogenesis.
Springer. **1985**
- Hanada K, Song CZ, Yamamoto K, Yano K, Maeda Y, Yamaguchi K, Muramatsu M.** RNA polymerase I associated factor 53 binds to the nucleolar transcription factor UBF and functions in specific rDNA transcription.
EMBO J. **1996** May 1;15(9):2217-26.
- Hassan AB, Errington RJ, White NS, Jackson DA, Cook PR.** Replication and transcription sites are colocalized in human cells.
J Cell Sci. **1994** Feb;107 (Pt 2):425-34.
- He D, Zeng C, Brinkley BR.** Nuclear matrix proteins as structural and functional components of the mitotic apparatus.
Int Rev Cytol. **1995**;162B:1-74.
- Heix J, Vente A, Voit R, Budde A, Michaelidis TM, Grummt I.** Mitotic silencing of human rRNA synthesis: inactivation of the promoter selectivity factor SL1 by cdc2/cyclin B-mediated phosphorylation.
EMBO J. **1998** Dec 15;17(24):7373-81.
- Heliot L, Kaplan H, Lucas L, Klein C, Beorchia A, Doco-Fenzy M, Menager M, Thiry M, O'Donohue MF, Ploton D.** Electron tomography of metaphase nucleolar organizer regions: evidence for a twisted-loop organization.
Mol Biol Cell. **1997** Nov;8(11):2199-216.
- Hernandez-Verdun D, Gautier T.** The chromosome periphery during mitosis.
Bioessays. **1994** Mar;16(3):179-85.
- Hernandez-Verdun D, Roussel P, Gebrane-Younes J.** Emerging concepts of nucleolar assembly.
J Cell Sci. **2002** Jun 1;115(Pt 11):2265-70.
- Herrmann H, Aebi U.** Structure, assembly, and dynamics of intermediate filaments.
Subcell Biochem. **1998**;31:319-62.
- Herrmann H, Aebi U.** Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics.
Curr Opin Cell Biol. **2000** Feb;12(1):79-90.
- Ho JH, Kallstrom G, Johnson AW.** Nascent 60S ribosomal subunits enter the free pool bound by Nmd3p.
RNA. **2000** Nov;6(11):1625-34.

- Ho JH, Kallstrom G, Johnson AW.** Nmd3p is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit.
J Cell Biol. 2000 Nov 27;151(5):1057-66.
- Hofmann W, Reichart B, Ewald A, Muller E, Schmitt I, Stauber RH, Lottspeich F, Jockusch BM, Scheer U, Hauber J, Dabauvalle MC.** 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. 2001 Mar 5;152(5):895-910.
- Hozák P, Cook PR, Schofer C, Mosgoller W, Wachtler F.** Site of transcription of ribosomal RNA and intranucleolar structure in HeLa cells.
J Cell Sci. 1994 Feb;107 (Pt 2):639-48.
- Hügler B, Hazan R, Scheer U, Franke WW.** Localization of ribosomal protein S1 in the granular component of the interphase nucleolus and its distribution during mitosis.
J Cell Biol. 1985 Mar;100(3):873-86.
- Hügler B, Scheer U, Franke WW.** Riboscharin: a nuclear Mr 40,000 protein specific to precursor particles of the large ribosomal subunit.
Cell. 1985 Jun;41(2):615-27.
- Hurt E, Hannus S, Schmelzl B, Lau D, Tollervey D, Simos G.** A novel in vivo assay reveals inhibition of ribosomal nuclear export in ran-cycle and nucleoporin mutants.
J Cell Biol. 1999 Feb 8;144(3):389-401.
- Isaac C, Yang Y, Meier UT.** Nopp140 functions as a molecular link between the nucleolus and the coiled bodies.
J Cell Biol. 1998 Jul 27;142(2):319-29.
- Jackson DA, Iborra FJ, Manders EM, Cook PR.** Numbers and organization of RNA polymerases, nascent transcripts, and transcription units in HeLa nuclei.
Mol Biol Cell. 1998 Jun;9(6):1523-36.
- Jäkel S, Görlich D.** Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells.
EMBO J. 1998 Aug 3;17(15):4491-502.
- Janmey PA, Shah JV, Janssen KP, Schliwa M.** Viscoelasticity of intermediate filament networks.
Subcell Biochem. 1998;31:381-97.
- Jansa P, Burek C, Sander EE, Grummt I.** The transcript release factor PTRF augments ribosomal gene transcription by facilitating reinitiation of RNA polymerase I.
Nucleic Acids Res. 2001 Jan 15;29(2):423-9.
- Jones E, Kimura H, Vigneron M, Wang Z, Roeder RG, Cook PR.** Isolation and characterization of monoclonal antibodies directed against subunits of human RNA polymerases I, II, and III.
Exp Cell Res. 2000 Jan 10;254(1):163-72.
- Jordan EG, McGovern JH.** The quantitative relationship of the fibrillar centres and other nucleolar components to changes in growth conditions, serum deprivation and low doses of actinomycin D in cultured diploid human fibroblasts (strain MRC-5).
J Cell Sci. 1981 Dec;52:373-89.
- Jordan P, Mannervik M, Tora L, Carmo-Fonseca M.** In vivo evidence that TATA-binding protein/SL1 colocalizes with UBF and RNA polymerase I when rRNA synthesis is either active or inactive.
J Cell Biol. 1996 Apr;133(2):225-34.

- Junéra HR, Masson C, Geraud G, Hernandez-Verdun D.** The three-dimensional organization of ribosomal genes and the architecture of the nucleoli vary with G1, S and G2 phases.
J Cell Sci. **1995** Nov;108 (Pt 11):3427-41.
- Karl T, Onder K, Kodzius R, Pichova A, Wimmer H, Th r A, Hundsberger H, Loffler M, Klade T, Beyer A, Breitenbach M, Koller L.** GRC5 and NMD3 function in translational control of gene expression and interact genetically.
Curr Genet. **1999** Jan;34(6):419-29.
- Kass S, Sollner-Webb B.** The first pre-rRNA-processing event occurs in a large complex: analysis by gel retardation, sedimentation, and UV cross-linking.
Mol Cell Biol. **1990** Sep;10(9):4920-31.
- Kill IR.** Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus. Evidence for a fibrillar-deficient region of the dense fibrillar component.
J Cell Sci. **1996** Jun;109 (Pt 6):1253-63.
- Klein J, Grummt I.** Cell cycle-dependent regulation of RNA polymerase I transcription: the nucleolar transcription factor UBF is inactive in mitosis and early G1.
Proc Natl Acad Sci U S A. **1999** May 25;96(11):6096-101.
- Klymkowsky MW.** Plakophilin, armadillo repeats, and nuclear localization.
Microsc Res Tech. **1999** Apr 1;45(1):43-54.
- Kneissel S, Franke WW, Gall JG, Heid H, Reidenbach S, Schnolzer M, Spring H, Zentgraf H, Schmidt-Zachmann MS.** A novel karyoskeletal protein: characterization of protein NO145, the major component of nucleolar cortical skeleton in *Xenopus* oocytes.
Mol Biol Cell. **2001** Dec;12(12):3904-18.
- Kressler D, Linder P, de La Cruz J.** Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol Cell Biol. **1999** Dec;19(12):7897-912.
- Krohne G, Dabauvalle MC, Franke WW.** Cell type-specific differences in protein composition of nuclear pore complex-lamina structures in oocytes and erythrocytes of *Xenopus laevis*.
J Mol Biol. **1981** Sep 5;151(1):121-41.
- Krohne G, Franke WW.** Proteins of pore complex--lamina structures from nuclei and nuclear membranes.
Methods Enzymol. **1983**;96:597-608.
- Krüger T.** Charakterisierung eines neuen nukleolären Proteins.
Diplomarbeit, 1998, Universität Würzburg
- Kruiswijk T, Planta RJ, Krop JM.** The course of the assembly of ribosomal subunits in yeast.
Biochim Biophys Acta. **1978** Feb 16;517(2):378-89.
- Kudo N, Matsumori N, Taoka H, Fujiwara D, Schreiner EP, Wolff B, Yoshida M, Horinouchi S.** Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region.
Proc Natl Acad Sci U S A. **1999** Aug 3;96(16):9112-7.
- Kuhn A, Vente A, Doree M, Grummt I.** Mitotic phosphorylation of the TBP-containing factor SL1 represses ribosomal gene transcription.
J Mol Biol. **1998** Nov 20;284(1):1-5.
- Kyhse-Anderson J.** Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.
J Biochem Biophys Meth. **1984**; 10: 203-209

- Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature. 1970 Aug 15;227(259):680-5.
- Lalucque H, Silar P.** In vivo labeling of functional ribosomes reveals spatial regulation during starvation in *Podospira anserina*.
BMC Genetics. 2000 Nov 16;1:3.
- Lamond AI, Earnshaw WC.** Structure and function in the nucleus.
Science. 1998 Apr 24;280(5363):547-53.
- Lamond AI.** RNA splicing. Running rings around RNA.
Nature. 1999 Feb 25;397(6721):655-6.
- Lampert A, Feigelson P.** A short lived polypeptide component of one of two discrete functional pools of hepatic nuclear alpha-amanitin resistant RNA polymerases.
Biochem Biophys Res Commun. 1974 Jun 18;58(4):1030-8.
- Lazdins IB, Delannoy M, Sollner-Webb B.** Analysis of nucleolar transcription and processing domains and pre-rRNA movements by in situ hybridization.
Chromosoma. 1997 Jun;105(7-8):481-95.
- Le Panse S, Masson C, Heliot L, Chassery JM, Junera HR, Hernandez-Verdun D.** 3-D organization of ribosomal transcription units after DRB inhibition of RNA polymerase II transcription.
J Cell Sci. 1999 Jul;112 (Pt 13):2145-54.
- Leger-Silvestre I, Noaillac-Depeyre J, Faubladiere M, Gas N.** Structural and functional analysis of the nucleolus of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*.
Eur J Cell Biol. 1997 Jan;72(1):13-23.
- Li B, Pilcher KY, Wyman TE, Machida CA.** Rapid preparation and identification of insert-containing recombinant plasmid DNA.
BioTechniques. 1997;23, 603-608.
- Lippincott-Schwartz J, Snapp E, Kenworthy A.** Studying protein dynamics in living cells.
Nat Rev Mol Cell Biol. 2001 Jun;2(6):444-56.
- Loftus TM, Nguyen YH, Stanbridge EJ.** The QM protein associates with ribosomes in the rough endoplasmic reticulum.
Biochemistry. 1997 Jul 8;36(27):8224-30.
- Long EO, Dawid IB.** Repeated genes in eukaryotes.
Annu Rev Biochem. 1980;49:727-64.
- Lucchini R, Sogo JM.** The dynamic structure of ribosomal RNA gene chromatin.
In: *Transcription of ribosomal RNA genes by eukaryotic RNA polymerase I*. Ed.: Paule MR, Springer, 1998: 255-276.
- Maden BE, Hughes JM.** Eukaryotic ribosomal RNA: the recent excitement in the nucleotide modification problem.
Chromosoma. 1997 Jun;105(7-8):391-400.
- Mais C, Scheer U.** Molecular architecture of the amplified nucleoli of *Xenopus* oocytes.
J Cell Sci. 2001 Feb;114(Pt 4):709-18.
- Mangiarotti G, Chiaberge S.** Reconstitution of functional eukaryotic ribosomes from *Dictyostelium discoideum* ribosomal proteins and RNA.
J Biol Chem. 1997 Aug 8;272(32):19682-7.
- Mann M, Hendrickson RC, Pandey A.** Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry.
Annu Rev Biochem. 2001;70:437-73.
- Matera AG.** Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space.
Trends Cell Biol. 1999 Aug;9(8):302-9.

- Mattaj IW, Englmeier L.** Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase.
Annu Rev Biochem. **1998**;67:265-306.
- Matz MV, Fradkov AF, Labas YA, Savitsky AP, Zaraisky AG, Markelov ML, Lukyanov SA.** Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species.
Nat Biotechnol. **1999** Oct;17(10):969-73.
- McKune K, Moore PA, Hull MW, Woychik NA.** Six human RNA polymerase subunits functionally substitute for their yeast counterparts.
Mol Cell Biol. **1995** Dec;15(12):6895-900.
- Meier UT, Blobel G.** Nopp140 shuttles on tracks between nucleolus and cytoplasm.
Cell. **1992** Jul 10;70(1):127-38.
- Meier UT, Blobel G.** NAP57, a mammalian nucleolar protein with a putative homolog in yeast and bacteria.
J Cell Biol. **1994** Dec;127(6 Pt 1):1505-14.
- Melan MA, Sluder G.** Redistribution and differential extraction of soluble proteins in permeabilized cultured cells. Implications for immunofluorescence microscopy.
J Cell Sci. **1992** Apr;101 (Pt 4):731-43.
- Mélèse T, Xue Z.** The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome.
Curr Opin Cell Biol. **1995** Jun;7(3):319-24.
- Mertens C, Kuhn C, Franke WW.** Plakophilins 2a and 2b: constitutive proteins of dual location in the karyoplasm and the desmosomal plaque.
J Cell Biol. **1996** Nov;135(4):1009-25.
- Milkereit P, Gadal O, Podtelejnikov A, Trumtel S, Gas N, Petfalski E, Tollervey D, Mann M, Hurt E, Tschochner H.** Maturation and intranuclear transport of pre-ribosomes requires Noc proteins.
Cell. **2001** May 18;105(4):499-509.
- Miller G, Panov KI, Friedrich JK, Trinkle-Mulcahy L, Lamond AI, Zomerdijk JC.** hRRN3 is essential in the SL1-mediated recruitment of RNA Polymerase I to rRNA gene promoters.
EMBO J. **2001** Mar 15;20(6):1373-82.
- Miller OL Jr, Bakken AH.** Morphological studies of transcription.
Acta Endocrinol Suppl (Copenh). **1972**;168:155-77.
- Miller OL Jr, Beatty BR.** Visualization of nucleolar genes.
Science. **1969** May 23;164(882):955-7.
- Misteli T.** Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression.
Science. **2001** Feb 2;291(5505):843-7.
- Misteli T.** The concept of self-organization in cellular architecture.
J Cell Biol. **2001** Oct 15;155(2):181-5.
- Monneron A, Bernhard W.** Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells.
J Ultrastruct Res. **1969** May;27(3):266-88.
- Moss T, Larose AM, Mitchelson K, Leblanc B.** Readthrough enhancement and promoter occlusion on the ribosomal genes of *Xenopus laevis*.
Biochem Cell Biol. **1992** May;70(5):324-31.
- Moss T, Stefanovsky VY.** Promotion and regulation of ribosomal transcription in eukaryotes by RNA polymerase I.
Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. **1995**;50:25-66.
- Mougey EB, O'Reilly M, Osheim Y, Miller OL Jr, Beyer A, Sollner-Webb B.** The terminal balls characteristic of eukaryotic rRNA transcription units in chromatin spreads are rRNA processing complexes.
Genes Dev. **1993** Aug;7(8):1609-19.

- Mougey EB, Pape LK, Sollner-Webb B.** A U3 small nuclear ribonucleoprotein-requiring processing event in the 5' external transcribed spacer of *Xenopus* precursor rRNA.
Mol Cell Biol. **1993** Oct;13(10):5990-8.
- Moy TI, Silver PA.** Nuclear export of the small ribosomal subunit requires the ran-GTPase cycle and certain nucleoporins.
Genes Dev. **1999** Aug 15;13(16):2118-33.
- Moy TI, Silver PA.** Requirements for the nuclear export of the small ribosomal subunit.
J Cell Sci. **2002** Jul 15;115(Pt 14):2985-95.
- Nguyen YH, Mills AA, Stanbridge EJ.** Assembly of the QM protein onto the 60S ribosomal subunit occurs in the cytoplasm.
J Cell Biochem. **1998** Feb 1;68(2):281-5.
- Nickerson JA, Blencowe BJ, Penman S.** The architectural organization of nuclear metabolism.
Int Rev Cytol. **1995**;162A:67-123.
- Nogi Y, Yano R, Nomura M.** Synthesis of large rRNAs by RNA polymerase II in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in RNA polymerase I.
Proc Natl Acad Sci U S A. **1991** May 1;88(9):3962-6.
- Ochs RL, Lischwe MA, Spohn WH, Busch H.** Fibrillarin: a new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera.
Biol Cell. **1985**;54(2):123-33.
- O'Farrell PZ, Goodman HM, O'Farrell PH.** High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins.
Cell. **1977** Dec;12(4):1133-41.
- Olave IA, Reck-Peterson SL, Crabtree GR.** Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin remodeling.
Annu Rev Biochem. **2002** ;71:755-81.
- Olson MO, Dundr M, Szebeni A.** The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities.
Trends Cell Biol. **2000** May;10(5):189-96.
- Omary MB, Ku NO, Liao J, Price D.** Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro.
Subcell Biochem. **1998**;31:105-40.
- Osheim YN, Beyer AL.** Electron microscopy of ribonucleoprotein complexes on nascent RNA using Miller chromatin spreading method.
Methods Enzymol. **1989**;180:481-509.
- Panov KI, Friedrich JK, Zomerdijk JC.** A step subsequent to preinitiation complex assembly at the ribosomal RNA gene promoter is rate limiting for human RNA polymerase I-dependent transcription.
Mol Cell Biol. **2001** Apr;21(8):2641-9.
- Paule MR (Editor)** Transcription of ribosomal RNA genes by eukaryotic RNA polymerase I.
Springer, 1998.
- Paule MR.** Promoter structure of class I genes.
In: *Transcription of ribosomal RNA genes by eukaryotic RNA polymerase I.* Ed.: Paule MR, *Springer, 1998*: 39-50.
- Pederson T, Politz JC.** The nucleolus and the four ribonucleoproteins of translation.
J Cell Biol. **2000** Mar 20;148(6):1091-5.
- Pederson T.** The plurifunctional nucleolus.
Nucleic Acids Res. **1998** Sep 1;26(17):3871-6.
- Pederson T.** Half a century of "the nuclear matrix".
Mol Biol Cell. **2000** Mar;11(3):799-805.

- Pederson T.** Diffusional protein transport within the nucleus: a message in the medium.
Nat Cell Biol. **2000** May;2(5):E73-4.
- Penman S, Smith I, Holtzman E, Greenberg H.** RNA metabolism in the HeLa cell nucleus and nucleolus.
Natl Cancer Inst Monogr. **1966** Dec;23:489-512.
- Percipalle P, Jonsson A, Nashchekin D, Karlsson C, Bergman T, Guialis A, Daneholt B.** Nuclear actin is associated with a specific subset of hnRNP A/B-type proteins.
Nucleic Acids Res. **2002** Apr 15;30(8):1725-34.
- Pestic-Dragovich L, Stojiljkovic L, Philimonenko AA, Nowak G, Ke Y, Settlage RE, Shabanowitz J, Hunt DF, Hozak P, de Lanerolle P.** A myosin I isoform in the nucleus.
Science. **2000** Oct 13;290(5490):337-41.
- Phair RD, Misteli T.** High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus.
Nature. **2000** Apr 6;404(6778):604-9.
- Piñol-Roma S.** Association of nonribosomal nucleolar proteins in ribonucleoprotein complexes during interphase and mitosis.
Mol Biol Cell. **1999** Jan;10(1):77-90.
- Pittman RH, Andrews MT, Setzer DR.** A feedback loop coupling 5 S rRNA synthesis to accumulation of a ribosomal protein.
J Biol Chem. **1999** Nov 19;274(47):33198-201.
- Politz JC, Tuft RA, Pederson T, Singer RH.** Movement of nuclear poly(A) RNA throughout the interchromatin space in living cells.
Curr Biol. **1999** Mar 25;9(6):285-91.
- Puvion E, Puvion-Dutilleul F.** Ultrastructure of the nucleus in relation to transcription and splicing: roles of perichromatin fibrils and interchromatin granules.
Exp Cell Res. **1996** Dec 15;229(2):217-25.
- Puvion-Dutilleul F, Mazan S, Nicoloso M, Pichard E, Bachellerie JP, Puvion E.** Alterations of nucleolar ultrastructure and ribosome biogenesis by actinomycin D. Implications for U3 snRNP function.
Eur J Cell Biol. **1992** Jun;58(1):149-62.
- Puvion-Dutilleul F, Nicoloso M, Bachellerie JP.** Altered structure of ribosomal RNA transcription units in hamster cells after DRB treatment.
Exp Cell Res. **1983** Jun;146(1):43-52.
- Puvion-Dutilleul F, Puvion E, Bachellerie JP.** Early stages of pre-rRNA formation within the nucleolar ultrastructure of mouse cells studied by in situ hybridization with a 5'ETS leader probe.
Chromosoma. **1997** Jun;105(7-8):496-505.
- Reichenzeller M, Burzlaff A, Lichter P, Herrmann H.** In vivo observation of a nuclear channel-like system: evidence for a distinct interchromosomal domain compartment in interphase cells.
J Struct Biol. **2000** Apr;129(2-3):175-85.
- Reimer G, Raska I, Tan EM, Scheer U.** Human autoantibodies: probes for nucleolus structure and function.
Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol. **1987**;54(3):131-43.
- Rogers MA, Nischt R, Korge B, Krieg T, Fink TM, Lichter P, Winter H, Schweizer J.** Sequence data and chromosomal localization of human type I and type II hair keratin genes.
Exp Cell Res. **1995** Oct;220(2):357-62.

- Rosorius O, Fries B, Stauber RH, Hirschmann N, Bevec D, Hauber J.** Human ribosomal protein L5 contains defined nuclear localization and export signals.
J Biol Chem. **2000** Apr 21;275(16):12061-8.
- Roussel P, Andre C, Comai L, Hernandez-Verdun D.** The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in active NORs and absent in inactive NORs.
J Cell Biol. **1996** Apr;133(2):235-46.
- Roussel P, Andre C, Masson C, Geraud G, Hernandez-Verdun D.** Localization of the RNA polymerase I transcription factor hUBF during the cell cycle.
J Cell Sci. **1993** Feb;104 (Pt 2):327-37.
- Rout MP, Blobel G, Aitchison JD.** A distinct nuclear import pathway used by ribosomal proteins.
Cell. **1997** May 30;89(5):715-25.
- Samarsky DA, Fournier MJ, Singer RH, Bertrand E.** The snoRNA box C/D motif directs nucleolar targeting and also couples snoRNA synthesis and localization.
EMBO J. **1998** Jul 1;17(13):3747-57.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc Natl Acad Sci U S A. **1977** Dec;74(12):5463-7.
- Savino TM, Bastos R, Jansen E, Hernandez-Verdun D.** The nucleolar antigen Nop52, the human homologue of the yeast ribosomal RNA processing RRP1, is recruited at late stages of nucleologenesis.
J Cell Sci. **1999** Jun;112 (Pt 12):1889-900.
- Savino TM, Gebrane-Younes J, De Mey J, Sibarita JB, Hernandez-Verdun D.** Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells.
J Cell Biol. **2001** May 28;153(5):1097-110.
- Savkur RS, Olson MO.** Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease.
Nucleic Acids Res. **1998** Oct 1;26(19):4508-15.
- Scheer U, Thiry M, Goessens G.** Structure, function and assembly of the nucleolus.
Trends Cell Biol. **1993**; 3: 236-241.
- Scheer U, Benavente R.** Functional and dynamic aspects of the mammalian nucleolus.
Bioessays. **1990** Jan;12(1):14-21.
- Scheer U, Hock R.** Structure and function of the nucleolus.
Curr Opin Cell Biol. **1999** Jun;11(3):385-90.
- Scheer U, Hugle B, Hazan R, Rose KM.** Drug-induced dispersal of transcribed rRNA genes and transcriptional products: immunolocalization and silver staining of different nucleolar components in rat cells treated with 5,6-dichloro-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole.
J Cell Biol. **1984** Aug;99(2):672-9.
- Scheer U, Rose KM.** Localization of RNA polymerase I in interphase cells and mitotic chromosomes by light and electron microscopic immunocytochemistry.
Proc Natl Acad Sci U S A. **1984** Mar;81(5):1431-5.
- Scheer U, Xia B, Merkert H, Weisenberger D.** Looking at Christmas trees in the nucleolus.
Chromosoma. **1997** Jun;105(7-8):470-80.
- Schmidt-Zachmann MS, Hugle B, Scheer U, Franke WW.** Identification and localization of a novel nucleolar protein of high molecular weight by a monoclonal antibody.
Exp Cell Res. **1984** Aug;153(2):327-46.
- Schmidt-Zachmann MS, Hugle-Dorr B, Franke WW.** A constitutive nucleolar protein identified as a member of the nucleoplasmin family.
EMBO J. **1987** Jul;6(7):1881-90.

- Seither P, Iben S, Grummt I.** Mammalian RNA polymerase I exists as a holoenzyme with associated basal transcription factors.
J Mol Biol. **1998** Jan 9;275(1):43-53.
- Seither P, Iben S, Thiry M, Grummt I.** PAF67, a novel protein that is associated with the initiation-competent form of RNA polymerase I.
Biol Chem. **2001** Aug;382(8):1163-70.
- Seither P, Zatzepina O, Hoffmann M, Grummt I.** Constitutive and strong association of PAF53 with RNA polymerase I.
Chromosoma. **1997** Sep;106(4):216-25.
- Shaw PJ, Jordan EG.** The nucleolus.
Annu Rev Cell Dev Biol. **1995**;11:93-121.
- Shpakovski GV, Acker J, Wintzerith M, Lacroix JF, Thuriaux P, Vigneron M.** Four subunits that are shared by the three classes of RNA polymerase are functionally interchangeable between *Homo sapiens* and *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol Cell Biol. **1995** Sep;15(9):4702-10.
- Simard R, Langelier Y, Rosemonde M, Maestracci N, Royal A.** Inhibitors as tools in elucidating the structure and function of the nucleus.
In: *The cell nucleus*, ed. Busch H., **1974**; Vol. 3: 447-487. *Academic Press*, New York.
- Sirri V, Roussel P, Hernandez-Verdun D.** In vivo release of mitotic silencing of ribosomal gene transcription does not give rise to precursor ribosomal RNA processing.
J Cell Biol. **2000** Jan 24;148(2):259-70.
- Snaar S, Wiesmeijer K, Jochemsen AG, Tanke HJ, Dirks RW.** Mutational analysis of fibrillarin and its mobility in living human cells.
J Cell Biol. **2000** Oct 30;151(3):653-62.
- Sollner-Webb B, Tyc K, Steitz J.** Ribosomal RNA processing in eukaryotes.
In: *Ribosomal RNA: Structure, evolution, processing and function in protein synthesis*, ed. Zimmermann R. und Dahlberg A., **1996**: 469-490. *CRC Press*.
- Stevens B.** The fine structure of the nucleolus during mitosis in the grasshopper neuroblast cell.
J Cell Biol. **1965**; 24: 349-368.
- Straight AF, Shou W, Dowd GJ, Turck CW, Deshaies RJ, Johnson AD, Moazed D.** Net1, a Sir2-associated nucleolar protein required for rDNA silencing and nucleolar integrity.
Cell. **1999** Apr 16;97(2):245-56.
- Szebeni A, Olson MO.** Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities.
Protein Sci. **1999** Apr;8(4):905-12.
- Thiry M, Cheutin T, O'Donohue MF, Kaplan H, Ploton D.** Dynamics and three-dimensional localization of ribosomal RNA within the nucleolus.
RNA. **2000** Dec;6(12):1750-61.
- Thomas JO, Kornberg RD.** An octamer of histones in chromatin and free in solution.
Proc Natl Acad Sci U S A. **1975** Jul;72(7):2626-30.
- Todorov IT, Noll F, Hadjiolov AA.** The sequential addition of ribosomal proteins during the formation of the small ribosomal subunit in Friend erythroleukemia cells.
Eur J Biochem. **1983** Mar 15;131(2):271-5.
- Tollervey D, Kiss T.** Function and synthesis of small nucleolar RNAs.
Curr Opin Cell Biol. **1997** Jun;9(3):337-42.
- Tollervey D, Lehtonen H, Jansen R, Kern H, Hurt EC.** Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly.
Cell. **1993** Feb 12;72(3):443-57.

- Towbin H, Staehelin T, Gordon J.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.
Proc Natl Acad Sci U S A. **1979** Sep;76(9):4350-4.
- Traub P, Bauer C, Hartig R, Grub S, Stahl J.** Colocalization of single ribosomes with intermediate filaments in puromycin-treated and serum-starved mouse embryo fibroblasts.
Biol Cell. **1998** Jul;90(4):319-37.
- Traub P, Shoeman RL.** Intermediate filament and related proteins: potential activators of nucleosomes during transcription initiation and elongation?
Bioessays. **1994** May;16(5):349-55.
- Traub P, Shoeman RL.** Intermediate filament proteins: cytoskeletal elements with gene-regulatory function?
Int Rev Cytol. **1994**;154:1-103.
- Tsien RY.** The green fluorescent protein.
Annu Rev Biochem. **1998**;67:509-44.
- Venema J, Tollervey D.** Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*.
Annu Rev Genet. **1999**;33:261-311.
- Verheggen C, Almouzni G, Hernandez-Verdun D.** The ribosomal RNA processing machinery is recruited to the nucleolar domain before RNA polymerase I during *Xenopus laevis* development.
J Cell Biol. **2000** Apr 17;149(2):293-306.
- von Overbeck J, Stahli C, Gudat F, Carmann H, Lautenschlager C, Durmuller U, Takacs B, Miggiano V, Staehelin T, Heitz PU.** Immunohistochemical characterization of an anti-epithelial monoclonal antibody (mAB lu-5).
Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol. **1985**;407(1):1-12.
- Wang H, Boisvert D, Kim KK, Kim R, Kim SH.** Crystal structure of a fibrillar homolog from *Methanococcus jannaschii*, a hyperthermophile, at 1.6 Å resolution.
EMBO J. **2000** Feb 1;19(3):317-23.
- Wansink DG, Schul W, van der Kraan I, van Steensel B, van Driel R, de Jong L.** Fluorescent labeling of nascent RNA reveals transcription by RNA polymerase II in domains scattered throughout the nucleus.
J Cell Biol. **1993** Jul;122(2):283-93.
- Ward WS, Schmidt WN, Schmidt CA, Hnilica LS.** Association of cyokeratin p39 with DNA in intact Novikoff hepatoma cells.
Proc Natl Acad Sci USA. **1984**; 81:419-423.
- Weinstein LB, Steitz JA.** Guided tours: from precursor snoRNA to functional snoRNP.
Curr Opin Cell Biol. **1999** Jun;11(3):378-84.
- Weisenberger D, Scheer U.** A possible mechanism for the inhibition of ribosomal RNA gene transcription during mitosis.
J Cell Biol. **1995** May;129(3):561-75.
- Wente SR.** Gatekeepers of the nucleus.
Science. **2000** May 26;288(5470):1374-7.
- White J, Stelzer E.** Photobleaching GFP reveals dynamics inside live cells.
Trends Cell Biol. **1999** Feb;9:61-65.
- Wozniak RW, Rout MP, Aitchison JD.** Karyopherins and kissing cousins.
Trends Cell Biol. **1998** May;8(5):184-8.
- Wu KC, Bryan JT, Morasso MI, Jang SI, Lee JH, Yang JM, Marekov LN, Parry DA, Steinert PM.** Coiled-coil trigger motifs in the 1B and 2B rod domain segments are required for the stability of keratin intermediate filaments.
Mol Biol Cell. **2000** Oct;11(10):3539-58.

- Xue Z, Mèlèse T.** Nucleolar proteins that bind NLSs: a role in nuclear import or ribosome biogenesis.
Trends Cell Biol. **1994**; 4: 414-417.
- Yanagida M, Shimamoto A, Nishikawa K, Furuichi Y, Isobe T, Takahashi N.** Isolation and proteomic characterization of the major proteins of the nucleolin-binding ribonucleoprotein complexes.
Proteomics. **2001** 1: 1390-1404.
- Yang J, Bardes ES, Moore JD, Brennan J, Powers MA, Kornbluth S.** Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1.
Genes Dev. **1998** Jul 15;12(14):2131-43.
- Yeh LC, Lee JC.** Yeast ribosomal proteins L4, L17, L20, and L25 exhibit different binding characteristics for the yeast 35S precursor rRNA.
Biochim Biophys Acta. **1998** Nov 26;1443(1-2):139-48.
- Zatsepina OV, Voit R, Grummt I, Spring H, Semenov MV, Trendelenburg MF.** The RNA polymerase I-specific transcription initiation factor UBF is associated with transcriptionally active and inactive ribosomal genes.
Chromosoma. **1993** Nov;102(9):599-611.
- Zirwes RF, Kouzmenko AP, Peters JM, Franke WW, Schmidt-Zachmann MS.** Topogenesis of a nucleolar protein: determination of molecular segments directing nucleolar association.
Mol Biol Cell. **1997** Feb;8(2):231-48.

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: 3D-Modell des Nukleolus und Schema der Ribosomenbiogenese.....	1
Abb. 1.2: Struktur des Nukleolus	2
Abb. 1.3: Schema der rDNA-Gene und Transkription.....	2
Abb. 1.4: Miller Spreitung eines transkriptionell aktiven rRNA-Gens.....	3
Abb. 1.5: Modell des Exports der 60S Untereinheiten aus dem Zellkern bei Hefe	7
Abb. 1.6: Prinzip von FRAP und FLIP	11
Abb. 1.7: P52-Immunlokalisationen mit mAb56	14
Abb. 1.8: Kolokalisation von p52 mit mAb56 und Peptid-Antikörper	14
Abb. 1.9: Spezifität der Peptid-Antikörper.....	15
Abb. 2.1: pCR [®] 2.1-TOPO [™]	19
Abb. 2.2: pGEX-5X.....	20
Abb. 2.3: pQE30.....	20
Abb. 2.4: pcDNA3	21
Abb. 2.5: pEGFP und pDsRed.....	21
Abb. 3.1: Ableitung der degenerierten Primer für die RT-PCR.....	30
Abb. 3.2: Prinzip des RACE.....	32
Abb. 3.3: DNA-Elektrophorese im Agarosegel.....	33
Abb. 3.4: Prinzip des TOPO TA Cloning [®] Kits.....	35
Abb. 3.5: Schnelle Bestimmung der Insert-Orientierung.....	36
Abb. 5.1: <i>In vivo</i> Expression von GFP-pol I	60
Abb. 5.2: <i>In vivo</i> Expression von GFP-pol I	62
Abb. 5.3: Kolokalisation von GFP-pol I und endogenem pol I.....	63
Abb. 5.4: Kolokalisation von mRPA194 und mRPA53	64
Abb. 5.6: Kolokalisation von mRPA53 und hRPA53	65
Abb. 5.5: Sequenzvergleich zwischen hRPA53 und mRPA53	65
Abb. 5.7: Pol I-Assoziation mit NORs	66
Abb. 5.8: FRAP-Schema	68
Abb. 5.9: FRAP von B23 und Fibrillarin	68
Abb. 5.10: FRAP-Analyse von pol I	70
Abb. 5.11: <i>In vivo</i> Expression von RFP-Fibrillarin während der Mitose.....	71
Abb. 5.12: Koexpression von pol I und Fibrillarin in kompakten Nukleoli.....	72
Abb. 5.13: Koexpression von pol I und Fibrillarin in Nukleoli mit mehreren FCs.....	73
Abb. 5.14: Koexpression von Fibrillarin und B23	74
Abb. 5.15: Koexpression von Fibrillarin und L5.....	75
Abb. 5.16: Fibrillarin und L5 während der Mitose.....	76
Abb. 5.17: Expression von GFP-L4	76
Abb. 5.18: Sequenzvergleich von L10 aus Mensch, Xenopus und Hefe	77
Abb. 5.19: <i>In vivo</i> Expression von GFP-L10	78
Abb. 5.20: Verteilung von L10 in fixierten Zellen.....	79
Abb. 5.21: Der Antikörper C17 erkennt das ribosomale Protein L10 von Xenopus (A6) und Säugerzellen (Hep2) im Western Blot.....	79
Abb. 5.22: Vergleich zwischen GFP-L10 Lokalisation und Immunlokalisation	80
Abb. 5.23: Inhibition des Zellkern Exports von GFP-L10 durch Leptomycin B.....	81
Abb. 5.24: Schematische Darstellung der Cytokeratinstruktur	82
Abb. 5.25: Vergleich der Aminosäuresequenzen von xCK19/1-3	83
Abb. 5.26: Nukleotidsequenz von xCK19/1.....	84

Abb. 5.27: Nukleotidsequenz von xCK19/2.....	86
Abb. 5.28: Nukleotidsequenz von xCK19/3.....	87
Abb. 5.29: Vergleich von xCK19/1-3 mit Cytokeratin 19 verschiedener Spezies.....	88
Abb. 5.30: <i>In vitro</i> Expression von xCK19.....	89
Abb. 5.31: Expression von GFP-xCK19 in lebenden Zellen.....	90
Abb. 5.32: Expression von GFP-xCK19 und Immunfluoreszenz mit mAb56.....	91
Abb. 5.33: Expression von GFP-xCK19 und Immunfluoreszenz mit einem Cytokeratin-Antikörper.....	92
Abb. 5.34: Aggregatbildung von GFP-xCK19.....	92
Abb. 5.35: Expression von NLS-GFP-xCK19 in A6-Zellen.....	93
Abb. 5.36: Doppeltransfektionen von A6-Zellen mit CK19 und B23.....	96
Abb. 5.37: Kotransfektionen von A6-Zellen mit RFP-Fibrillarin und GFP-xCK19.....	98
Abb. 5.38: Kotransfektion von A6-Zellen mit GFP-xCK19 und RFP-RPA53 und RFP-L10.....	99
Abb. 5.39: Expression von His-xCK19/1 in <i>E. Coli</i>	99
Abb. 5.40: Immunblots von GST-xCK19.....	100
Abb. 5.41: 2D-Western Blots mit p52-Antikörpern.....	101
Abb. 5.42: Vergleich der experimentell bestimmten und errechneten Verteilung der xCK19-Isoformen im 2D-Gel.....	101
Abb. 5.43: p52 im Kern von <i>Xenopus</i> Oocyten.....	103
Abb. 6.1: Schematische Darstellung der FRAP Ergebnisse für pol I.....	105
Abb. 6.2: Die Struktur des Nukleolus im 3D-Modell.....	108

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Timothy Krüger
 Geburtsdatum: 9.3.69
 Geburtsort: Hannover
 Familienstand: ledig
 Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Bildung:

1974-1976		Grundschule, Westoning, England
1976-1979		Grundschule, Remagen
1979-1980		Staatliches Rhein Gymnasium, Sinzig
1980-1985		Wöhlergymnasium, Frankfurt am Main
1985-1986		Gymnasium, Deutsche Schule, Washington DC, USA
1986-1988		Wöhlergymnasium, Frankfurt am Main
1988	Abitur	Wöhlergymnasium, Frankfurt am Main

Angaben zum Studium:

1988-1991		Grundstudium Physik (Diplom), Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg
1991-1994		Grundstudium Biologie (Diplom), Bayerische Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
1994	Vordiplomsprüfung	
1994-1997		Hauptstudium der Biologie (Diplom), Bayerische Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
1997	Diplomprüfung in den Fächern:	Zell- und Entwicklungsbiologie, Biochemie und Genetik
1997-1998	Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Thema	„Charakterisierung eines neuen nukleolären Proteins“
seit April 1998	Promotionsstudium am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie im Theodor-Boveri-Institut (Biozentrum) der Universität Würzburg. Anfertigung der Dissertation mit dem Thema „Zur funktionellen Architektur des Nukleolus in lebenden Zellen: Untersuchungen der Dynamik nukleolärer Proteine“.	
seit April 1998	wissenschaftlicher Mitarbeiter am gleichen Lehrstuhl.	

Würzburg, den 22.08.2002

Timothy Krüger

Erklärung:

Die vorliegende Arbeit wurde selbständig und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt,

Würzburg, 22.08.02

Timothy Krüger