

# **Untersuchungen zur Expression und subzellulären Lokalisation von Isoformen des Adaptorproteins Kanadaptin**

Dissertation

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

vorgelegt von

**Chris Bahr**

aus

Hamburg

Würzburg, 2003

Eingereicht am :

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. R. Hedrich

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. G. Krohne

Gutachter: Prof. Dr. med. D. Drenckhahn

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>6</b>
<b>2.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>9</b>
2.1	Kanadaptin – Lokalisation und Funktion.....	9
2.2	Die Multidomänenstruktur von Kanadaptin.....	9
2.3	Kanadaptin – ein Kernprotein?.....	11
2.4	Der Proteintransport durch den Kernporenkomplex.....	12
2.4.1	Der Zellkern.....	12
2.4.2	Der Kernporenkomplex.....	12
2.4.3	Die Kernlokalisationssequenzen (NLS).....	13
2.4.4	Die Transportrezeptoren.....	13
2.4.5	Importin und das RanGTPase-System.....	15
2.5	Die mögliche Funktion von Kanadaptin.....	16
2.6	Die Isoformen von Kanadaptin.....	16
2.7	Die Fragestellungen der Arbeit.....	17
<b>3.</b>	<b>Materialien und Methoden.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1</b>	<b>Materialien.....</b>	<b>19</b>
3.1.1	Geräte.....	19
3.1.2	Chemikalien.....	19
3.1.3	Stammlösungen.....	20
3.1.4	Gebrauchsfertige Systeme.....	20
3.1.5	Enzyme und Lysate.....	20
3.1.6	Häufig verwendete Puffer und Lösungen.....	20
3.1.7	Molekulargewichtsstandards für Nukleinsäuren.....	21
3.1.8	Molekulargewichtsstandards für Proteine.....	21
3.1.9	Sterilisierung von Lösungen und Glasmaterialien.....	21
3.1.10	Bakterienstämme.....	21
3.1.11	Zelllinien.....	22
3.1.12	Nährmedien für die Bakterienkultur.....	22
3.1.13	Nährmedien für die Zellkultur.....	22
3.1.14	Arbeiten mit RNA.....	22
3.1.15	Plasmide und Oligonukleotide.....	23
3.1.15.1	Vektoren.....	23
3.1.16	Oligonukleotide.....	24
3.1.16.1	cDNA-spezifische Oligonukleotide für humanes Kanadaptin.....	24
3.1.17	Antikörper.....	25
3.1.17.1	Erstantikörper.....	25
3.1.17.2	Zweitantikörper.....	25
<b>3.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>26</b>
3.2.1	Zellkultur.....	26
3.2.1.1	Kultivierung von Säugetierzelllinien.....	26
3.2.2	Kryokonservierung von Zellen.....	26
3.2.2.1	Einfrieren der Zellen.....	26
3.2.2.2	Auftauen der Zellen.....	27
3.2.3	Transiente Transfektion von Zellen.....	27

3.2.4	Bakterienkulturen.....	27
3.2.4.1	Plattenkulturen von Bakterien.....	27
3.2.4.2	Flüssigkulturen von Bakterien.....	27
3.2.4.3	Isolierung von Bakterien-Einzelkolonien.....	27
3.2.5	Herstellung von embryonalen Extrakten der Maus.....	27
3.2.6	Herstellung von Mitochondrien-Extrakten.....	28
3.2.7	Isolierung von Enterozyten.....	28
3.2.8	Isolierung von Nukleinsäuren.....	28
3.2.8.1	RNA-Isolierung aus Zellen mit RNazol B™ oder RNAPure™.....	28
3.2.8.2	RNA-Isolierung aus Geweben mit RNazol B™ oder RNAPure™.....	29
3.2.8.3	Präparative Isolierung von Plasmid-DNA mit dem Qiagen-Aufreinigungssystem.....	29
3.2.8.4	Präparative Plasmid-Isolierung (Plasmidschnellanalyse).....	29
3.2.8.5	Plasmid-Maxipräparation.....	29
3.2.9	Methoden der DNA-Präzipitierung.....	30
3.2.9.1	Ethanol-Fällung.....	30
3.2.9.2	Isopropanol-Fällung.....	30
3.2.10	Auftrennung von Nukleinsäuren und Proteinen.....	30
3.2.10.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	30
3.2.10.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	31
3.2.11	Gel-Elution von DNA.....	32
3.2.11.1	Elution von DNA durch Membranfilter.....	32
3.2.11.2	Elution von DNA mittels Ultrafiltration.....	32
3.2.12	Spektralphotometrische Messungen und Berechnungen.....	32
3.2.13	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	32
3.2.13.1	Amplifizierung von DNA.....	33
3.2.13.2	Amplifizierung revers-transkribierter RNA (RT-PCR).....	33
3.2.13.3	Plasmid-PCR.....	34
3.2.13.4	Linker-PCR.....	34
3.2.13.5	Asymmetrische Amplifizierung von Amplifikaten.....	35
3.2.13.6	Kombinierte Linker-PCR (Gesamtlängen-Amplifizierung).....	35
3.2.14	Restriktion.....	36
3.2.15	Dephosphorylierung von DNA.....	36
3.2.16	Ligation von DNA-Fragmenten.....	36
3.2.16.1	Ligation von PCR-Amplifikaten in den T-Vektor.....	37
3.2.16.2	Religation linearisierter Plasmid-DNA.....	37
3.2.17	Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Zellen.....	37
3.2.17.1	Herstellung PEG-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	37
3.2.17.2	Hitzeschocktransformation.....	37
3.2.17.3	Präparation elektrokompetenter Zellen.....	37
3.2.17.4	Elektroporation.....	38
3.2.18	Herstellung von Bakterien-Dauerkulturen.....	38
3.2.19	Sichtbarmachung und Dokumentation von Nukleinsäuren und Proteinen..	39
3.2.19.1	Sichtbarmachung von Nukleinsäuren.....	39
3.2.19.2	Proteinfärbung mit Coomassie-Blau.....	39
3.2.20	Immunfluoreszenz-Untersuchungen an Geweben und kultivierten Zellen..	39
3.2.21	Vitalfärbung von Mitochondrien mit dem CMX MitoTracker.....	40
3.2.22	Immunfluoreszenz mit dem Hoechst-Kernfarbstoff.....	40
3.2.23	Immunelektronenmikroskopie.....	40
3.2.24	Western-Blot.....	41
3.2.25	Proteinexpression durch IPTG-Induktion und Proteinaufreinigung.....	41
3.2.25.1	Proteinexpression durch IPTG- und M13/T7 Phagen-Induktion.....	42

3.2.26	Ultrafiltration von nukleinsäurehaltiger Lösung.....	43
3.2.27	Detektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen mit Hilfe der ECL-Färbung.....	43
3.2.28	Proteinbestimmungen.....	43
3.2.28.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit Amidoschwarz.....	43
3.2.28.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit dem Bradford-Reagenz.....	44
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>45</b>
4.1	Untersuchungen zur Expression von Kanadaptin mittels Western-Blot-Analysen und RT-PCR.....	45
4.2	Immunlokalisation von Kanadaptin in Semidünnschnitten und fixierten kultivierten Zellen.....	46
4.3	Subzelluläre Fraktionierung von Extrakten kultivierter Zellen.....	51
4.4	Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen.....	51
4.5	Klonierung von humanem Kanadaptin aus NT2-Zellen.....	52
4.6	Die Multidomänenstruktur von humanem Kanadaptin.....	54
4.7	Die Forkhead-Assoziations-Domäne von humanem Kanadaptin.....	55
4.8	Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von humanem Kanadaptin in verschiedenen Zelllinien.....	56
4.9	Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von FHA-Domäne-enthaltenden Fusionsproteinen.....	58
4.10	Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von NLS-mutierten humanen Kanadaptin-Fusionsproteinen.....	61
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>65</b>
5.1	Untersuchungen zum Kanadaptin der Maus.....	65
5.2	Untersuchungen zum Kanadaptin des Menschen.....	66
5.3	Mögliche Funktionen der Kanadaptin-Isoformen.....	69
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>71</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>81</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>82</b>

# 1. Zusammenfassung

Auf der Suche nach Bindeproteinen des renalen  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  Anionenaustauschers 1 (renAE1) wurde 1998 von Chen et al. in der Maus das Protein Kanadaptin entdeckt. Immunzytochemisch ließ sich Kanadaptin in der Niere des Kaninchens nur im Zytoplasma des Sammelrohrepithels nachgewiesen. In renAE1-exprimierenden, säuresezernierenden Schaltzellen (A-Schaltzellen) beobachtete man eine zusätzlich vesikuläre Immunfluoreszenz. Eine Immunfluoreszenz der basolateralen Membran, wie sie für renAE1 typisch ist, wurde nicht entdeckt. Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei den granulären Strukturen um renAE1-positive Vesikel handelte, wurde von Chen et al. postuliert, dass Kanadaptin am Transport von renAE1 zur basolateralen Plasmamembran säuresezernierender Schaltzellen beteiligt ist. Kanadaptin wurde wenige Jahre später in nicht renAE1-exprimierenden, kultivierten Zellen auch im Zellkern detektiert. Die nukleäre Translokation erfolgte abhängig von Importin  $\alpha/\beta$  und von einer aminoterminalen Kernlokalisationssequenz (NLS).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Kanadaptin detailliert untersucht. In allen uns zur Verfügung stehenden humanen Zelllinien (z. B. U-373, SW-480 und Hep-G2, A-431, MCF-7, PC-3) wurde Kanadaptin sowohl auf Protein- als auch auf Transkriptionsebene (RT-PCR) nachgewiesen. In Mäuseembryonen wurde Kanadaptin im Western-Blot erstmals am 9. Embryonaltag detektiert. An gefriergetrockneten Epon-Semidünnschnitten der Rattenniere wurde bei immunzytochemischen Untersuchungen überraschenderweise eine besonders starke Immunreaktivität in epithelialen Zellen des proximalen Tubulus gefunden, nicht aber im Sammelrohrepithel, einschließlich der renAE1-exprimierenden A-Schaltzellen. In allen Kanadaptin-positiven Zellen war die Immunfluoreszenz von granulärer Struktur. Eine nukleäre Immunreaktion, wie sie für kultivierte Zellen beschrieben wurde, ließ sich nicht beobachten. Mit Hilfe eines gegen die Cytochromoxidase Untereinheit I gerichteten Antikörpers konnten die granulären Strukturen als Mitochondrien identifiziert werden. Durch Änderung der Fixierungs- und Permeabilisierungsbedingungen konnte in kultivierten Zellen neben der nukleären Lokalisation Kanadaptin immunzytochemisch auch in Mitochondrien nachgewiesen werden. Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten schließlich, dass Kanadaptin in Mitochondrien lokalisiert. Auch in Mitochondrien kultivierter Zellen und im Darmepithel der Ratte wurde Kanadaptin biochemisch nachgewiesen.

Neben dem in verschiedenen Geweben/Zellen der Ratte und des Menschen detektierten Kanadaptin mit einem Molekulargewicht von 57 kD wurde aus retinsäure-behandelten menschlichen teratokarzinomen Hodenzellen (NT2/D1 Zellen) eine neue 89 kD-Isoform von Kanadaptin isoliert. Beide Kanadaptin-Isoformen sind stark homolog zueinander und besitzen eine fast identische Domänenstruktur. Gegenüber dem Kanadaptin der Maus enthält die menschliche Isoform jedoch eine aminoterminal Extension von 264 Aminosäuren sowie eine 25 Aminosäuren umfassende karboxyterminale Insertion. Innerhalb der aminoterminalen Extension konnte eine Gabelkopfdomäne (FHA-Domäne) identifiziert werden. FHA-Domänen sind phosphorylierungsabhängige Protein-Protein-Bindedomänen und finden sich hauptsächlich in nukleären Proteinen. Basierend auf diesen Erkenntnissen, lag der Fokus im zweiten Teil der Arbeit auf Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von humanem Kanadaptin, mit besonderer Berücksichtigung des FHA-Domänen-enthaltenen Aminoterminus. Hierzu wurde die humane Kanadaptin-cDNA aus retinsäurebehandelten NT2/D1-Zellen mit Hilfe der RT-PCR kloniert und in eukaryontische Expressionsvektoren inseriert. Subzelluläre Lokalisationsuntersuchungen an transient transfektierten Zellen ergaben, dass die menschliche Isoform im Zellkern lokalisiert. Weitere Lokalisationsstudien zeigten, dass die nukleäre Akkumulation der Kanadaptin-Isoformen durch unterschiedliche NLSs reguliert wird. So

zeigten frühere Untersuchungen, dass die Translokation vom Kanadaptin der Maus fast vollständig von der aminoterminalen NLS1 abhängig ist (Hübner et al., 2002). Im Gegensatz dazu war die nukleäre Lokalisation der humanen Kanadaptin-Isoform NLS1 unabhängig. Den größten Einfluß zeigte die karboxyterminale NLS2. Ein Grund dafür ist möglicherweise eine zusätzliche karboxyterminale Insertion, die die humane Kanadaptinisoform gegenüber dem Kanadaptin der Maus besitzt. Diese könnte dazu führen, dass die karboxyterminale NLS2 für die Kerntranslokationsmaschinerie besser zugänglich ist. Die Untersuchungen zeigten darüber hinaus, dass der FHA-Domäne enthaltene Aminoterminus möglicherweise an nukleäre Strukturen bindet.

**Schlagworte:**

Kanadaptin, renAE1, Retinsäure, teratokarzinome Zellen, FHA-Domäne

## 1. Summary

Mouse kanadaptin (mKan) has recently been identified as a cytoplasmic adaptor protein reported to bind to the kidney  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  anion exchanger 1 (kAE1). Interestingly, mKan was found in the nucleus of cultured cells. Nuclear translocation of mKan depends on a nuclear localization signal (NLS) and is mediated by members of the importin family. In this study we have shown by Western-blot analysis and RT-PCR that kanadaptin is expressed in all cultured cells tested (e. g. U-373, SW-480 and Hep-G2, A-431, MCF-7, PC-3). Expression of kanadaptin was also detected by Western-blot analysis early in embryonic development. In the kidney of the rat the most intense immunofluorescence for kanadaptin was found in cells of the proximal tubule. Immunostaining revealed strong signals for kanadaptin in association with mitochondria. However, nuclear staining, as it has been described for cultured cells, was not observed. In order to reveal mitochondrial localization of kanadaptin in cultured cells, the protocol for permeabilization was changed. Dependent on the type of the protocol used for fixation/permeabilization of cultured cells kanadaptin was found either in nuclei or in mitochondria. That kanadaptin is not simply attached to the mitochondrial surface was demonstrated by immunoelectron microscopy, which showed intra-mitochondrial localization of kanadaptin. Apart from the immunocytochemical studies, mitochondrial localization of kanadaptin was additionally demonstrated by immunoblotting of mitochondrial fractions obtained from cultured cells and epithelial cells of rat intestine.

Recently, a new 85 kD isoform of mKan was isolated from retinoic acid (RA) treated human teratocarcinoma cells (NT2/D1 cells). HumKan and mKan display a conserved domain structure. Additionally, humKan contains an amino-terminal extension of 264 amino acids. This extension harbours a forkhead associated (FHA) domain. FHA domains are diverse protein-protein interaction modules known to be involved in nuclear signalling and DNA binding. This prompted us to isolate the cDNA encoding humKan from RA-induced NT2/D1 cells by RT-PCR and to assess its subcellular distribution in cultured cells, using full-length humKan with or without green fluorescent protein (GFP) as a fusion tag, as well as truncation derivatives thereof.

We found full-length humKan with and without GFP-tag to be exclusively nuclear. Additionally, the studies revealed, that nuclear accumulation of humKan differs from that of mKan. While nuclear accumulation of mKan is dependent on the aminoterminal NLS, NLS1, nuclear translocation of humKan seems to occur through the carboxy-terminal NLS, NLS2. Beside the amino-terminal extension, humKan additionally contains a carboxy-terminal insertion of 25 amino acids near NLS2, which could possibly account for the differences of NLS-dependent nuclear translocation of humKan vs. mKan. The subcellular localization studies also revealed that the FHA-Domain containing amino-terminus of humKan may contain a nuclear retention sequence.

### **Keywords:**

kanadaptin, kAE1, retinoic acid, teratocarcinoma cells, FHA domain



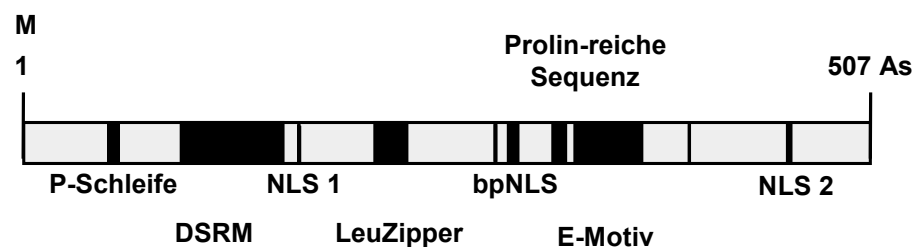
## 2. Einleitung

### 2.1 Kanadaptin – Lokalisation und Funktion

Kanadaptin (Kidney Anion Exchanger Adaptor Protein) wurde im Hefe Zwei-Hybrid-System als 57 kD-Bindeprotein des renalen  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  Anionenaustauschers 1, renAE1, entdeckt (Chen et al., 1998). Immunzytochemische Untersuchungen an der Kaninchenniere, mit einem gegen das komplette Kanadaptin der Maus gerichteten polyklonalen Antikörper, ergaben eine zytoplasmatische Immunreaktivität in allen Epithelzellen des Sammelrohrs (Chen et al., 1998). In renAE1-exprimierenden Schaltzellen (A-Schaltzellen) zeigte sich zusätzlich, dass Kanadaptin nicht mit renAE1 entlang der basolateralen Plasmamembran, sondern vielmehr mit renAE1-immunreaktiven, zytoplasmatischen vesikulären Strukturen assoziiert. RenAE1 ist für den Ausstrom von Bikarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) durch die basolaterale Plasmamembran verantwortlich (Drenckhahn et al., 1985). In den Schaltzellen akkumuliert Bikarbonat äquivalent zur Menge der an der apikalen Zellmembran in den Harn sezernierten  $\text{H}^+$ -Ionen. Das basolateral lokalisierte renAE1-Protein ermöglicht den Ausstrom von  $\text{HCO}_3^-$  im Austausch gegen  $\text{Cl}^-$ . Für die basolaterale Positionierung von renAE1 werden Adaptormoleküle angenommen, die den polaren Einbau von renAE1 regulieren und renAE1 im Zytoskelett verankern. Kanadaptin wurde als ein solches Adaptormolekül angesehen. Es wurde vermutet, dass Kanadaptin eine Rolle als Adaptorprotein beim Transport von renAE1-Vesikeln zur basolateralen Zelloberfläche spielt. Vielleicht ist Kanadaptin Teil einer Signaltransduktion, die für den zielgerichteten Transport von renAE1-Vesikeln wichtig ist. Außer in der Niere konnten Kanadaptin-Transkripte auch in Lunge, Leber, Gehirn, Hoden und Herz gefunden werden (Chen et al., 1998).

### 2.2 Die Multidomänenstruktur von Kanadaptin

Untersuchungen der Aminosäuresequenz (Abb.1) ergaben, dass Kanadaptin der Maus ein Multidomänenprotein ist (Hübner et al., 2002):



**Abb.1: Das Multidomänenprotein Kanadaptin und seine Domänen.**

M: Methionin, P-Schleife: ATP/GTP-Bindemotiv, DSRM: Doppelstrang-RNA-Bindemotiv, NLS: Kernlokalisationssequenz, LeuZipper: Leucinzipper-Domäne, bpNLS: bipartiale Kernlokalisationssequenz, E-Motiv: glutaminsäurereiches Motiv, prolinreiche SH3-Domäne (siehe Text).

Kanadaptin hat ein putatives ATP/GTP-Bindemotiv (P-Schleife; <sup>56</sup>ANTTEGKS), wie es auch in der großen Familie der GTP-Bindeproteine wie Ras, Rho, Rab, Ybt1 oder Sec4 (Fry et al., 1987; Dever et al., 1987; Saraste et al., 1990) zu finden ist. Außerdem konnte ein Doppelstrang-RNA-Bindemotiv (DSRM; Aminosäuren 108-177) nahe des Aminoterminus identifiziert werden. Die Stauken-Proteine, die bei *Drosophila*-Larven für die Ausbildung der Dorsoventralachse (Polung) zuständig sind, weisen solche DSRM-

Sequenzen auf (St. Johnston et al., 1992). Typisch für Transkriptionsfaktoren ist die Leucinzipper-Domäne (<sup>244</sup>LND AERELAEISERLKASSKVL), die beispielsweise als Dimerisierungsmotiv in der Familie der Jun/AP1-Transkriptionsfaktoren (Landschulz et al., 1988; Busch und Sassone-Corsi, 1990) vorkommt. Über die glutaminsäurereiche Domäne (E-Motiv) ist nichts bekannt.

Darüber hinaus wurde noch eine prolinreiche, karboxyterminale Src Homologie 3 (SH3) Protein-Bindedomäne (<sup>365</sup>LPPKRPELPP) identifiziert. Solche Protein-Protein-Bindedomänen werden durch eine 'PXXP'-Koresequenz (X ist eine andere Aminosäure als Cystein) definiert. Viele Proteine der Signaltransduktion zeigen solche Proteinkinase-Bindungssequenzen (Cohen et al., 1995).

Die Kanadaptin-Sequenz enthält drei putative Kernlokalisationssequenzen (NLSs) (siehe auch 2.4.3). Zwei von ihnen [<sup>189</sup>RKRK (NLS1) und <sup>458</sup>PKKKKSP (NLS2)] ähneln der NLS des Simian Virus 40 großen Tumorantigens (T-ag; <sup>126</sup>PKKKRKV) (Kalderon et al., 1984; Kalderon et al., 1984; Lanford und Butel, 1984). Die dritte Kernlokalisationssequenz (<sup>325</sup>KKTELQTTNAENKTKKL) ähnelt der bipartialen Kernlokalisationssequenz (bpNLS) von Nukleoplasmin (Robbins et al., 1991). Die Kernlokalisationssequenzen von Kanadaptin sind von potentiellen Phosphorylierungsstellen umgeben (z. B. Proteinkinase CK2, cAMP-abhängige Proteinkinase und Proteinkinase C). In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass Phosphorylierungen nahe der Kernlokalisationssequenz den NLS-abhängigen Kernproteinimport regulieren können (Jans, 1995; Jans und Hübner, 1996).

Nachfolgend wird die Kanadaptin-Sequenz näher aufgeführt.

GAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCCCGGGCAGGTGGCTGATCCTACCCCTCAGCTAGATGCGCCAGCTCCCCAGGAAGTCAGTAGCGG  
AGTTTAAGAAGCCGGTTTACCAGTGCCTTCCGCACTACGGGGTAAGGCTCCGCGCTCCAGTCCCTCCGTTTCTGAGGATGTGAAGA  
AAGAATGTCTCGCGGCGCAGCTGGACTCCTCCGTACCGAGAGCCATCGTGGGGCAGCCAGCCACGGCCCCCTACAGTCTCGAAACC  
CTGAAGGGTGGCACCATCCTTGGCACCCGCACCTTGAAAGACACGAGCTGCTGCTTTTCGGGAGACTTGCTAGTTGTGACATATGT  
CTGGAGCATCCTTCCGTGCTCTCGGTACCATGCTGTACTACAGCACCGGGGGCGGATCCCAGCGGAGACTCTGAGGGTCATGAGCAG  
GGCTTTTATCTCTACGATCTGGGAAGTACCCACGGCACGTTTCCTCAACAAACTCGCATCCCACCCCGCACTTACTGTAGAGTCCAC  
GTCGGGCATGTA

P-Schleife

DSRM-Domäne

atg cgc ttt gga ggc agc act cgg ctc ttt atc ctt cag gga cca gag gaa gac cga gag gca gaa  
M R F G G S T R L F I L Q G P E E D R E A E  
tct gaa tta aca gta aca cag ttg aag gaa ttg cgt aaa cag cag cag ata tta ttg gag aag aag  
S E L T V T Q L K E L R K Q Q Q I L L E K K  
atg tta ggt gaa gac tca gat gaa gaa gaa gaa gca aat acc act gaa ggg aag agc agt aga agt  
M L G E D S D E E E E A N T T E G K S S R S  
ggg caa gat gat gag ctg ggc tgc acg tgg gga atg gga gaa gat gct gtg gag gat gaa gct gaa  
G Q D D E L G C T W G M G E D A V E D E A E  
gag aac ccc att gcc tta gat ttt cag cag gac cgg gaa gcg ttt tat ata aag gat cca aag aag  
E N P I A L D F Q Q D R E A F Y I K D P K K  
gct ctt caa ggc ttc ttt gac cga gaa gga gaa gag tta gaa tat gaa ttt gat gag caa gga cac  
A L Q G F F D R E G E E L E Y E F D E Q G H  
agc act tgg ctc tgc agg gtg agg tta cct gta gat gat tca act ggg aaa cag ctg gtg gct gag  
S T W L C R V R L P V D D S T G K Q L V A E  
gcc att cac tca gga aag aaa aag gaa gca atg gta cag tgc tcg ctg gaa gcc tgc cgg gtc ctt  
A I H S G K K K E A M V Q C S L E A C R V L  
gat aca ctg ggc ttg cta cgg cag gaa gca gta tct cgg aaa agg aaa gcc aag aac tgg gaa gat  
D T L G L L R Q E A V S R K R K A K N W E D NLS1  
gag gat ttt tat gat agt gac gat gat aca ttc ctc gat cgg act ggc ctg gta gag aag aag cgc  
E D F Y D S D D D T F L D R T G L V E K K R  
ctg aac cgg atg aag aag gct ggg aag ctt gat gag aag cca gaa act ttt gag tca ctg gtt gca

Leuzipper	L	N	R	M	K	K	A	G	K	L	D	E	K	P	E	T	F	E	S	L	V	A
	aag	tta	aat	gat	gcc	gaa	agg	gaa	ctc	gcc	gaa	att	tct	gaa	agg	ctc	aag	gct	tca	agc	aaa	gtt
	K	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>R</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>I</u>	<u>S</u>	<u>E</u>	<u>R</u>	<u>L</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>V</u>
	ctg	tca	gag	cca	tca	tct	cag	gac	tct	tta	gat	gca	ttc	atg	tca	gaa	atg	aaa	tca	ggc	agc	aca
	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>E</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>Q</u>	<u>D</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>F</u>	<u>M</u>	<u>S</u>	<u>E</u>	<u>M</u>	<u>K</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>L</u>
	tta	gat	ggg	gtg	tcc	cgg	aag	aaa	ctt	cac	ctg	agg	act	ttt	gaa	cta	aga	aaa	gaa	caa	cag	cga
	R	T	F	E	L	R	K	E	Q	Q	T	L	D	G	V	S	R	K	K	L	H	R
	ctt	aaa	ggg	tta	ata	aaa	ctt	gta	aag	ccg	gca	gag	atc	cca	gaa	cta	aaa	aag	act	gaa	ctt	cag
	L	K	G	L	I	K	L	V	K	P	A	E	I	P	E	L	<u>K</u>	<u>K</u>	T	E	L	Q
	act	aca	aat	gca	gaa	aac	aaa	act	aag	aaa	ctt	gca	ttg	cct	ctc	ttt	ggg	gcc	atg	aaa	gga	gga
E-Motiv	T	T	N	A	E	N	<u>K</u>	<u>T</u>	<u>K</u>	<u>K</u>	L	A	L	P	L	F	G	A	M	K	G	G
	gga	agc	aaa	ttc	aaa	tta	aaa	act	ggg	aca	gta	ggg	aag	ttg	cca	ccc	aag	cgt	cca	gaa	ctc	cct
	G	S	K	F	K	L	K	T	G	T	V	G	K	<u>L</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>K</u>	<u>R</u>	<u>P</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>P</u>
	cca	gct	tta	atg	caa	atg	aag	gat	gaa	cct	gaa	gta	gag	gag	gag	gag	gaa	gag	gaa	gag	gag	gag
	<u>P</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>M</u>	<u>Q</u>	<u>M</u>	<u>K</u>	<u>D</u>	<u>E</u>	<u>P</u>	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>
	gag	gag	aaa	gtg	aag	gag	gag	cat	gaa	gaa	cga	gtg	gag	gat	gga	ggg	gtc	agg	ctt	ctt	cag	gag
	<u>E</u>	<u>E</u>	K	V	K	E	E	H	E	E	R	V	E	D	G	G	V	R	L	L	Q	E
	cct	gag	ctg	gag	ctg	gaa	gca	gca	gtg	gag	cac	ccg	agt	gct	ccc	tca	gag	ccc	tcg	tgc	tcc	aag
	P	E	L	E	L	E	A	A	V	E	H	P	S	A	P	S	E	P	S	C	S	K
	gag	act	aaa	agc	cat	gca	gca	cca	gcg	aat	gaa	tat	aaa	caa	gac	aga	gat	gag	ccg	aag	aaa	aag
NLS2	E	T	K	S	H	A	A	P	A	N	E	Y	K	Q	D	R	D	E	P	<u>K</u>	<u>K</u>	<u>K</u>
	aaa	tct	cct	ggg	cct	ggc	aaa	ttt	cca	ccc	atc	ctt	tct	tcc	aaa	tat	cgt	gag	gat	gac	cca	gac
	<u>K</u>	S	P	G	P	G	K	F	P	P	I	L	S	S	K	Y	R	E	D	D	P	D
	tac	tgt	ata	tgg	gtc	cca	cgt	gaa	ggg	caa	agt	gga	gat	ggc	aga	acc	cat	ctt	aat	gac	aag	tat
	Y	C	I	W	V	P	R	E	G	Q	S	G	D	G	R	T	H	L	N	D	K	Y
	ggc	tac	tga																			
	G	Y	Stop																			

TTGGCTCAGAGTCCCAAAGGAAGACCATGTGGACCGCAGGATGTTTGGGAGGAAACATCAAGTCATGGCCAGGAATCAGATGACCGT  
TTGTAAATCTGGTGACTGGCTCTTTCTTCTGTATCCCTGGTTTCCTATAACTCCCTGCCATTGGATTCTCCTCAATTTCCGTGTT  
TATATTTAAGTGTTGTGTATATATGTAAAAAAGAGCCATGTACACTAGAAATCAGTAAAGAGGCATGACCCATTATGTACAAAAA  
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

## 2.3 Kanadaptin – ein Kernprotein?

Hübner et al. (2002) konnten erstmals zeigen, dass das als renAE1-bindende Adaptorprotein identifizierte Multidomänenprotein Kanadaptin im Zellkern verschiedener nicht renAE1-exprimierender epithelialer und nicht-epithelialer Zelllinien akkumulieren kann. Diese Ergebnisse deuten somit auf eine zusätzliche, von renAE1-unabhängige nukleäre Funktion von Kanadaptin hin. Lokalisationsstudien von Hübner et al. (2002) mit unterschiedlichen GFP (Grün-Fluoreszierendes-Protein) markierten Kanadaptin-Fusionsproteinen in verschiedenen Zelllinien ergaben eine von Kanadaptin-NLS1 abhängige Translokation in den Zellkern. Hingegen scheinen die anderen NLS-Motive von Kanadaptin, bpNLS bzw. NLS2, nur eine untergeordnete Rolle bei der Kerntranslokation zu spielen. Durch ELISA-Bindungsversuche konnte gezeigt werden, dass NLS1-enthaltenes Fusionsprotein (Aminosäuren 1-231) mit hoher Affinität vom Importin  $\alpha/\beta$ -NLS-Rezeptorkomplex erkannt wird. Auch Proteintransportuntersuchungen an mechanisch permeabilisierten bzw. mikroinjizierten Hepatomazellen bestätigen die Abhängigkeit der Kernakkumulation des Fusionsproteins von Importin  $\alpha/\beta$ . Neben der NLS1 scheint eine Kernretentionssequenz innerhalb der Aminosäuren 140-230 zu liegen, da auch mit Detergenz behandelte, mechanisch perforierte Hepatomazellen eine bleibende Kernakkumulation des Fusionsproteins zeigen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das Kanadaptin der Maus als karyophiles Protein in der Lage ist NLS- und importinabhängig sowie durch Retention im Zellkern eukaryontischer Zellen zu akkumulieren (Hübner et al., 2002). Die Funktion von Kanadaptin im Zellkern bzw. in nicht-renAE1-exprimierenden Zellen ist jedoch noch aufzuklären.

Zum Verständnis molekularer Mechanismen durch die Kanadaptin spezifisch in den Zellkern transloziert wird, soll im Folgenden näher auf wesentliche Kenntnisse von Transportmechanismen in den Zellkern eingegangen werden.

## **2.4 Der Proteintransport durch den Kernporenkomplex**

### **2.4.1 Der Zellkern**

Im Gegensatz zu Prokaryonten besitzen Eukaryonten einen Zellkern. Dieses komplexe makromolekulare Zellkompartiment ist von einer Doppelmembran umschlossen. Im Zellkern finden Transkription und DNA-Replikation statt. Prozesse, die durch Proteine reguliert werden. Ebenfalls findet die Bildung der ribosomalen Untereinheiten im Zellkern (Nukleolus) statt. Andererseits werden alle Proteine des Zellkerns an Ribosomen des Zytoplasmas synthetisiert und müssen anschließend in den Zellkern importiert werden. Schließlich müssen RNA-Proteinkomplexe, t-RNAs und ribosomale Untereinheiten den Zellkern verlassen können, um im Zytoplasma die Translationsvorgänge steuern zu können.

Dieser Verkehr zwischen Zytoplasma und Zellkern (Import) und Zellkern und Zytoplasma (Export) erfordert kontrollierte Transportmechanismen. Sie erfolgen durch Poren der Kernhülle (Kernporen).

In höheren Eukaryonten bestehen die Kernporen aus 50-100 verschiedenen Proteinen (Fontoura et al., 1999), sogenannten Nukleoporinen (kurz Nups), die innerhalb des Kernporenkomplexes in unterschiedlicher Kopienzahl vorkommen. Diese Strukturproteine sind Interaktionsstellen für Transportfaktoren, die vorübergehend an den Kernporen binden (Görlich und Kutay, 1999).

### **2.4.2 Der Kernporenkomplex**

Der Proteintransport durch die Kernporen in den Zellkern erfolgt entweder durch Diffusion mit anschließender Akkumulation mittels Bindung an DNA bzw. Matrixkomponenten oder durch einen aktiven Signal- und Rezeptor-abhängigen Prozess, mittels spezifischer Proteinerkennung an Transportrezeptoren und die Interaktion mit Teilen der Kernporen.

Die Kernporen repräsentieren Kanäle, die eine Diffusion von kleinen Molekülen wie Ionen bzw. einen aktiven Transport von Makromolekülen (Proteine mit einem Molekulargewicht größer 40-60 kD und Nukleinsäuren) in bzw. aus dem Zellkern erlauben. Proteine mit einem Molekulargewicht kleiner 40-60 kD können ebenfalls ohne aktiven Transport durch den etwa 9 nm große Durchmesser der Kernpore gelangen (Feldherr et al., 1984). Vermutlich können sich die Kernporen auch um bis zu 25 nm öffnen, um größere Proteinkomplexe wie die ribosomalen Untereinheiten hindurch zu lassen (Goldberg und Allen, 1993).

Der aktive Kernproteinimport erfolgt durch einen rezeptorvermittelten Transportprozess. Dieser erfordert das Vorhandensein eines spezifischen Transportsystems, bestehend aus speziellen Signalsequenzen (Kernlokalisationssequenzen – siehe 2.4.3), Transportrezeptoren (siehe 2.4.4) und dem RanGTPase-System (siehe 2.4.5).

### 2.4.3 Die Kernlokalisationssequenzen (NLS)

Proteine, die durch rezeptorvermittelten Transport in den Zellkern gelangen, besitzen Signalsequenzen, die beim Import als Kernlokalisationssequenzen (NLSs) und beim Export als Kernexportsequenzen (NESs) bezeichnet werden.

Charakteristisch sind basische Lysin/Arginin-Gruppen bei Kernlokalisationssequenzen bzw. leucinreiche Motive bei Kernexportsequenzen. Eine klassische Kernlokalisationssequenz besitzt das bekannte Tumorantigen (T-ag) des Simian Virus 40 (SV40), das aus einem Heptapeptid mit der Sequenz PKKKRKV besteht (Kalderon et al., 1984; Lanford und Butel, 1984). Bei anderen Proteinen ist die Kernlokalisationssequenz zweigeteilt (bipartial). So besitzt Nukleoplasmin die Sequenz KRPAATKKAGQAKKKK, in dem zwei basische Gruppen durch eine variable Region von 10 Aminosäuren getrennt sind (Dingwall et al., 1982; Robbins et al., 1991). Ähnliche Motive finden sich in vielen Kernproteinen bzw. Transkriptionsfaktoren (Boulikas, 1994).

Manche Proteine besitzen Kernlokalisationssequenzen, die nicht mit basischen Aminosäuren angereichert sind. Hierzu zählen der Hefe-Transkriptionsrepressor Mat $\alpha$ 2 (Hall et al., 1990), der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor- $\kappa$ B, Nadler et al., 1997) und das Protooncogen c-myc (Markkerh et al., 1996). Auch dem Ribonukleoprotein hnRNP A1 (heterogenous nuclear Ribonucleoprotein A1, Michael et al., 1995; Pollard et al., 1996) fehlt eine T-ag-/Nukleoplasmin-typische Kernlokalisationssequenz. Sie besteht aus einem Abschnitt aus 38 Aminosäuren (M9-Domäne) und ist reich an Glyzin und aromatischen Aminosäuren (Michael et al., 1995). Auch für ribosomale Proteine sind Kernlokalisationssequenzen beschrieben worden, die zwar auch basisch sind, sich aber über weite Proteinbereiche erstrecken, und wesentlich komplexer zusammengesetzt sind als T-ag-/Nukleoplasmin-typische Kernlokalisationssequenzen (Rout et al., 1997; Jäkel und Görlich, 1998).

Das HIV-1-Rev-Protein (Fischer et al., 1995) ist für den Export viraler, intron-haltiger, ungespleißter RNA verantwortlich. Die Bindung erfolgt über ein innerhalb eines Introns der HIV-1-RNA liegendes RNA-Strukturmotiv (Rev Response Element - RRE) (Malim et al., 1989). Gleichzeitig enthält HIV-1-Rev eine leucinreiche Exportsequenz, die vom Exportrezeptor erkannt wird. Dieser Kernexportrezeptor heißt Crm1 (Fornerod et al., 1997) und in der Hefe Exportin1 (Stade et al., 1997).

Der aktive rezeptorvermittelte t-RNA-Export wird vermutlich durch direkte Bindung des t-RNA-Exportfaktors erreicht (Hellmuth et al., 1998; Kutay et al., 1998). Viele Proteine besitzen nicht nur eine, sondern mehrere Kernlokalisationssequenzen, die oft nur in ihrer Gesamtheit zu einer vollständigen nukleären Lokalisation führen (Mukaigawa et al., 1991). Darüber hinaus können Kernimport- und Exportsignale nebeneinander im gleichen Protein vorliegen (siehe M9-Domäne). So erkennen Importin  $\beta$  und Crm1p unabhängige Lokalisationssignale sowohl in Cyclin B1 (Moore, 1999) als auch in HIV-Rev (Truant und Cullen, 1999). Ein Import-Rezeptor kann auch verschiedene Bindungsstellen für ganz unterschiedliche Kernlokalisationssequenzen besitzen, so bindet Transportin sowohl die BIB- (Beta-like Import Receptor Binding), als auch die M9-Domäne (Claussen et al., 1999).

### 2.4.4 Die Transportrezeptoren

Importrezeptoren binden ihr Substrat auf der zytoplasmatischen Seite der Kernmembran und wandern schließlich in Folge Wechselwirkung mit Nukleoporinen durch den nukleären Porenkomplex. Auf der nukleären Seite kommt es RanGTP-abhängig zum Zerfall des Translokationskomplexes unter Freisetzung des

Importrezeptors und seinem Substrat. Importrezeptoren werden daran anschließend entweder RanGTP-abhängig oder wie im Falle des NLS-Rezeptors Importin  $\alpha$  mit Hilfe des CAS (Cellular Apoptosis Susceptibility Gene) zurück ins Zytoplasma exportiert (Kutay et al., 1997).

Exportrezeptoren binden auf der nukleären Seite der Kernmembran RanGTP-abhängig ihr Substrat und transduzieren schließlich durch den Kernporenkomplex auf die zytoplasmatische Seite. Hier kommt es durch GTP-Hydrolyse in Gegenwart des Ran-bindenden Proteins 1 (RanBP1), Ran-bindenden Proteins 2 (RanBP2/NUP358; Hauptbestandteil zytoplasmatischer Filamente des Kernporenkomplexes) und des Ran-spezifischen GTPase-aktivierenden Proteins (RanGAP) zur Freisetzung des Substrates von seinem Transportrezeptor.

Die ersten Transportrezeptoren wurden mittels der klassischen Kernlokalisationssequenzen des SV40-T-Antigens und des Nukleoplasmins entdeckt. Hierzu zählen der NLS-Rezeptor Importin  $\alpha$  und der eigentliche Transporter Importin  $\beta$  (Görlich et al., 1994; Görlich et al., 1995). Beide gehören zur großen Familie der Importine.

Die Vertreter der Importin  $\beta$ -Proteine haben neben einer Substrat-bindenden Domäne die Fähigkeit gemein, an Komponenten des Porenkomplexes zu binden. Zusätzlich besitzen sie ein aminoterminalen RanGTP-Bindemotiv, die Bindung von RanGTP an dieses Motiv spielt eine entscheidende Rolle für den Aufbau bzw. Zerfall des Translokationskomplexes. Der NLS-Rezeptor Importin  $\alpha$  ist für die Erkennung klassischer Lysin-/Arginin-reicher Kernlokalisationssequenzen verantwortlich und vermittelt als Adaptorprotein die Bindung zwischen Substrat und Importin  $\beta$ . Zusätzliche Komponenten der Translokationsmaschinerie sind neben der GTPase Ran der Kerntransportfaktor 2 (NTF2) sowie die asymmetrisch verteilten Proteine RanGAP (Ran-aktivierendes Protein des Zytoplasmas) und RCC1 (Regulator of Chromatin Condensation, im Zellkern, siehe 2.4.5).

NTF2 ist ein für den Translokationsprozess wichtiges Protein, da es zytoplasmatisch RanGDP bindet und in den Zellkern transportiert. Es wirkt so einer nukleären Depletion von RanGTP entgegen, da dieses durch Exportprozesse dem Zellkern verloren geht. Bei der Bindung des Importin  $\alpha/\beta$ -Komplexes bindet Importin  $\alpha$  über seine aminoterminalen Importin  $\beta$ -Bindedomäne (IBB) an Importin  $\beta$  und wird hierdurch zum hochaffinen NLS-Rezeptor. Weitere Faktoren, die die Bindung an Importin  $\beta$  vermitteln sind Snurportin und XRIP $\alpha$ , die am Import von UsnRNPs (Huber et al., 1998) bzw. XRPA (Jullien et al., 1999) beteiligt sind. Neben Importin  $\alpha$  ist auch Importin  $\beta$  in der Lage als Importrezeptor und Transportprotein gleichzeitig aufzutreten wie dies beispielsweise für das HIV-Rev Protein (Truant und Cullen, 1999) gezeigt worden ist. Darüber hinaus kann Importin  $\beta$  auch als Komplex mit anderen Importin  $\beta$ -ähnlichen Proteinen wie RanBP8 (Ran Binding Protein 8) oder Importin7 auftreten. Letzteres bildet mit Importin  $\beta$  den funktionellen Rezeptor für den Kernimport der H1-Histone (Jäkel et al., 1999).

Neben ihrer Funktion als Importer können Importin  $\beta$ -ähnliche Rezeptoren auch als Exporter funktionieren und werden diesbezüglich hinsichtlich ihrer Transportrichtung entweder in Importine oder Exportine eingeteilt (Nakielnny und Dreyfuss, 1999; Görlich und Kutay, 1999). Diese Familie der Importin  $\beta$ -ähnlichen Proteine umfaßt in höheren Eukaryonten 21 Mitglieder (Görlich und Kutay, 1999). Zu diesen Transportrezeptoren

zählt auch Transportin, das den Kernimport von hnRNP A1 vermittelt. Importin5 und Importin7 gehören ebenfalls dieser Proteinfamilie an, sie stellen Importrezeptoren für ribosomale Proteine dar (Jäkel und Görlich, 1998).

CRM1 ist ein Exportrezeptor der Proteine mit leucinreichen Kernexportsequenzen erkennt und aus dem Zellkern heraus transportiert (Hood und Silver, 1999), CAS ist dagegen für den Export von Importin  $\alpha$  zuständig (Kutay et al., 1997) und Exportin-t für den Transport von t-RNA ins Zytoplasma (Kutay et al., 1998; Arts et al., 1998).

Importin  $\beta$ -ähnliche Rezeptoren weisen ein Molekulargewicht von 90-130 kD, einen sauren isoelektrischen Punkt von pH 4,6-5,9 und eine aminoterminal RanGTP-Bindedomäne (Rexach und Blobel, 1995; Izaurralde et al., 1997).

Die Transportrezeptor-Kernsignal-Interaktion kann in ihrer Spezifität stark variieren. So sind manche Rezeptoren in der Lage, an verschiedene Kernlokalisationssequenzen zu binden und deren Substrate durch den Kernporenkomplex zu transportieren. Andererseits wird eine Kernlokalisationssequenz auch von unterschiedlichen Rezeptoren erkannt. Dieses Phänomen konnte man bei dem Transport des ribosomalen Proteins L23a beobachten. Über eine einzige Kernlokalisationssequenz kann L23a *in vitro* sowohl durch Transportin als auch durch Importin  $\beta$ , Importin5 oder Importin7 in den Kern importiert werden (Jäkel und Görlich, 1998).

#### **2.4.5 Importin und das RanGTPase-System**

Der trimere aus Substrat, Importin  $\alpha$ , Importin  $\beta$  bestehende Translokationskomplex bindet mittels Importin  $\beta$  an der zytoplasmatischen Seite des Kernporenkomplexes und wird daraufhin in den Kern transloziert. Auf der nukleären Seite kommt es schließlich zur Bindung von RanGTP. Hierdurch kommt es zum Zerfall des Translokationskomplexes und somit zur Substrat-Freisetzung und darum auch von Importin  $\alpha$ , welches über CAS wieder zurück in einer RanGTP-abhängigen Reaktion ins Zytoplasma transportiert wird. Das RanGTPase-System besteht neben der GTPase Ran aus den Importinen RCC1 (Regulator of Chromatin Condensation, ein Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor), RanGAP (GTPase-aktivierendes Protein), NTF2 (Paschal und Gerace, 1995) sowie dem RanBP1 (Ran-bindenden Protein; Bischoff und Görlich, 1997).

Ran kann in zwei Aktivitätszuständen vorliegen, einem GDP- gebundenen inaktiven oder in einem GTP-gebundenen aktiven Zustand. Dabei wird der Übergang vom GDP zum GTP durch RCC1 reguliert (Bischoff und Ponstingl, 1991). Die Hydrolyse von GTP zu GDP wird dagegen durch die Proteine RanGAP (Bischoff et al., 1994) und RanBP1 (Koaktivator) katalysiert. Dieser Vorgang steigert die geringe GTPase-Aktivität von Ran (Melchior und Gerace, 1998; Moore, 1999). Die Assoziation der asymmetrisch verteilten, zytoplasmatischen Proteine RanGAP, RanBP1, RanBP2 und des nukleären Proteins RCC1 führt zu einem RanGTP-Gradienten über die Membran, der für die Transportrichtung von entscheidender Bedeutung ist.

Die Funktion von RanGTP ist von zweifacher Natur. Im Zellkern bewirkt die Bindung von RanGDP an den Translokationskomplex dessen Zerfall, andererseits erfolgt der Transport der Importine aus dem Zellkern RanGTP-abhängig. Auf der zytoplasmatischen Seite kommt es schließlich genau umgekehrt durch die Hydrolyse von GTP zu GDP zum Zerfall des Exportkomplexes und somit zur Freisetzung des Substrates und seines Rezeptors. NTF2 ist ein für den Translokationsprozess wichtiges Protein, da es zytoplasmatisch RanGDP bindet und in den Zellkern transportiert. Es

wirkt so einer nukleären Depletion von RanGTP entgegen, da dieses durch Exportprozesse dem Zellkern verloren geht.

Generell gelangen beide Importinmoleküle auf verschiedenen Wegen ins Zytoplasma, wo sie für einen neuen Transportzyklus zur Verfügung stehen.

Importin  $\alpha$  verläuft RanGTP-abhängig durch den Exportrezeptor CAS zurück ins Zytoplasma. Importin  $\beta$  wird im Komplex mit RanGTP exportiert, was eine erneute Bindung an Importin  $\alpha$  im Kern verhindert. Der Rezeptor bindet das Substrat im Kern in der RanGTP-gebundenen Form und die GTP-Hydrolyse im Zytoplasma führt zur Dissoziation des Ran/Rezeptor/Substrat-Komplexes (Moore, 1999). Nur durch die Hydrolyse des Ran-gebundenen GTPs ist die Wiederherstellung beider Importine im Zytoplasma möglich. Daran beteiligen sich zwei zytoplasmatische Faktoren, ein Ran-bindendes Protein (RanBP1) und ein Ran-aktivierendes Protein (RanGAP). Beide zusammen stimulieren die GTPase-Aktivität von Ran. Nach GTP-Hydrolyse dissoziieren Ran-GDP und Importin. Letzteres steht dann für den nächsten Importzyklus wieder zur Verfügung.

## **2.5 Die mögliche Funktion von Kanadaptin**

Über die Funktion von Kanadaptin gibt es bisher nur wage Vermutungen. So postulierten Chen et al. (1998), dass in säuresezernierenden Schaltzellen der Kaninchenniere Kanadaptin eine Rolle beim Transport von renAE1 zur basolateralen Membran spielt. In nicht renAE1-exprimierenden Zellen dagegen zeigen Untersuchungen (Hübner et al., 2002), dass Kanadaptin möglicherweise an nukleären Prozessen beteiligt ist. Diese Hypothese wird durch eine Arbeit von Perkins et al. (1999) unterstützt.

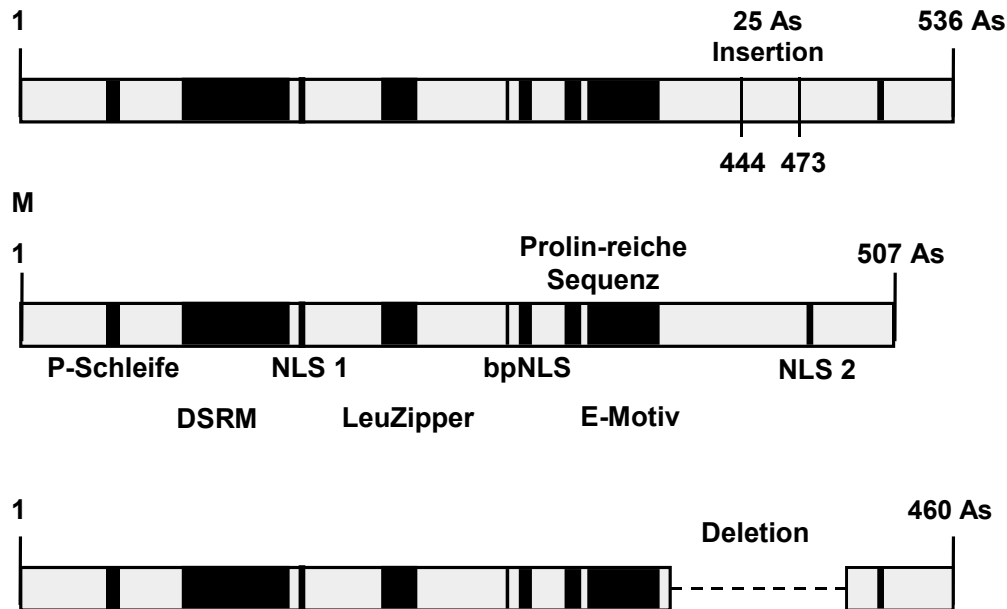
Durch die Sequenzierung des menschlichen Genoms sind eine Vielzahl neuer Gene identifiziert worden, deren Funktion aber noch unbekannt ist. Die Tatsache, dass basale Genfunktionen innerhalb mikrobieller und eukaryontischer Systeme evolutiv konserviert sind, erlaubt den Einsatz einfacher auf Bakterien basierender Modellsysteme. So konnten viele eukaryontische DNA-Reparaturgene infolge ihrer Komplementierung in prokaryontischen Reparaturmutanten identifiziert werden (Panayotatos und Fontaine, 1985). Auch für die Identifizierung humaner Gene, die eine Rolle bei der Stabilität des Genoms und des DNA-Metabolismus spielen, bediente man sich eines mikrobiellen Systems, dem sogenannten SOS-Induktions-System (Kenyon und Walker, 1980). Aufgrund seiner Sensitivität gegenüber chromosomaler Störungen wurde dieses System ursprünglich bei der Identifizierung bakterieller und viraler DNA-modifizierter Proteine eingesetzt (Heitman und Model, 1987; Heitman et al., 1989; Heitman und Model, 1991; Xu und Schildkraut, 1991; Fomenkov et al., 1994; Fomenkov und Xu, 1995). Perkins et al. (1999) benutzten hierfür einen *dind1::lacZ* Reporterkonstrukttragenden SOS-responsiven *E. coli*-Stamm und transformierten diesen mit einer humanen meiotischen Hoden-cDNA-Bank. Mit Hilfe dieses Ansatzes konnten humane Gene identifiziert werden, die für Chromosom-stabilisierende Proteine kodierten (Tuteja et al., 1994; Yasuda et al., 1995). Interessanterweise wurde auch ein cDNA-Fragment identifiziert, dessen Proteinsequenz eine hohe Homologie zum humanen Kanadaptin zeigt (Perkins et al., 1999).

## **2.6 Die Isoformen von Kanadaptin**

Mit Hilfe der RT-PCR konnten in der Niere der Maus neben der von Chen et al. publizierten Kanadaptin-cDNA zwei Spleißvarianten identifiziert werden (siehe Abb.2). Bei einer Kanadaptin-Isoform handelt es sich um eine Leserastermutante, die sich von Kanadaptin nur karboxyterminal unterscheidet. Dies führt zu einer von Kanadaptin



abweichenden Domänenstruktur. Die zweite Kanadaptin-Isoform ist eine Insertionsmutante mit einer Insertion von 25 Aminosäuren. Transfektionsexperimente der Insertionsmutante zeigen keine von Kanadaptin abweichende subnukleäre Verteilung, dagegen lokalisiert die Leserastermutante in subnukleären Strukturen (Hübner, persönliche Mitteilung).



**Abb.2: Isoformen von Kanadaptin der Maus.** Das obere Bild zeigt die Insertionsmutante, das Mittlere den Wildtyp, die untere Abbildung stellt die Leseraster- oder Deletionsmutante dar.

Seit Februar 2000 ist die DNA-Sequenz einer humanen Kanadaptin-Isoform bekannt. Sie wurde von der japanischen Arbeitsgruppe um Takao Isogai (Helix Research Institute, Genomics Laboratory; 1532-3 Yana, Kisarazu, Chiba 292-0812, Japan) aus zweiwöchigen Retinsäure-induzierten NT2-Zellen isoliert. Ein Jahr später wurde sie auch von Kittanakom et al. (Institute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol University, Thailand) aus der menschlichen Niere kloniert.

## 2.7 Die Fragestellungen der Arbeit

Basierend auf den Ergebnissen der Arbeit von Chen et al. (1998) wurde postuliert, dass in säuresezernierenden Schaltzellen der Kaninchenniere Kanadaptin am Transport von renAE1 zur basolateralen Plasmamembran eine Rolle spielt. Untersuchungen von Hübner et al. (2002) zeigten, dass Kanadaptin in kultivierten eukaryontischen Zellen im Zellkern lokalisieren kann, wobei die nukleäre Translokation abhängig von einer aminoterminalen NLS und vom NLS-Rezeptorkomplex Importin  $\alpha/\beta$  erfolgt. Darüber hinaus zeigt der Aminoterminus in Detergenz-behandelten Zellen die Fähigkeit der nukleären Retention. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass Kanadaptin an nukleären Prozessen beteiligt ist. Zur weiteren Charakterisierung von Kanadaptin der Maus sollte deshalb mit Hilfe immunzytochemischer Untersuchungen in Gegenwart Zelltyp-spezifischer Marker, Immunelektronenmikroskopie und biochemischen Nachweisverfahren dessen Vorkommen und Expression in der Niere und anderen Organen näher analysiert werden.

Die Sequenzanalyse einer kürzlich klonierten humanen Kanadaptin-Isoform ergab, dass dieses gegenüber den Kanadaptin-Isoformen der Maus eine aminoterminaler Verlängerung enthält. Die Aminosäuren der Isoformen zeigen einen sehr hohen Grad an Homologie untereinander. Karboxyterminal besitzt humanes Kanadaptin eine Insertion von 69 Aminosäuren. Eine ähnliche karboxyterminale Insertion von 29 Aminosäuren besitzt auch die Insertionsmutante vom Kanadaptin der Maus.

Auffälligstes Merkmal von humanem Kanadaptin ist jedoch die aminoterminaler 263-Aminosäure-Extension. Sie enthält eine FHA-Domäne von 61 Aminosäuren. FHA-Domänen sind charakteristisch für Phosphoproteine, wie Nukleinsäure-bindende Transkriptionsfaktoren, Zellzyklus-regulierende Proteine oder Signalproteine. Da diese FHA-Domäne für humanes Kanadaptin spezifisch ist, konzentrierte sich der zweite Teil der Arbeit darauf, zu untersuchen, welchen Einfluss die FHA-Domäne auf die subzelluläre Lokalisation von humanem Kanadaptin nimmt.

Da unserer Arbeitsgruppe der humane Kanadaptin-Klon von einer japanischen Arbeitsgruppe der Firma Genomics Laboratory (Helix Research Institute, 1532-3 Yana, Kisarazu, Chiba 292-0812, Japan) nicht zur Verfügung gestellt wurde, bestand der erste Teil der Doktorarbeit darin, die humane Kanadaptin-cDNA zu klonieren.

Gemäß der Vorgehensweise der japanischen Arbeitsgruppe bei der Isolierung der menschlichen Kanadaptin-cDNA-Sequenz diente hierzu eine Teratokarzinomzelllinie, eine Hodenzelllinie (NT2/D1-Vorläuferzellen, Stratagene), die über 2 Wochen mit Retinsäure behandelt wurde.

Diese NT2 EC-Zelllinie ist die einzige menschliche Zelllinie, die große, langlebige, postmitotische und rein neuronale Populationen (NT2-N Neurone) bildet (Pleasure et al., 1992; Pleasure und Lee, 1993; Kleppner et al., 1995; Cheung et al., 1999; Andrews et al., 1984). Pluripotente EC (Embryonal Carcinomas)-Zellen, die Stammzellen des Teratokarzinoms, können sich nach Zugabe des Induktors Retinsäure *in vitro* speziell differenzieren. Nach Retinsäuregabe von 10 mM entstehen aus NT2/D1(Ntera 2/cl.D1)-Zellen differenzierte Tochterzellen, die NT2-N Zellen (Andrews et al., 1983). Kein anderer bekannter Zelltyp ist Retinsäure-induzierbar (Andrews, 1984; Andrews et al., 1985; Andrews et al., 1984; Lee und Andrews, 1986; Andrews et al., 1987; Pleasure et al., 1992; Pleasure und Lee, 1993). NT2/D1-Zellen differenzieren sich zu unterschiedlichsten Zelltypen, neben Nervenzellen (Hartley et al., 1999) auch zu Epithelzellen und Knorpelzellen (Martin und Evans, 1975) sowie Gliazellen und Fibroblasten (Jones-Villeneuve et al., 1982; Jones-Villeneuve et al., 1983). Nach DMSO-Behandlung werden viele Teratokarzinomzellen zu Muskelzellen (Jones-Villeneuve et al., 1982). Im Anschluss an die Klonierung der cDNA sollte diese in entsprechende Expressionsvektoren (pEGFP und pcDNA3.1(+)) kloniert und ausgehend von diesen Deletionsmutanten hergestellt werden. Auf Basis von GFP-Fusionsproteinen sollten schließlich an kultivierten Zellen detaillierte Lokalisationsuntersuchungen durchgeführt werden.

### 3. Materialien und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Geräte

Fluoreszenz-Mikroskop Axiovert 135 TV +  
Fluoreszenzgeber XBO 75W HBO 100W mit  
Lambda 10-2  
Konfokales UV Laserscanningmikroskop mit  
Zeiss LSM 510  
Zeiss Elektronenmikroskop LEO912  
Eppendorf Mastercycler gradient  
Elektroporationskammer Biojet MI  
Fluoreszenz-Mikroskop BH2  
mit BH2-RFCA Kamera-Adapter  
Photometer LKB Biochrom Ultraspec II  
GeneAmp PCR System 2400  
Kühlzentrifuge, Model J2-21  
(JA-17/JS-13 Rotor)  
Schüttler Unimax 2010  
Sofortbild-Fotopapier ISO 3000/36°  
Sofortbild-Kamera MP4  
Tiefkühlschrank UF 85-300 S  
Tischzentrifuge Biofuge A (Rotor 1378)  
Tischzentrifuge Typ 5415 C  
Tischzentrifuge Typ 5417 R  
Ultraschallgerät Sonifier 250  
UV-Transilluminator Chroma 43  
Vakuum-Zentrifuge  
Vaboklav Dampfsterilisator Typ 500

Carl Zeiss, Hamburg  
Sutter Instruments Co., USA

Carl Zeiss, Hamburg

Carl Zeiss, Hamburg  
Eppendorf, Hamburg  
Bio-med, Theres  
Olympus Optical, Japan  
Ion Laser Technology, Utah  
Pharmacia Biosystems, Freiburg  
Perkin Elmer, Dreieich  
Beckman, München

Heidolph, Schwabach  
Bachhofer, Reutlingen  
Polaroid, England/Angletterre  
Colora, Frankfurt  
Heraeus, Hanau  
Eppendorf, Hamburg  
Eppendorf, Hamburg  
Brandson Sonifier Ultrasonics, USA  
Vetter GmbH, Wiesloch  
von Keuz, Reiskirchen  
H+PLabortechnik, Oberschleißheim

##### 3.1.2 Chemikalien

Lösungsmittel, Laborchemikalien und Feinchemikalien in p.a. Qualität wurden  
überwiegend von Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Boehringer (Mannheim), Serva  
(Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Agarose, Analytical Grade  
Ammoniumpersulfat  
Ampizillin  
Aqua dest. (Ampuwa®)  
Bradford-Reagenz  
Bromphenolblau  
Coomassie® Brillantblau R 250  
DEPC  
DMSO  
dNTP-Mix (10 mM)  
DTT  
EDTA  
Ethidiumbromid  
Glyzerin, Ultra pure™  
Hoechst-Farbstoff 33258  
Hybridisierungspuffer

Sigma-Aldrich, Deisenhofen  
Carl Roth, Karlsruhe  
Sigma-Aldrich, Deisenhofen  
Fresenius Kabi, Bad Homburg v.d.H.  
Carl Roth, Karlsruhe  
Sigma-Aldrich, Deisenhofen  
Merck, Darmstadt  
Carl Roth, Karlsruhe  
Carl Roth, Karlsruhe  
Boehringer, Mannheim  
Roche, Mannheim  
Merck, Darmstadt  
Carl Roth, Karlsruhe  
Gibco BRL, Eggenstein  
Sigma-Aldrich, Deisenhofen  
Fisher Scientific, Schwerte

IPTG	Carl Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
LR-White	London Resin, UK
MOPS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
N-Propylgallat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Rinderserumalbumin	Serva, Heidelberg
RNAzol B™	Wak-Chemie Medical, Bad Homburg
Polyalphaolefin-Adjuvants	Ethyl S. A., Belgien
PeQGold TriFast bzw. RNAPure™	peQLab, Erlangen
Rotiphenol	Carl Roth, Karlsruhe
SDS	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

### 3.1.3 Stammlösungen

Ampizillin	in 50 mg/ml
Chloramphenicol	in 34 mg/ml
Ethidiumbromid	in 1 mg/ml
IPTG	in 100 mg/ml
Kanamycin	in 10 mg/ml
RNAse A	in 10 mg/ml

### 3.1.4 Gebrauchsfertige Systeme

DIG RNA Labelling Mix™ (10x konz.)	Roche, Mannheim
Effectene™ Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Expand High Fidelity™ PCR System	Roche, Mannheim
Expand Long Template PCR System	Roche, Mannheim
Jetquick® Gel Extraktions Spin Kit	Genomed, Bad Oeynhausen
MitoTracker Rot CMXRos	CMX, Molecular Probes, Eugene
pGEM®-T Vector System	Promega, Mannheim
Qiagen-Aufreinigungs-System	Qiagen, Hilden
Titan™ One Tube RT-PCR System	Boehringer, Mannheim
QIAexpress™	Qiagen, Hilden

### 3.1.5 Enzyme und Lysate

Klenow Fragment Enzym (2 u/µl, 300 u)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNAse A	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
RNAse Inhibitor (40 u/µl, 1.000 u)	Boehringer, Mannheim
T4 DNA-Ligase (3 u/µl, 100 u)	Promega, USA bzw. Serva, Heidelberg
Taq-Polymerase (1 u/µl, 500 u)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Rat Kidney Lysate	Transduction Laboratories, USA

### 3.1.6 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

λ-Phagenmarker (F-Marker; MBI Fermentas, St. Leon-Rot):	10 µl λ-DNA Eco911 (BstEII) 0,5 mg DNA/ml (MBI); 160 µl TE; 15 µl DNA-Auftragspuffer (6x) zusammen geben und mischen.
Acrylamidlösung (30 %):	Fertiglösung (Carl Roth, Karlsruhe)
DNA-Auftragspuffer (6x):	30 % (w/v) Glycerin; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylenzanol
PBS-Puffer:	140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Natriumhydrogenphosphat; 1,8 mM Kaliumhydrogenphosphat; 800 ml Aqua dest.

SLL-Marker:	30 µl GeneRuler™ 1.000 bp DNA Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot); 60 µl TE; 20 µl DNA-Auftragspuffer (6x); 3 µl/Spur
SSC (20x):	3 M NaCl; 0,3 M Natriumzitat, pH 7,0
TBS (pH 7,5)	100 mM Tris-Base; 150 mM NaCl
TAE (50x), pH 8,0	242 g/l Tris-Base; 57,1 ml/l Essigsäure; 9,3 g/l EDTA
TBE (10x), pH 8,3	108 g/l Tris-Base; 55,0 g/l Borsäure; 9,3 g/l EDTA; ad 1 l Aqua dest.
TE	50 mM Tris/HCl, pH 8,3; 1 mM EDTA, pH 8,0; 2 mM DTT; 500 mM NaCl; 1 mM PMSF

### 3.1.7 Molekulargewichtsstandards für Nukleinsäuren

Die Länge der analysierten DNA-Fragmente wurde mit Hilfe geeigneter Längenstandards (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) bestimmt. Während der Elektrophorese trennte sich dazu ein Gemisch aus DNA-Molekülen mit definierten Fragmentlängen parallel zur Probe. Für kleine DNA-Fragmente ( $\leq 1.000$  bp) kam der GeneRuler™ 1.000 bp DNA Ladder, für größere Fragmente ( $\geq 1.000$  bp) der Eco91I restringierte Lambda-Phage-DNA-Marker zum Einsatz.

SLL-Marker (GeneRuler™ 1.000 bp DNA Ladder) in bp:  
1.000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 und 80.

F-Marker (Lambda DNA/Eco91I (BstEII) Marker, 15 (in bp):  
14.140, 8.453, 7.242, 6.369, 5.687, 4.822, 4.324, 3.675, 2.323, 1.929, 1.371, 1.264 und 702.

### 3.1.8 Molekulargewichtsstandards für Proteine

EPL-Längen-  
standard: Premixed Protein Molecular Weight Markers, Low Range, 95,0 – 66,2 – 39,2 – 26,6 – 21,5 – 14,4 kD (Boehringer, Mannheim) mit 3x Probenpuffer 1:20 verdünnt.

peqGold Marker: 116 – 66,2 – 45 – 35 – 25 – 18,4 kD (peQLab, Erlangen)

### 3.1.9 Sterilisierung von Lösungen und Glasmaterialien

Lösungen und Nährmedien wurden 20 min in feuchter Hitze bei 2 bar/120 °C autoklaviert. Thermolabile Lösungen wurden durch Sterilfiltration 0,2 µm Filter entkeimt. Die Sterilisation von Glasgeräten erfolgte über Nacht in trockener Hitze bei 180-200 °C.

### 3.1.10 Bakterienstämme

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Stämme verwendet:

<u>Stamm</u>	<u>Genotyp</u>
BL21(DE3)pLysS	[Invitrogen One Shot™ cells] F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3), pLysS, (Cam <sup>R</sup> ).
DH5α™ (GibcoBRL)	<i>deoR</i> , <i>end A1</i> , <i>gyr A96</i> , <i>hsd R17</i> ( <i>r<sub>K</sub><sup>-</sup>m<sub>K</sub><sup>+</sup></i> ), <i>recA1</i> , <i>rel A1</i> , <i>sup E44</i> , <i>thi</i> -1, $\Delta$ ( <i>lacZYA-argFV169</i> ), $\phi$ 80 $\delta$ / <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, F <sup>-</sup> , $\lambda$ <sup>-</sup> .
DH10B™ (GibcoBRL)	F <sup>-</sup> , <i>mcrA</i> , $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ), $\phi$ 80d/ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>rec A1</i> , <i>end A1</i> , <i>ara D139</i> , ( <i>ara</i> , <i>leu</i> )7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , $\lambda$ <sup>-</sup> , <i>rpsL</i> , <i>nupG</i> .
XL1-Blue (Promega)	<i>rec A1</i> , <i>end A1</i> , <i>gyr A96</i> , <i>thi</i> , <i>hsd R17</i> ( <i>r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup></i> ), <i>sup E44</i> , <i>rel A1</i> , <i>lac</i> , [ <i>F'</i> , <i>proAB</i> <sup>+</sup> , <i>tra D36</i> , <i>lacI</i> <sup>f</sup> $\Delta$ M15].
JM 109 (Promega)	<i>end A1</i> , <i>rec A1</i> , <i>gyr A96</i> , <i>thi</i> , <i>hsd R17</i> ( <i>r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup></i> ), <i>rel A1</i> , <i>sup E44</i> , $\Delta$ ( <i>lac-pro AB</i> ), [ <i>F'</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI</i> <sup>f</sup> $\Delta$ M15, Tn10(Tet <sup>r</sup> )].

### 3.1.11 Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % Kohlendioxid-Atmosphäre inkubiert. Mäuse L-M(TK-) Fibroblasten und DLD-1 menschliche Kolonkarzinomzellen (von Dr. Mühl, Universität Frankfurt freundlicherweise zur Verfügung gestellt) wurden in DMEM-Medium mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum, Penizillin/Streptomycin (50 Einheiten pro ml) und 2 mM L-Glutamin kultiviert. Die menschlichen, embryonalen Nierenzellen HEK-293, Zervixkarzinomzellen HeLa, die Hepatokarzinomzellen Hep-G2 (von Dr. Hook, Universität Würzburg freundlicherweise zur Verfügung gestellt), die Brustkarzinomzellen MCF-7 (von Dr. Schmitt, Universität Würzburg freundlicherweise zur Verfügung gestellt), die Glioblastomazellen U-373 sowie die Hundenierenzellen MDCK (von Dr. Schwerdt, Universität Würzburg freundlicherweise zur Verfügung gestellt) wurden in MEM-Medium, das mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum, Penizillin/Streptomycin (50 Einheiten pro ml) und 2 mM L-Glutamin supplementiert wurde, inkubiert. Die menschlichen pluripotenten Teratokarzinomzellen NT2/D1 (von Dr. Borgmeyer der Universität Hamburg freundlicherweise zur Verfügung gestellt) wurden im OptiMEM-Medium mit 5 % (v/v) fetalem Kälberserum, Penizillin/Streptomycin (50 Einheiten pro ml) und 2 mM L-Glutamin kultiviert. Die SW-480 menschlichen Kolonkarzinomzellen wurden im RPMI-Medium mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum, Penizillin/Streptomycin (50 Einheiten pro ml) und 2 mM L-Glutamin kultiviert.

### 3.1.12 Nährmedien für die Bakterienkultur

LB-Medium pH 7,5: 10 g/l Bacto-Trypton; 10 g/l NaCl; 5,0 g/l Hefeextrakt; 300 µl 10 N NaOH ad 1 l mit Aqua dest.

LB-Agar: LB-Medium mit 15 g/l Agar, sofort autoklavieren

Selektionsmedium: LB-Medium oder LB-Agar mit dem Zusatz von 50 mg/l Ampizillin

SOC-Medium: SOB-Medium mit 20 ml 1 M steriler Glukoselösung versetzen.

SOB-Medium: 10,0 g/l Hefeextrakt; 20 g/l Bacto-Trypton; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl. Das SOB-Medium wurde autoklaviert und anschließend auf eine je 10 mM Magnesiumchlorid- und Magnesiumsulfat-Endkonzentration eingestellt.

### 3.1.13 Nährmedien für die Zellkultur

DMEM, MEM und RPMI: Supplementiert mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum, 50 Einheiten pro ml Penizillin/Streptomycin und 2 mM L-Glutamin.

OptiMEM 1: Supplementiert mit 5 % (v/v) fetalem Kälberserum, 50 Einheiten pro ml Penizillin/Streptomycin und 2 mM L-Glutamin.

### 3.1.14 Arbeiten mit RNA

Alle Lösungen für RNA-Experimente wurden mit DEPC-behandeltem Aqua dest. (Ampuwa®; Fresenius, Bad Homburg) angesetzt und hatten eine Endkonzentration von 0,05 % (v/v) DEPC. Die Lösungen autoklavierten nach einer Inkubation bei 37 °C über Nacht. Glasmaterialien wurden wie unter 3.1.9 beschrieben behandelt.

### 3.1.15 Plasmide und Oligonukleotide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Plasmide benutzt:

Vektoren	Größe (bp)	Resistenz
pcDNA <sup>®</sup> 3.1 (+) (Invitrogen, Niederlande)	5.400	Amp
pEGFP C1 (Clontech, Heidelberg)	4.700	Kan, Neo
pEGFP N3 (Clontech, Heidelberg)	4.700	Kan, Neo
pGEM <sup>®</sup> -T (Promega, Mannheim)	3.003	Amp
pHM829 & pHM830 (zur Verfügung gestellt von G. Sorg und T. Stamminger der Universität Erlangen-Nürnberg; BioTechniques (1999) 26:858-862)	etwa 9.000	Amp

#### 3.1.15.1 Vektoren

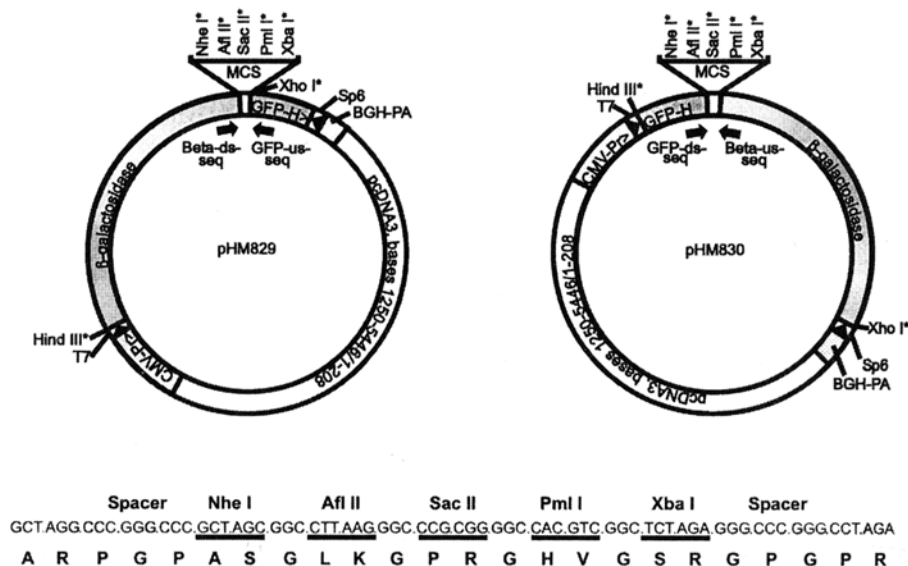
Beim pcDNA3.1<sup>®</sup>(+) handelt es sich um einen eukaryontischen Expressionsvektor. Der Vektor enthält u. a. einen Cytomegalovirus (P<sub>CMV</sub>)-Promoter für hohe Expressionsraten, eine multiple Klonierungsregion, das Polyadenylierungssignals (pA) des Rinder-Wachstumshormons (Bovine Growth, Hormone, BGH), eine Transkriptions-Terminations-Sequenz zur Erhöhung der mRNA-Stabilität sowie ein Ampizillin-Resistenz-Gen zur Selektion in *E. coli*.

pEGFP C1 ist ein eukaryontischer Expressionsvektor. Er kodiert für eine optimierte Variante des Wildtyp-GFPs, die hellere Fluoreszenz und höhere Expression in Säugerzellen erzeugt (Anregungsmaximum = 488 nm; Emissionsmaximum = 507 nm). Der pEGFP C1-Expressionsvektor kodiert für eine GFPmut1-Variante, dessen Aminosäuren Phe-64 durch Leu und Ser-65 durch Thr ersetzt sind. Die multiple Klonierungsregion (Multiple Cloning Site, MCS) in pEGFP C1 liegt 3'-terminal der EGFP-cDNA. In die MCS inserierte cDNAs werden somit als Fusionsproteine mit aminoterminalen GFP exprimiert. Eine Neomycin-Resistenz (neo<sup>r</sup>) ermöglicht die stabile Expression des Fusionsproteins in eukaryontischen Zellen. Dagegen werden in die MCS des pEGFP N3-Expressionsvektors inserierte cDNAs als Fusionsproteine mit karboxyterminalen GFP exprimiert.

Der pGEM<sup>®</sup>-T Vektor dient der Klonierung von PCR-Produkten. Dem pGEM<sup>®</sup>-T Vektor liegt ein mit *EcoR* V geschnittener pGEM<sup>®</sup>-5Zf(+)-Vektor zugrunde, dem 3'-terminal jeweils ein Thymidin (T) angefügt wurde. Diese 3'-T Überhänge an den Schnittenden ermöglichen eine effektive Ligation der PCR-Produkte in den Vektor. Für die Generierung der PCR-Produkte wurde eine thermostabile Polymerase verwendet, die matrizenunabhängig ein Desoxyadenosin an das 3'-Ende anfügt.

pHM829 und pHM830: Die beiden Vektoren pHM829 und pHM830 (mit freundlicher Genehmigung von Gabriele Sorg und Thomas Stamminger, Universität Erlangen-Nürnberg zur Verfügung gestellt) wurden für Kernlokalisationsstudien hergestellt. Beide Plasmide exprimieren die inserierte cDNA als GFP- und  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal)-Fusionsprotein. Das fluoreszierende GFP lässt sich später in lebenden oder formaldehydfixierten Zellen detektieren. Der  $\beta$ -Gal-Anteil erhöht das Molekulargewicht des Fusionsproteins und verhindert so eine passive Diffusion in den Zellkern. GFP und  $\beta$ -Gal lassen sich ebenso mit Antikörpern nachweisen.

In pHM829 wird das cDNA-Fragment zwischen dem 5'-Ende von  $\beta$ -Gal und dem 3'-Ende von GFP fusioniert. Genau andersherum ist es beim pHM830. Das exprimierte  $\beta$ -Gal-Protein-GFP-Fusionsprotein wird bei Anwesenheit einer Kernlokalisationssequenz (NLS) in den Zellkern transportiert.



### 3.1.16 Oligonukleotide

Die zu Hybridisierungs- und Amplifizierungsexperimenten sowie zur Sequenzierung eingesetzten Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech AG, Ebersberg und Carl Roth GmbH, Karlsruhe hergestellt. Ihre Ausgangs-Konzentration betrug 100 pmol/μl.

#### 3.1.16.1 cDNA-spezifische Oligonukleotide für humanes Kanadaplin

Oligonukleotide	T <sub>m</sub> min	Sequenz
3' hum Kann	92 °C	5' -CGG <u>GAA TTC</u> TCA ATA GCC ATA CTT GTC ATT AAG- 3' (EcoR I)
3' GFP hum Kan-1	70 °C	5' -GAA TGG CCT CAG CCA CCA GTT G- 3'
3' GFP hum Kan-2	66 °C	5' -TTT CCG AGA TAC TGC TTC CTG C- 3'
3' hKan-3	60 °C	5' -TAG TCT GGG TCA TCT TCA GG- 3'
5' hum Kanadaplin	102 °C	5' -CGG <u>GAA TTC</u> TAT GTT AGC ACC ACT TCG CAA CGC T- 3' (EcoR I)
5' GFP hum Kan-1	70 °C	5' -CAA CTG GTG GCT GAG GCC ATT C- 3'
5' hum Kan-2	66 °C	5' -ACA GGA AGT CAT TAC GAT CCC G- 3'
5' hKan-2	60 °C	5' -ATC AGG CAG TAC ATT AGA TGG- 3'
5' Kanadaplin-5	61 °C	5' -CGT GAG GAT GAC CCA GAC TAC- 3'
5' Kanadaplin-6	66 °C	5' -ACT TAC TGT AGA GTC CAC GTC G- 3'
5' hum Kan N-EcoRI/2	65 °C	5' - <u>GAA TTC</u> ATG TTA GCA CCA CTT CGC AAC G- 3' (EcoR I)
3' hum Kan N-EcoRI/2	68 °C	5' - <u>GAA TTC</u> TCA AAC ATG CCC AAC GTG GAC TCG- 3' (EcoR I)
5' hum Kan N-EcoRI-3	70 °C	5' -CCG <u>GAA TTC</u> ACC ATG TTA GCA CCA CTT CGC AAC- 3' (EcoR I)
5' hum Kan FHA NheI	71 °C	5' -CCG <u>GCT AGC</u> TAC TGC CTT TTC GGG AGG- 3' (Nhe I)
3' hum Kan FHA NheI	71 °C	5' -GGC <u>GCT AGC</u> GAT GCG AGT TTT GTT GAG AAA AGT GC- 3' (Nhe I)
5' h Kan GAP/EcoRI	65 °C	5' -CGG <u>GAA TTC</u> ACA CAT TTT AAA GAA ACC CAA ACC- 3' (EcoR I)
5'hKanGAP-FHA/EcoRI	72 °C	5' -GCC <u>GAA TTC</u> AGC AAC GGG CCG GGC TTC- 3' (EcoR I)
5' h Kan N I	67 °C	5' -ACC GAA GGG TGG GTT TCG AAG GAG -3'



5' h Kan N II	63 °C	5' -GGT GAT TTT AGG AGT CTA CAG GAG G- 3'
5' hum Kan genomI2	64 °C	5' -AGA GGA AGA CCG AGA GGC AGA ATC- 3'
3' hum Kan genomI2	66 °C	5' -CAT TCC CCA GGT GCA ACC CAT CTC- 3'
3' (nested)hKanFHA	60 °C	5' -CCA TCT CAT CAT CTT GGC TAC C- 3'
5' (nested)hKan-3	61 °C	5' -GGT GCC ATG AAA GGA GGA AGC- 3
5' GFP-Kanadaptin	98 °C	5' -CCG <u>CTC GAG</u> CCA TGC GCT TTG GAG GCA GC- 3' (Xho I)
5' Kanadaptin-3	60 °C	5' -AAA CAA CTG GTG GCT GAG G- 3'
3' GFP-Kanadaptin	84 °C	5' - GGA ATT CCA GTA GCC ATA CTT GTC ATT AAG- 3'
5' Delta NLS 1	53 °C	5' -AGT ATC TCG GAA AAC <u>GAA</u> AGC CAA GAA C- 3'
3' Delta NLS 1	63 °C	5' -GTT CTT GGC TTT C <u>G</u> T TTT CCG AGA TAC T- 3'

### 3.1.17 Antikörper

#### 3.1.17.1 Erstantikörper

Anti-GFP	1:1.000	1 mg/ml	Roche, Mannheim
Anti-Kanadaptin	1:2.000	250 µg/ml	Transduction Laboratories, USA Becton Dickinson, Heidelberg, (gerichtet gegen die Aminosäuren 60-171)
Anti-Nucleoporin p62	1:1.000	1 mg/ml	Transduction Laboratories, USA Becton Dickinson, Heidelberg,
Anti-Cytochromoxidase Untereinheit I (COX)	1:2.000	1 mg/ml	Molecular Probes, Niederlande
Anti-Histon H3	1:1.000	1 mg/ml	Cell Signaling, Sigma, Taufkirchen

#### 3.1.17.2 Zweitantikörper

HRP-konjugierter Ziege- gegen-Maus	1:1.000	0,8 mg/ml	Dianova, Hamburg
HRP-konjugierter Kaninchen-gegen-Ziege	1:2.000	1 mg/ml	Dianova, Hamburg
Cy <sup>TM</sup> 3-konjugierter Kaninchen-gegen-Ziege	1:2.000	1,5 mg/ml	Dianova, Hamburg
Cy <sup>TM</sup> 2-konjugierter Ziege- gegen-Maus	1:2.000	1,5 mg/ml	Dianova, Hamburg
Cy <sup>TM</sup> 3-konjugierter Ziege- gegen-Maus	1:2.000	1,5 mg/ml	Dianova, Hamburg
Goldpartikel-markierter Ziege-gegen-Maus	1:80	1,4 mg/ml	Aurion, Cologne

## **3.2 Methoden**

Sofern nicht anders angegeben, sind alle hier verwendeten Methoden aus dem Laborhandbuch „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“ (Maniatis et al., 1982; Sambrook et al., 1989) entnommen. Die Methoden der Zellkultur entstammen dem Katalog der Firma GIBCO BRL oder dem Buch „Zell- und Gewebekultur“ (Toni Lindl, Jörg Bauer, 2. Auflage, 1989).

### **3.2.1 Zellkultur**

Zur Anzucht von Kulturzellen kamen je nach Zelllinie unterschiedliche Kulturmedien der Firma GIBCO BRL zum Einsatz. Das Fertigmedium (500 ml) wurde mit 10 %igem fetalem Kälberserum (FCS, 50 ml), Penizillin/Streptomycin (2,5 ml) und optional L-Glutamin (Endkonzentration: 2 mM) supplementiert und konnte so bei 4 °C gelagert werden.

#### **3.2.1.1 Kultivierung von Säugetierzelllinien**

Die Kulturzellen wurden in dem oben beschriebenen Kulturmedium in Kulturflaschen der Größe T75 bzw. T25 bei 37 °C und 5 % Kohlendioxid bis zu einer Konfluenz von 90 % kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt mussten die Zellen im Verhältnis 1:3 bis 1:5 geteilt, auf neue Kulturflaschen gesetzt oder für den späteren Gebrauch kryokonserviert werden.

Das Ablösen der Zellen von den Kulturflaschen erfolgte mittels Trypsinlösung (0,05 % Trypsin; 0,02 % EDTA). Dafür wurden die Zellen zunächst mit 2x PBS gewaschen und nach Austausch des PBS/EDTA-Gemisches mit Trypsinlösung versehen. Nach anschließender 3-5 minütiger Inkubation lösten sich die Zellen im Brutschrank ab. Dann wurde das Trypsin-Gemisch durch Zugabe von Kulturmedium neutralisiert und die Zellen im Verhältnis 1:3 bzw. 1:5 in neue Flaschen kultiviert oder zur Kryokonservierung weiter verarbeitet.

Alle Kulturzellen mussten 3 mal pro Woche im Phasenkontrastmikroskop auf ihre Morphologie und Konfluenz hin überprüft werden. Je nach Bedarf erfolgte eine Erneuerung des Kulturmediums (Umschlag des Phenolrot-Indikators).

#### **3.2.2 Kryokonservierung von Zellen**

Ein häufig auftretendes Problem bei der Arbeit mit permanenten Zelllinien liegt in der begrenzten Passagenzahl, die mit den Zellen durchgeführt werden kann, ohne dass sich der Charakter der Zellen verändert. Mit steigender Passagenzahl erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für morphologische und genetische Veränderungen der Zellen. Um diesem Problem entgegen zu wirken, ist es sinnvoll, mit möglichst geringen Passagenzahlen zu arbeiten und immer wieder Zellen einzufrieren bzw. aufzutauen.

##### **3.2.2.1 Einfrieren der Zellen**

Kulturzellen wurden wie unter 3.2.1.1 beschrieben abgelöst. Daran anschließend mit DMSO versetzt und in flüssigem Stickstoff gelagert. Aus einer T75-Kulturflasche konnten 3 Kryoröhrchen, aus einer T25-Kulturflasche 1 Kryoröhrchen weggefroren werden. Trypsin-behandelte Zellen wurden 5 min bei 900 rpm zentrifugiert, der Überstand abgezogen, das Zellsediment in 800 µl supplementiertem Kulturmedium bei 37 °C resuspendiert und die Zellsuspension in ein vorgekühltes Kryoröhrchen überführt. Es erfolgte die Zugabe von 800 µl 10 % FCS/20 % DMSO versetztem Kulturmedium, eine Abkühlung der Zellsuspension über Nacht auf -80 °C und schließlich die Endlagerung in flüssigem Stickstoff.

### **3.2.2.2 Auftauen der Zellen**

Beim Auftauen der Zellen musste zügig gearbeitet werden, um das zelltoxische Einwirken von DMSO zu vermeiden. Das Kulturmedium mit den angezogenen Zellen wurde aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und unter der Sterilbank bei RT aufgetaut. Die Zellen wurden zügig in 10 ml supplementiertem Kulturmedium (37 °C) resuspendiert und daran anschließend bei 900 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen, das Zellsediment in 2 ml Kulturmedium (37 °C) aufgenommen und die Zellsuspension in eine T25-Kulturflasche gegeben. Nach Zugabe von weiteren 8 ml Kulturmedium (37 °C) wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % Kohlendioxid im Brutschrank kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium erneuert und die Kultivierung der Zellen fortgesetzt.

### **3.2.3 Transiente Transfektion von Zellen**

Transiente Transfektionen adhärenter Zellen wurden mit Effectene™ (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Erfolgt Zelltransfektionen mit Expressions-Vektoren, die für GFP-Fusionsproteine kodierten, so konnte man die Expression der entsprechenden GFP-Fusionsproteine 14-16 Stunden später direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 460 nm-Anregung detektieren.

### **3.2.4 Bakterienkulturen**

#### **3.2.4.1 Plattenkulturen von Bakterien**

Plattenkulturen ermöglichen die Isolierung von Einzelkolonien, die dann ihrerseits wieder auf Platten ausgestrichen werden können oder der Herstellung von Übernachtskulturen (5 ml) und Stammkulturen dienen. Einzelkolonien wurden durch fraktionierten Ausstrich und nach Transfizieren kompetenter Bakterien (siehe 3.2.17.1) mit DNA erhalten. Um ein Austrocknen oder Pilzbefall der Platten zu verhindern, wurden diese mit Parafilm® verschlossen. Die ausgestrichenen oder ausplattierten Bakterien inkubierten über Nacht bei 37 °C.

#### **3.2.4.2 Flüssigkulturen von Bakterien**

Die Flüssigkulturen wurden entweder durch Übertragung einer Einzelkolonie mit einer Impföse oder einer Pipettenspitze angeimpft (bei Kleinkulturen) oder aber durch Zugabe eines Teils einer frischen Übernachts-Vorkultur (bei Großkulturen). Die Menge der zugegebenen Übernachts-Vorkultur lag bei 1/100 des Gesamtvolumens.

Kleinkulturen bis etwa 5 ml inkubierten in sterilen Reagenzgläsern über Nacht bei 37 °C. Großkulturen aus 200 bis 500 ml inkubierten in sterilen 1 Liter Erlenmeyerkolben schüttelnd über Nacht bei 37 °C und 200 rpm/min.

#### **3.2.4.3 Isolierung von Bakterien-Einzelkolonien**

Um Einzelkolonien von Bakterien zu erhalten wurde aus einer entsprechenden Glyzerolstockkultur ein fraktionierter Ausstrich hergestellt und dieser über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelkolonien wurden am darauffolgenden Tag mit einem sterilen Zahnstocher oder einer abgeflammt Impföse aufgenommen und entweder auf eine Antibiotikum-enthaltene Platte ausgestrichen oder in Antibiotikum-enthaltene LB-Flüssigmedium gegeben.

### **3.2.5 Herstellung von embryonalen Extrakten der Maus**

Aus trächtigen Mäusen des Stammes 129 SV wurden nach erfolgreicher Verpaarung (Bildung eines Vaginalplaques) an verschiedenen Tagen Embryonen isoliert. Die Bestimmung der embryonalen Entwicklungsstufe erfolgte auf Basis des 'Edingburg Maus-Atlas' (<http://genex.hgu.mrc.ac.uk/>). Die Embryonen wurden mit PBS gespült,

mechanisch zerkleinert und in Laemmli Sample Puffer (Laemmli, 1970) aufgenommen. Nach einer Zentrifugation bei 5.000 rpm wurde der Überstand für daran anschließende Western-Blot-Analysen in Gegenwart der monoklonalen Antikörper Anti-Kanadaplin und Anti-Nukleoporin p62 (siehe 3.1.17.1) eingesetzt.

### **3.2.6 Herstellung von Mitochondrien-Extrakten**

Mitochondrienfraktionen wurden aus kultivierten, adhärenen Zellen oder frisch präparierten Ratten-Enterozyten hergestellt. Hierzu wurden adhärenente Zellen mit PBS gewaschen und mit einem Spatel abgelöst. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 3.000 rpm wurde das Zellsediment in eiskaltem Mitochondrien-Isolierungspuffer resuspendiert. Enterozyten wurden dagegen wie unter 3.2.7 beschrieben isoliert. In allen Fällen wurden die Zellen in einem 15 ml Teflon-Glashomogenisator mechanisch aufgebrochen. Das Homogenat zentrifugierte hintereinander zunächst bei 650 g und nach Überführung des Überstandes in ein neues Eppendorfröhrchen nochmals bei 850 g für jeweils 10 Minuten bei 4 °C. Der von Zellkernen befreite mitochondrienhaltige 850 g-Überstand wurde schließlich bei 10.000 rpm für 30 min und 4 °C zentrifugiert. Das gewonnene mitochondrienangereicherte Sediment wurde in Laemmli Sample Puffer (Laemmli, 1970) aufgenommen und einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Nur Histon H3-negative und COX-positive mitochondriale Extrakte wurden unter Einsatz des monoklonalen Anti-Kanadaplin-Antikörpers verwendet.

Mitochondrien-Isolierungspuffer:	210 mM Mannitol; 70 mM Sukrose; 0,2 mM EDTA; Hepes, pH 7,4; 1 mM PMSF; 0,5 µg/ml Leupeptin; 0,5 µg/ml Pepstatin und 0,5 µg/ml Aprotinin
----------------------------------	---

### **3.2.7 Isolierung von Enterozyten**

Der aus einer Ratte präparierte Dünndarm wurde mit PBS (4 °C) gespült. Ein Teil des Darms wurde anschließend in Längsrichtung aufgeschnitten und inkubierte 30 min bei 4 °C in kalziumfreier Lösung: 96 mM NaCl; 8 mM Kaliumdihydrogenphosphat; 56 mM Natriumdihydrogenphosphat; 15 mM KCl und 10 mM EDTA, pH 6,8. Die Zellsuspension zentrifugierte für 10 min bei 500 rpm. Das Sediment wurde unter dem Phasenkontrastmikroskop geprüft und enthielt nur noch Enterozyten. Diese wurden in Laemmli Sample Puffer aufgenommen und das so erhaltene Lysat nach gelelektrophoretischer Auftrennung einer Western-Blot-Analyse unterworfen. Parallel dazu wurden aus Enterozyten mitochondriale Extrakte hergestellt (siehe 3.2.6).

### **3.2.8 Isolierung von Nukleinsäuren**

#### **3.2.8.1 RNA-Isolierung aus Zellen mit RNAzol B™ oder RNAPure™**

Die Zellen wurden nach 2-wöchiger Anzucht in Zellkultur-Medien in jeweils 7,5 ml RNAzol B™ (Wak-Chemie) oder 2,5 ml RNAPure™ (peQLab) aufgenommen, lysiert und resuspendiert. Je 1 ml der Lösung wurde in ein Eppendorfgefäß überführt, mit 100 µl Chloroform versetzt und 20 s lang vorsichtig durchmischt. Nach einer 5 min-Inkubation auf Eis und Zentrifugation bei 4 °C (15 min, 12.000 rpm) wurde die obere, wässrige Phase des RNAzol-Chloroform-Zell-Gemisches in ein DEPC-behandeltes Eppendorfgefäß überführt und mit gleichen Teilen Isopropanol versetzt. Die Lösung konnte dann gut durchmischt optional bei 4 °C über Nacht gelagert werden, oder es erfolgte eine 15 min-Zentrifugation bei 12.000 rpm und 4 °C. Nach dem Entfernen des Überstandes musste das Sediment mit DEPC-behandeltem Ethanol (75 %) versehen und gemischt werden. Danach wiederholte sich für 8 min eine weitere Zentrifugation (12.000 rpm, 4 °C), so dass der Überstand quantitativ entfernt werden konnte. Der Niederschlag wurde schließlich an der Luft getrocknet. Das RNA-Sediment wurde in

200 µl DEPC-behandeltem Aqua bidest. (Ampuwa®) gelöst, mit 20 µl 3 M RNA geeignetem Natriumazetat (pH 5,2) und dem 2,5-fachen Volumen Ethanol (95 %) gefällt und bei -20 °C über Nacht gelagert. Nach einer 30 min-Zentrifugation bei 17.000 rpm und 4 °C wurde nach dem Entfernen des Überstandes der Niederschlag mit 1 ml DEPC-behandeltem Ethanol (80 %) gewaschen. Erst nach wiederholter Zentrifugation (15 min, 17.000 rpm, 4 °C) und quantitativem Entfernen des Überstandes wurde das Sediment an der Luft kurz getrocknet und in 100 µl DEPC-behandeltem Aqua bidest. (Ampuwa®) gelöst. 5 µl dieser Lösung wurden für eine spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung eingesetzt (siehe 3.2.12).

#### **3.2.8.2 RNA-Isolierung aus Geweben mit RNAzol B™ oder RNAPure™**

Das gefrorene Gewebe (-70 °C) wurde in einem Mörser in flüssigem Stickstoff zerkleinert. Mit RNAzol B™ (20 µl/mg, Wak-Chemie) oder RNA Pure™ (peQLab) versetzt, wurde zur weiteren Zerkleinerung das Gewebelysat durch eine Kanüle gepresst, mit 100 µl/ml Chloroform versetzt und 20 s durchmischt. Die daran anschließenden Schritte erfolgten nach den Angaben des Herstellers.

#### **3.2.8.3 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA mit dem Qiagen-Aufreinigungssystem**

2 ml (100 ml) einer entsprechenden Übernachtskultur wurden in ein 2 ml Eppendorfgefäß (500 ml Zentrifugenglas) pipettiert und 10 min bei 6.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Aufarbeitung des Bakteriensediments erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

#### **3.2.8.4 Präparative Plasmid-Isolierung (Plasmidschnellanalyse; Birnboim und Doly, 1979)**

Das Bakteriensediment wurde in 300 µl P1-Puffer (50 mM Tris/HCl und 10 mM EDTA pH 8,0) resuspendiert, mit 300 µl frisch angesetztem P2-Puffer (5 M NaOH, 10 % SDS ad Aqua dest.) versetzt und das Bakterienlysat vorsichtig gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation und Zugabe von 300 µl 2,55 M Kaliumazetat (pH 4,8) erfolgte die Zentrifugation bei 14.000 rpm für 15 min. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfröhrchen pipettiert, mit 700 µl Isopropanol versetzt und erneut für 15 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und der Niederschlag bei Raumtemperatur 15 min lang getrocknet, ehe er in 100 µl Aqua dest. gelöst werden konnte.

#### **3.2.8.5 Plasmid-Maxipräparation**

Die Durchführung erfolgte nach den Angaben von Qiagen und wurde wie folgt modifiziert.

500 ml einer entsprechenden Bakterienkultur wurden im JA 10-Zentrifugenbecher für 15 min bei 6.000 rpm und 4 °C in einer Kühlzentrifuge (Beckman) zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes erfolgte die Aufnahme des Bakteriensediments in 10 ml Puffer P1, und die daran anschließende Zugabe von 10 ml Puffer P2 für 5 min. Mit 10 ml Puffer P3 (vorgekühlt auf 4 °C) wurde das Bakterienlysat neutralisiert. Der 30-minütigen Zentrifugation bei 15.000 rpm folgte das Überführen des klaren Überstandes auf eine mit QBT-Puffer prä-äquilibrierte Qiagen 500-Säule. Es folgten zwei Waschschrte mit jeweils 2 x 30 ml QC-Puffer. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 15 ml QF-Puffer eluiert, die nukleinsäurehaltige Lösung mit 10 ml Isopropanol versetzt und sofort zentrifugiert (30 min, 15.000 rpm, 4 °C). Nach dem Waschen des Sediments mit 2 x 70 %igem Ethanol und Lufttrocknung wurde die DNA in 400 µl Aqua dest. aufgenommen. Die DNA-Ausbeute betrug durchschnittlich etwa 1 µg/µl.

### 3.2.9 Methoden der DNA-Präzipitierung

#### 3.2.9.1 Ethanol-Fällung (Zeugin und Harley, 1985)

Bei der Ethanolfällung handelt es sich um eine Methode, DNA von Salzen zu reinigen und zu konzentrieren. Dabei wird die DNA in Gegenwart einer hohen Salzkonzentration mit Ethanol aus einer wässrigen Lösung gefällt, durch Zentrifugation sedimentiert und anschließend in einem entsprechenden Volumen Aqua dest. gelöst.

Hierzu wurden wässrige Nukleinsäurelösungen mit 3 M Natriumazetat, pH 5,2 auf 0,3 M Natriumazetat eingestellt und mit dem 2,5-fachen Volumen Ethanol versetzt. Die Lösungen wurden für 5 min in flüssigem Stickstoff eingefroren oder für mindestens 1 Stunde bei -20 °C gelagert, bevor sie zentrifugiert wurden. Die Zentrifugation erfolgte für mindestens 30 min in einer Tischzentrifuge bei 13.000 rpm und 4 °C. Das DNA-Sediment wurde mit kaltem (-20 °C) 70 %igem Ethanol gewaschen, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in Aqua dest. aufgenommen.

#### 3.2.9.2 Isopropanol-Fällung

Die Isolierung von Plasmid-DNA mit Hilfe der Plasmidschnellanalyse (siehe 3.2.8.4) oder mit dem Qiagen-Aufreinigungs-System (siehe 3.2.8.3) erfolgte durch eine Isopropanolfällung. Hierzu wurde die nukleinsäurehaltige Lösung mit dem 1-fachen oder 0,7-fachen Volumen Isopropanol gefällt und zur Sedimentierung für mindestens 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Das DNA-Sediment wurde schließlich in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in Aqua dest. aufgenommen.

### 3.2.10 Auftrennung von Nukleinsäuren und Proteinen

#### 3.2.10.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten, kamen Agarosegele zum Einsatz. Bei der Agarose-Gelelektrophorese nimmt die Agarosekonzentration entscheidenden Einfluss auf das DNA-Auftrennungsvermögen. Im Normalfall wurde eine Agarosekonzentration von 0,8 % bis 1 % gewählt. Wenn es die Fragmentgröße erforderte, konnte die Konzentration auch zwischen 0,4 % und 2 % variiert werden.

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Agarosegelkonzentration im Verhältnis zur DNA-Fragmentlänge, wobei es sich hier nur um Richtwerte handelt.

Konzentration des Agarosegels (%[w/v])	Fragmentlänge linearisierter DNA (bp)
0,3	5.000 bis 60.000
0,6	1.000 bis 20.000
0,8	1.000 bis 10.000
0,9	500 bis 7.000
1,2	400 bis 6.000
1,5	200 bis 3.000
2,0	100 bis 2.000

**Quelle: Maniatis et al., 1982**

Je nach Prozentigkeit des Geles wurden entsprechende Mengen Agarose in TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst und nach dem Abkühlen auf 50 °C in einen Gelträger gegossen. Mit Hilfe eines Kunststoffkammes entstanden nach dem Aushärten in den Gelen Auftragstaschen, die mit den Proben gefüllt wurden.

Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Vol. Probenpuffer (0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylenzanol; 40 % Saccharose) versetzt und zur Elektrophorese in die geformten Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard wurden F- bzw. SLL-Marker (siehe 3.1.7) eingesetzt. Die angelegte Spannung betrug während der Elektrophorese je nach der Größe der Gelkammer bzw. des Gels 80-120 Volt. Zur Sichtbarmachung der DNA wurden die Gele in Ethidiumbromidlösung (2 µg/mL EtBr in Aqua dest.) gegeben, auf einem UV-Transilluminator gelegt und fotografiert.

Bei Verwendung von RNA erfolgte die Durchführung der Elektrophorese wie oben beschrieben. Dazu mußte die Elektrophoresekammer zuvor gründlich mit 95 %igem Ethanol gereinigt werden. Die Herstellung des RNA-Gels erfolgte wie unten beschrieben, wobei dem Gel zusätzlich Ethidiumbromid zugesetzt wurde. Nachdem das RNA-Gel fotografiert worden war, kam es für den Northern-Blot für 20 min in 0,05 N NaOH und 2 x 15 min in 20x SSC. Alle Arbeitsschritte wurden mit Handschuhen durchgeführt. Die Gelschlitten und die Schablone wurden mit 70 %igem Ethanol gereinigt.

Lauf-Puffer:	5x Gellauf-Puffer im Verhältnis 1:5 mit Aqua dest. mischen.
Agarosegel:	250 mg Agarose; 15,5 ml steriles Aqua dest.; 5 ml 5x Gellauf-Puffer; 4,5 ml 37 % deionisiertes Formaldehyd mischen.
RNA-Probe:	4,5 µl RNA (30 µg); 2 µl 5x Gellauf-Puffer; 3,5 µl deionisiertes Formaldehyd; 10 µl deionisiertes Formamid mischen und bei 65 °C 15 min inkubieren. Dann 2 µl 6x Auftragspuffer und 1 ml Ethidiumbromid (1 %) hinzugeben, kurz zentrifugieren (14.000 rpm) und sofort verwenden.
Auftragspuffer:	5,6 g Glyzerol (100 %); 20 µl 0,5 M EDTA; 2,5 ml Bromphenolblau (1 %); 2,5 ml Xylenzanol (1 %) ad 10 ml Aqua dest. aliquotieren und bei -20 °C lagern.
Formaldehyd deionisieren:	5 g Ag 501-X8 Harz (Bio-Rad, München) mit 50 ml Formaldehyd (37 %) 30 min bei Raumtemperatur rühren. Bei pH 7 Lösung steril filtrieren und im Dunkeln bei Raumtemperatur lagern.
Formamid deionisieren:	Wie Formaldehyd, nur Zugabe von 10 ml Formamid, steril filtrieren und bei -20 °C lagern.
5x Gellauf-Puffer:	200 ml 1 M MOPS; 16 ml 3 M Natriumazetat; 0,5 M EDTA mit Aqua dest. ad 1 l und steril filtrieren.

### 3.2.10.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Proteinauftrennung macht man sich die Polyacrylamid-Gelelektrophorese zunutze. Die Proteine laufen vom negativen zum positiven Pol, wobei kleinere Moleküle schneller laufen als größere. Bei der SDS-PAGE werden sie nicht nach ihrer Ladung, sondern ausschließlich nach ihrer Größe aufgetrennt.

Als Größenmarker wurde der EPL-Längenstandard bzw. der peqGold-Marker (siehe 3.1.8) eingesetzt. Diese inkubierten vor dem Auftragen parallel mit den Proben bei 96 °C für 2 min. Die SDS-PAGE erfolgte in Elektrophoresepuffer bei 80 Volt (Sammelgel) bzw. 180 Volt (Trenngel) für etwa 1,5 Stunden.

Sammelgel:	3,1 ml Aqua dest.; 0,6 ml Acrylamid (30 %); 1,25 ml 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8); 50 µl SDS (10 %); 30 µl APS (10 %) und 15 µl TEMED mischen.
Trenngel (10 %):	4,05 ml Aqua dest.; 3,35 ml Acrylamid (30 %); 2,5 ml 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8); 0,1 ml SDS (10 %); 60 µl APS (10 %) und 30 µl TEMED mischen.

5x Elektrophorese- 10 g SDS; 144 g Glyzin; 30 g Tris/HCl ad 2 l mit Aqua dest. Vor  
puffer (2 l):                    Gebrauch 1:5 mit Aqua dest. verdünnen.

### 3.2.11 Gel-Elution von DNA

#### 3.2.11.1 Elution von DNA durch Membranfilter

Es wurde das Jetquick® Gel-Extraktions-Kit von Genomed verwendet. Es ermöglichte die Isolierung und Aufreinigung von DNA aus einem Agarosegel innerhalb von 30 min. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

#### 3.2.11.2 Elution von DNA mittels Ultrafiltration

Die DNA-Fragmente wurden unter Verwendung von Ultrafree MC-Filtereinheiten (0,45 µm) aus der Agarose eluiert. Dazu wurde die gewünschte DNA-Bande aus dem Agarosegel herausgeschnitten und in das Probenreservoir einer Ultrafree MC-Filtereinheit überführt. Da nicht alle Gelstücke ins Probenreservoir passten, wurden diese sequenziell für 10 min bei 10.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Das so gewonnene DNA-haltige Filtrat wurde gefällt und anschließend für die Ligation (siehe 3.2.16.1) verwendet.

### 3.2.12 Spektralphotometrische Messungen und Berechnungen

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA- und RNA-Lösungen wurden Absorptionsmessungen im UV-Bereich von 280 nm und 260 nm durchgeführt. Sie erfolgten in Quarzküvetten mit 1 cm Schichtdicke. Als Richtwert für die Konzentrationsbestimmung gilt für:

doppelsträngige DNA: 1 OD<sub>260 nm</sub> entspricht 50 µg/ml  
einzelsträngige RNA: 1 OD<sub>260 nm</sub> entspricht 40 µg/ml

Der Quotient (OD<sub>260 nm</sub>/OD<sub>280 nm</sub>) stellt ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäurelösung dar und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

### 3.2.13 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Saiki et al., 1985) erlaubt die spezifische *in vitro*-Amplifizierung von DNA und RNA. Sie besteht aus repetitiven Zyklen von DNA-Denaturierungen, DNA-Oligonukleotid-Hybridisierungen und Oligonukleotid-Elongationen. Den zentralen Baustein dieser Reaktion bildet eine thermostabile DNA-Polymerase, die aus einem thermophilen Eubakterium (*Thermus aquaticus* Stamm YT1) isoliert wurde und ihre optimale Enzymaktivität bei 72 °C besitzt. Mit Hilfe der PCR werden wenige DNA-Kopien von 10<sup>6</sup> exponentiell vermehrt. Diese Kopien lassen sich dann in einer anschließenden Agarose-Gelelektrophorese detektieren (Linz und Degenhardt, 1990). Eine Polymerase-Kettenreaktion hatte folgenden Standard-Reaktionszyklus, der 30-40 mal wiederholt wurde.

Denaturierung der Matrizen-DNA: 94 °C/30 s bis 1 min  
Assoziation der Oligonukleotide: 50 bis 65 °C/30 s bis 2 min  
Elongation: 72 °C/30 s bis 3 min

Die Temperatur für die DNA-Oligonukleotid-Hybridisierung ist von der Länge und der Basenzusammensetzung der verwendeten Oligonukleotide (siehe 3.1.16) abhängig. Für die Hybridisierung wurde meist eine Temperatur gewählt, die 2-10 °C unterhalb der Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) des Oligonukleotids lag. Zur Klonierung amplifizierter DNA enthielten die verwendeten Oligonukleotide an ihren 5'-Enden häufig



Erkennungssequenzen für Hexanukleotid-spezifische Restriktionsenzyme. Ihre Schnittstellen wurden 5'-terminal zusätzlich von zwei bis drei G/C-Basen flankiert. Diese Basen wurden bei der Berechnung der Oligonukleotid-Schmelztemperatur nicht berücksichtigt.

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 4(\text{G}+\text{C}) + 2(\text{A}+\text{T})$$

In dieser Arbeit kam Plasmid-DNA sowie revers transkribierte RNA zum Einsatz. Die PCR wurde mit kommerziell erhältlichen Reagenzien durchgeführt. Die repetitiven Temperaturzyklen erfolgten in einem DNA Temperatur-Zykler von Eppendorf.

### 3.2.13.1 Amplifizierung von DNA

Im Allgemeinen wird mit der *Taq*-Polymerase amplifiziert. Diese hat allerdings eine Fehlerrate von  $2,6 \cdot 10^{-5}$ , was mit zunehmender Fragmentlänge eine Erhöhung der Fehler bedeutet. Es entsteht ein ungenaues Amplifikat (Lundberg et al., 1991).

Aus diesem Grunde werden solche Ansätze DNA-Polymerasen mit 3'-5' Exonuklease-Aktivität zugesetzt. Auf diesem Prinzip beruht das Expand High Fidelity™ PCR System von Roche. Hier enthält der Ansatz, neben der AMV reversen Transkriptase und *Taq* DNA-Polymerase, zusätzlich eine *Pwo* DNA-Polymerase. Mit diesem System durchgeführte PCRs hatten somit folgende Zusammensetzung:

Ansatz 1: 2 µl dNTPs (10 mM), je 2 µl Oligonukleotid (10 pmol/µl), 43 µl Aqua dest. und 1 µl DNA-Probe (100 ng/µl)

Ansatz 2: 10 µl 10x PCR-Puffer (mit Magnesiumchlorid, 25 mM), 0,75 µl Enzym-Gemisch und 39,25 µl Aqua dest. Der 100 µl Ansatz wurde nach dem nachstehenden Thermoprofil amplifiziert.

Vor Beginn der PCR wurden die Ansätze 1 und 2 zusammengegeben. Das Thermoprofil hatte folgende Zusammensetzung.

94 °C	2 min	10 x
94 °C	45 s	
50 °C	45 s	
72 °C	1,5 min	
94 °C	45 s	20 x
50 °C	45 s	
72 °C	1,5 min mit 5 s Zeitinkrement	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

### 3.2.13.2 Amplifizierung revers-transkribierter RNA (RT-PCR)

Nach einer reversen Transkription von RNA in cDNA kann diese mit Hilfe der PCR vermehrt werden. In dieser Arbeit wurde u. a. menschliche Nieren-RNA, embryonale Maus-RNA, und die RNA aus verschiedenen kultivierten Zelllinien als Ausgangs-RNA eingesetzt. Bei allen RT-PCRs kam das Titan™ One Tube RT-PCR System von Boehringer zum Einsatz. Für eine Standard reverse Transkriptasereaktion wurden zwei voneinander unabhängige Ansätze pipettiert:

Ansatz 1: 1 µl dNTPs (10 mM); je 4 µl Oligonukleotid (10 pmol/µl); 2,5 µl DTT (100 mM); 0,25 µl RNase Inhibitor (40 u/µl); 12,25 µl Aqua bidest. (steril); 1 µl RNA (0,5-1 µg) = 25 µl *Zwischenvolumen*

Ansatz 2: 10 µl 5x RT-PCR Puffer; 14 µl steriles Aqua bidest. (DEPC-behandeltes Ampuwa®; Fresenius), 1 µl Expand™ High Fidelity Enzym-Mix = 50 µl *Endvolumen*

Der Enzym-Mix von Boehringer enthielt die reverse Transkriptase AMV. Die Assoziationstemperatur wurde den Kanadaptin-Oligonukleotiden angepasst und lag 5 °C unterhalb der T<sub>m</sub> min-Temperatur. Folgendes Temperaturprofil wurde gewählt:

50 °C	30 min	Reverse Transkription	
94 °C	2 min	Denaturierung	
94 °C	30 s	Denaturierung	10 x
52 °C	30 s	Hybridisierung	
68 °C	1 min	Elongation	
94 °C	30 s	Denaturierung	25 x
52 °C	30 s	Hybridisierung	
68 °C	1 min	Elongation	
68 °C	7 min	Elongation	
4 °C	∞		

### 3.2.13.3 Plasmid-PCR

Die Plasmid-PCR beruht auf dem Prinzip einer einfachen PCR (siehe 3.2.13.1), und wurde in Gegenwart zirkularisierter Plasmid-DNA durchgeführt. Die Plasmid-PCR diente der schnellen Identifizierung rekombinanter Plasmide. Hierzu wurden Oligonukleotide so positioniert, dass eine Aussage sowohl über die Insertion als auch über die Orientierung der Insertion gemacht werden konnte.

Ein typischer Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

2 µl dNTP (10 mM); 20 µl Magnesiumchlorid (25 mM); 10 µl 10x PCR-Puffer; 4 µl Oligonukleotid 1 (10 pmol/µl); 4 µl Oligonukleotid 2 (10 pmol/µl); 58 µl Aqua dest.; 1 µl DNA-Matrize (100 ng/µl); 1 µl *Taq*-Polymerase (1 u/µl; MBI Fermentas)

Die Zugabe der *Taq*-Polymerase erfolgte im letzten Drittel der 5 min-Denaturierung. Dieser Schritt verhindert eine frühzeitige Inaktivierung des Enzyms und optimiert die Amplifizierungsausbeute. Die Oligonukleotid-Assoziation erfolgte 5 °C unterhalb der T<sub>m</sub> min-Temperatur. Die Temperaturzyklen wurden wie folgt gewählt:

94 °C	5 min	Denaturierung	⇒ Zugabe der <i>Taq</i> -Polymerase
94 °C	1 min	Denaturierung	40 x
50 °C	1 min	Hybridisierung	
72 °C	1 min	Elongation	
72 °C	10 min	Elongation	
4 °C	∞		

### 3.2.13.4 Linker-PCR

Im Unterschied zur Standard-PCR besteht die Linker-PCR aus Oligonukleotiden, die neben der DNA-spezifischen Sequenz einen zusätzlichen Sequenzbereich aufweisen. Dieser beinhaltet eine Erkennungssequenz für eine Restriktionsendonuklease, die in

der DNA-Matrize nicht schneidet, für eine nachfolgende Ligation (siehe 3.2.16.1) aber benötigt wird.

Bei der Linker-PCR ist es in manchen Fällen notwendig, zunächst einige Zyklen mit einer niedrigeren Hybridisierungstemperatur durchzuführen und die Temperatur erst später auf das Optimum der Linker-Oligonukleotide zu erhöhen.

Bei der Linker-PCR ist es erforderlich, zunächst einige Zyklen mit einer niedrigeren Assoziationstemperatur durchzuführen und die Temperatur erst später auf das Optimum des Linker-Oligonukleotids zu erhöhen. Das wird nötig, wenn nur einer der Oligonukleotide ein Linker-Oligonukleotid ist oder die Schmelztemperaturen der Oligonukleotide wegen der nichtkompatiblen Sequenzen zu weit auseinander liegen.

### **3.2.13.5 Asymmetrische Amplifizierung von Amplifikaten (McCabe, 1989)**

Die Methode entwickelte McCabe (Perkin Ellmer Cetus Amplifications, 1989, Issue 3, Asymmetric Polymerase Chain Reaction). Bei der asymmetrischen Amplifizierung wird das erste Oligonukleotid in geringer (1 pmol/µl) und das zweite in höherer Konzentration (100 pmol/µl) dem Reaktionsansatz beigelegt. Dadurch erreicht man, dass ein Teil des Amplifikats später einzelsträngig vorliegt.

### **3.2.13.6 Kombinierte Linker-PCR (Gesamtlängen-Amplifizierung)**

Die kombinierte Linker-PCR wurde zur Generierung der vollständigen humanen Kanadaplin cDNA eingesetzt. Hierzu wurden in einem gemeinsamen Ansatz zuvor mit Hilfe der RT-PCR (1. Schritt) separat hergestellte, mittig überlappende 5'- bzw. 3'-spezifische Amplifikate der humanen Kanadaplin cDNA denaturiert, renaturiert und diese daran anschließend zur Vollängen-Amplifizierung einer konventionellen High-Fidelity PCR (2. Schritt) unterzogen.

Hierzu wurde das Expand High Fidelity™ PCR System (1. Schritt) sowie das Expand™ Long Template PCR-System (2. Schritt) eingesetzt.

*Schritt 1 (Generierung überlappender cDNA-Fragmente):*

Ansatz 1: 2 µl dNTPs (10 mM), je 1 µl RNA (50 ng/µl) und 47 µl Aqua dest.

Ansatz 2: 10 µl 10x PCR-Puffer (mit Magnesiumchlorid, 25 mM), 0,75 µl Enzym-Gemisch und 39,25 µl Aqua dest.

*Schritt 2 (Generierung der Vollängen cDNA):*

Ansatz 1: 1,75 µl dNTPs (10 mM), je 2 µl Oligonukleotid (10 pmol/µl), 1 µl der jeweiligen 5'- bzw. 3'-spezifischen cDNA aus *Schritt 1*, 18,25 µl Aqua dest.

Ansatz 2: 5 µl 10 x PCR-Puffer (mit Magnesiumchlorid, 25 mM), 0,75 µl Enzym-Gemisch, 19,25 µl Aqua dest.

PCR-Thermo-Profil für Schritt 1:

94 °C	2 min
50 °C	30 s
72 °C	10 min

PCR-Thermo-Profil für Schritt 2:

94 °C	2 min	10 x
94 °C	30 s	
50 °C	30 s	

72 °C	1,5 min	20 x
94 °C	30 s	
50 °C	30 s	
72 °C	1,5 min mit 5 s Zeitinkrement	
72 °C	7 min	
4 °C	∞	

### 3.2.14 Restriktion

Restriktionsenzyme wurden nach den Angaben des Herstellers in entsprechenden Puffersystemen eingesetzt. Das Volumen des Restriktionsansatzes war von der eingesetzten DNA-Menge abhängig. Weiterhin betrug die eingesetzte Enzymmenge nicht mehr als 1/10 des Restriktionsansatzes, da die Enzyme Glyzerin enthielten und sich dieses in zu hohen Dosen negativ auf die Enzymaktivität auswirkt. Ein Standardverdau enthielt 1-2 µg DNA, 1x Restriktionspuffer, 5 units Enzym pro µg DNA und in manchen Fällen RNase A. Das Volumen eines solchen Ansatzes betrug 20 µl. Die Inkubationszeit lag zwischen 2 und 4 Stunden. Es folgte die Auftrennung der verdauten Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.2.10.1).

### 3.2.15 Dephosphorylierung von DNA

Die unerwünschte Rezirkularisierung linearisierter Plasmid-DNA in einer Ligationsreaktion wurde durch eine Behandlung der DNA mit alkalischer Phosphatase aus dem Kälberdarm verhindert. Dieses Enzym entfernt Phosphatgruppen am 5'-Ende der DNA. Die linearisierte DNA (siehe 3.2.14) wurde zunächst gefällt (siehe 3.2.9) und das Sediment nach 30-minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm in 15 µl Aqua dest. gelöst. Dann erfolgte die Behandlung der gefällten DNA mit alkalischer Phosphatase. Der Dephosphorylierungsansatz bestand aus 15 µl restringierter Plasmid-DNA, 5 µl 10x CIAP-Puffer, 1 µl alkalischer Phosphatase (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, CIAP), 29 µl Aqua dest. und inkubierte für 30 min bei 37 °C (5'-überstehende Enden) bzw. 56 °C (glatte- und 3'-überstehende Enden). Die so behandelte DNA wurde Ethanol-gefällt (siehe 3.2.9.1).

### 3.2.16 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit überstehenden oder glatten Enden wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Sie baut das DNA-Fragment in den linearisierten Vektor ein. Ein typischer Ligationansatz hatte folgende Zusammensetzung:

100 ng	linearisierter Vektor
1,5 µl	10x Ligase-Puffer
1 µl	T4-DNA-Ligase (3 u/µl)
300 ng	DNA-Fragment
15 µl	Endvolumen

Der Ligrationsansatz inkubierte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag erfolgte nach Zugabe von 1 µl T4-DNA-Ligase eine Nachinkubation für 5 Stunden bei RT. Anschließend wurde der Ligrationsansatz für die Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen (DH5α<sup>TM</sup>) eingesetzt (siehe 3.2.17).

### 3.2.16.1 Ligation von PCR-Amplifikaten in den T-Vektor (Marchuk et al., 1991)

Auf Grund ihrer terminalen Transferaseaktivität hängt die thermostabile DNA-Polymerase (*Taq*) aus *Thermus aquaticus* ein zusätzliches Deoxyadenosin (dA) an die von ihr amplifizierte PCR-Produkte an (Clark, 1988). Dieser Vorgang erfolgt zu annähernd 100 %. Diesen dA-Überhang macht man sich bei der Klonierung zunutze, indem man die *Taq*-Polymerase einsetzt, um an den glattendig aufgeschnittenen Klonierungsvektor ein Desoxythymidin anzuhängen. Ein auf dieser Klonierungsstrategie basierender Vektor ist der pGEM®-T Vektor der Firma Promega. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Das System wurde zur Sicherung von Amplifikaten bzw. für Zwischenklonierungen eingesetzt.

### 3.2.16.2 Religation linearisierter Plasmid-DNA

Die Religation linearisierter Plasmid-DNA wurde wie unter 3.2.16 beschrieben durchgeführt. Dem Ansatz wurde jedoch kein DNA-Fragment zugegeben und hatte demnach folgende Zusammensetzung:

100 ng	linearisierter Vektor
1,5 µl	10x Ligase-Puffer
1,0 µl	T4-DNA-Ligase (3 u/µl)
15,0 µl	Endvolumen

Der Ansatz inkubierte bei 4 °C über Nacht, ehe am nächsten Tag erneut 1,0 µl T4-DNA-Ligase hinzugegeben wurde.

## 3.2.17 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Zellen

### 3.2.17.1 Herstellung PEG-kompetenter *E. coli*-Zellen (Nishimura et al., 1990)

100 ml LB-Medium mit 10 mM Magnesiumsulfat, 0,2 % Glukose wurden mit 1 ml *E. coli* DH5α™-Übernacht-Flüssigkultur versetzt und bis zu einer OD<sub>590</sub> von 0,4/ml inkubiert. Anschließend wurden die Bakterienkultur für 10 min auf Eis abgekühlt. Die Zellen wurden 10 min bei 1.500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen in 0,5 ml LB-Medium, 10 mM Magnesiumsulfat und 0,2 % Glukose resuspendiert. Der Suspension wurden schließlich 2,5 ml LB-Medium, 36 % Glyzerin und 12 % Polyethylenglykol (PEG) zugesetzt. Die Aufbewahrung der kompetenten Zellen erfolgte in 100 µl-Aliquots bei -80 °C.

### 3.2.17.2 Hitzeschocktransformation (Hanahan, 1983)

Ein 100 µl-Aliquot kompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut, während parallel in einem 12 ml Greiner-Röhrchen 7,5 µl des Ligationsansatzes (siehe 3.2.16) vorgelegt wurden. Nach Zugabe der kompetenten Zellen zum Ligationsansatz wurde der Ansatz 30 min auf Eis, dann 1,5 min im 42 °C-Wasserbad (Hitzeschock) und 5 min erneut auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium (mit 10 mM Magnesiumchlorid, 10 mM Magnesiumsulfat und 20 mM Glukose versetzt) kam es zu einer 1-stündigen Inkubation bei 37 °C im Rotationsinkubator (200 rpm). Es folgte eine Zentrifugation von 1 min bei 5.000 rpm und das Verwerfen von 700 µl des Überstandes. In den übrigen 100 µl wurden das Sediment resuspendiert und auf eine entsprechende LB-Agar-Selektivplatte verteilt. Die Platte inkubierte über Nacht bei 37 °C.

### 3.2.17.3 Präparation elektrokompetenter Zellen (Walter et al., 1991)

Nach der Anzucht einer DH5α-Starterkultur über Nacht in SOB-Medium ohne Magnesium wurden 250 ml Kulturkolben mit 1,25 ml der Starterkultur angeimpft und im Schüttler bei 37 °C und 300 rpm schüttelnd bis zu einer OD<sub>580</sub> von 1,0 inkubiert.

Danach wurden die Anzuchtkolben auf 4 °C abgekühlt. Die Zellen wurden in sterile 50 ml Falkonröhrchen überführt und bei 2.500 rpm für 10 min und 4 °C zentrifugiert und das Sediment in 500 ml 10 %igem eiskaltem Glycerin auf Eis resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen erneut bei 2.500 rpm für 10 min und 4 °C zentrifugiert, das Sediment nochmals in etwa 100 ml 10 %igem, eiskaltem Glycerin auf Eis resuspendiert und schließlich bei 2.000 rpm für 10 min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und vom Sediment 2 µl in 998 µl 10 %igem Glycerin aufgenommen. Die OD<sub>580</sub> dieser 1:500-Verdünnung sollte etwa 0,4 betragen. Zu dünner Zellbrei musste erneut zentrifugiert werden. Dem so eingedickten Zellbrei wurde soviel 50 %ige Glycerinlösung zugesetzt, dass das Glycerin eine Endkonzentration von 20 % hatte. Die Zellen wurden zu je 42 µl in Eppendorfreaktionsgefäße portioniert und bei -70 °C eingefroren.

Alle verwendeten Lösungen, Rotoren bzw. Zentrifugen wurden auf 4 °C vorgekühlt. Bevor die Zellen zur Transformation eingesetzt wurden, erfolgte die Bestimmung der Transformationseffizienz. Dazu wurden 100 pg und 10 pg eines Plasmids transformiert und 10 µl sowie 100 µl auf eine entsprechende Antibiotika-enthaltene LB-Agarplatte plattiert. Die Transformationsrate lag bei 10<sup>9</sup> µg Plasmid. Parallel dazu wurde ein Kontrollansatz ohne Plasmid ausplattiert.

SOB-Medium ohne 20 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefeextrakt und genau 0,5 g Magnesium: NaCl in 950 ml Aqua dest. lösen, 10 ml 250 mM KCl zugeben und mit NaOH auf pH 7,0 einstellen. Mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen. In Portionen von je 250 ml in Anzuchtkolben geben und autoklavieren.

#### **3.2.17.4 Elektroporation (Walter et al., 1991)**

Bei der Elektroporation wurden 2-5 µl des Ligationsansatzes zu einem 42 µl-Aliquot elektrokompenter Zellen (siehe 3.2.17.3) gegeben, vermischt und luftblasenfrei in eine sterile Gene-Pulser<sup>TM</sup>-Küvette (Bio-Rad) pipettiert.

Die Küvette wurde in den Elektroporator eingesetzt und der Ansatz bei 1,6 kV, 30 µF und 200 Ohm elektroporiert. Daran anschließend wurde direkt 1 ml TB-Medium in die Küvette gegeben und die elektroporierte Bakteriensuspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach einer 60 min-Inkubation bei 37 °C und Zentrifugation (2 min, 10.000 rpm) wurden die sedimentierten Bakterien in 100 µl LB-Medium aufgenommen und auf einer Antibiotikum-enthaltenden Agarplatte ausplattiert. Die ausgestrichenen Zellen inkubierten bei 37 °C über Nacht.

TB-Medium: 12 g Casein-Hydrolysat (Bacto-Trypton); 24 g Hefeextrakt (Bacto-Hefeextrakt); 2,3 g Kaliumhydrogenphosphat; 5 g Glycerin ad 1 l mit Aqua dest., autoklavieren.

#### **3.2.18 Herstellung von Bakterien-Dauerkulturen**

Zur Langzeitaufbewahrung wurden von entsprechenden Zellen Glycerol-enthaltene Dauerkulturen hergestellt. Für die Herstellung von Dauerkulturen aus Flüssigkulturen wurde 1 ml einer Übernachtskultur mit 200 µl sterilem 87 %igem Glycerin (mit PBS verdünnt) versetzt und bei -80 °C gelagert. Bei der Herstellung von Dauerkulturen wurden auch Bakterien bewachsene LB-Amp-Platten verwendet, Hierfür wurden 2 ml einer Glycerinlösung (50 ml 2-fach LB-Medium, 30 ml 87 % Glycerin und 20 ml Aqua dest.) auf eine entsprechend bewachsene LB-Amp-Platte gegeben und diese für 30 min inkubiert. Die bakterienhaltige Glycerinlösung wurde schließlich mit einem Spatel von der Oberfläche abgezogen, in ein Eppendorfgefäße überführt und bei -80 °C gelagert.

### **3.2.19 Sichtbarmachung und Dokumentation von Nukleinsäuren und Proteinen**

#### **3.2.19.1 Sichtbarmachung von Nukleinsäuren**

Das Agarosegel wurde zur Sichtbarmachung der elektrophoretisch aufgetrennten DNA für wenige Minuten in eine Ethidiumbromid-Fertiglösung (10 mg/l) gelegt. Anschließend konnten die Nukleinsäurefragmente als Banden auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und mit der MP4-Polaroidkamera (Polaroid, England) inklusive orange-rot Filter (ISO 3000/36°, Bachhofer) fotografiert werden.

#### **3.2.19.2 Proteinfärbung mit Coomassie-Blau**

Das Acrylamidgel wurde 15 min in Coomassie-Blau-Lösung inkubiert, die Lösung dekantiert und das Gel in Leitungswasser durch mehrmaliges Aufkochen in der Mikrowelle entfärbt.

Coomassie-Blau-Lösung:	0,25 g Coomassie® Brilliantblau R 250 in 90 ml Methanol:Aqua dest. (1:1 v/v) und 10 ml Eisessig lösen und durch einen Whatman No. 1 Filter geben.
------------------------	---

### **3.2.20 Immunfluoreszenz-Untersuchungen an Geweben und kultivierten Zellen**

Zur Gefriertrocknung wurden aus erwachsenen Wistar-Ratten kleine Nierenstücke präpariert und sofort in ein mit Isopentan (in flüssigem Stickstoff vorgekühlt) gefülltes Behältnis gegeben. Anschließend wurde das Gewebe in ein Röhrchen mit flüssigem Stickstoff überführt, mit Gaze und Gummiring verschlossen und in eine auf -60 °C vorgekühlte Gefriertrocknungsanlage gestellt. 24 Stunden später wurde frisch entgastes Epon-Kunstharz über die Gewebestücke gegeben und der Ansatz für weitere 2 Tage entgast. Nach Überführung der Epon-eingebetteten Gewebestücke in Gelatine kapseln und Auspolymerisieren in frischem Epon (bei 65 °C) wurden Semidünnschnitte (0,3-1 µm) angefertigt.

Für daran anschließende Immunfluoreszenzuntersuchungen wurde das Epon wieder entfernt. Hierzu wurde der Semidünnschnitt für 6 min in 10 % Natrium in wasserfreiem Methanol, 5 min in Methanol/Toluol 1:1, für 2 x 5 min in Azeton, 5 min in destilliertem Wasser und 5 min in PBS inkubiert (Drenckhahn und Franz, 1986).

Alternativ wurden kleine unfixierte Nierenstücke der Ratte nach Entnahme mit Tissue-Tek™ auf Korkplättchen geklebt, diese sofort für 5 Minuten in ein mit Isopentan (in flüssigem Stickstoff vorgekühlt) gefülltes Behältnis gegeben, daran anschließend in flüssigem Stickstoff überführt und bei -20 °C endgelagert. Am Kryostat wurden bei -20 °C 5 µm dicke Kryoschnitte angefertigt, diese auf Objektträgern montiert und bei 37 °C auf einer Heizplatte für 5 min getrocknet. Vor den Antikörperinkubationen wurden die Kryoschnitte für 10 min in Methanol/Azeton (1:1; beides auf -20 °C vorgekühlt) inkubiert. Für Antikörperinkubationen wurden Semidünnschnitte bzw. Kryoschnitte 1 Stunde bei RT mit 2 % (w/v) Rinderserumalbumin, 10 % (w/v) normalem Ziegenserum und 0,05 % (v/v) Tween 20 in PBS, pH 7,4 vorinkubiert. Daran anschließend wurden die Schnitte in einer feuchten Kammer mit den Erstantikörpern über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte mit PBS gespült (3 x 10 min) und für 60 min mit einem entsprechenden Zweitantikörper inkubiert. Die Inkubation erfolgte wieder in einer feuchten Kammer. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS (3 x 10 min) wurden die Schnitte in 60 % (w/v) Glyzerol (in PBS verdünnt)/1,5 % (w/v) NPG eingebettet. Negativkontrollen wurden unter Weglassen der Erstantikörper durchgeführt. Die Spezifität der Erstantikörper wurde parallel durch entsprechende SDS-PAGE überprüft. Deckgläschen mit kultivierten Zellen wurden nach Entfernen des Kulturmediums einmal mit 2 ml PBS gespült. Danach erfolgte bei RT eine Fixierung in 2 ml 4 %igem Formaldehyd (frisch hergestellt aus Paraformaldehyd) sowie eine Permeabilisierung für

5 min bei RT in Gegenwart von PBS/0,1 % Triton X-100. Alternativ wurden die Zellen 10 min in Methanol (-20 °C) und 2 min in Azeton (-20 °C) inkubiert. Die so behandelten Zellen wurden anschließend 3 x 5 min mit PBS gespült und für 1 Stunde mit einem 1:1-Gemisch aus BSA und NGS (siehe oben) inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem in PBS verdünnten Antikörper gegen Kanadaptin (1:50). Nach einer Inkubation über Nacht in einer feuchten Kammer wurden die Zellen 3 x 5 min mit PBS gespült. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper (Cy<sup>TM</sup>3-markierten Ziege-gegen-Maus-Antikörper, 1:600 in PBS). Bei Kontrollen wurde der Erstantikörper weggelassen bzw. in Konkurrenzexperimenten mit dem Fusionsprotein 6xHisK1 präinkubiert. Nach gründlicher Entfernung des Zweitantikörpers (3 x 5 min waschen der Zellen mit PBS) erfolgte die Einbettung der Zellen in 60 % (w/v) Glycerol (in PBS verdünnt)/1,5 % (w/v) NPG. Dagegen wurden GFP-Fusionsproteine exprimierende Zellen nur in Formaldehyd (4 %) fixiert und daran anschließend direkt eingebettet.

Alle Präparate wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus Optical, siehe 3.1.1) begutachtet und zur Dokumentation mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop (LSM 510, Zeiss) aufgenommen.

NPG: 1,5 % NPG (Sigma-Aldrich) und 60 % Glycerin in PBS  
BSA/NGS: 2 % BSA und 2 % NGS in PBS gelöst.

### **3.2.21 Vitalfärbung von Mitochondrien mit dem CMX MitoTracker**

Auf Deckgläschen herangewachsene Mausfibroblasten und HeLa-Zellen wurden für 30 min bei 37 °C in Gegenwart von 50 nM MitoTracker Rot CMXRos (siehe 3.1.4) inkubiert. Die Zellen wurden daran anschließend intensiv mit PBS gewaschen und für 10 min in Methanol (-20 °C) und 2 min in Azeton (-20 °C) fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit den entsprechenden Antikörpern (monoklonaler Kanadaptin-Antikörper/Cy<sup>TM</sup>2-gekoppelter Zweitantikörper) inkubiert und in NPG eingedeckt.

### **3.2.22 Immunfluoreszenz mit dem Hoechst-Kernfarbstoff**

Zur Darstellung der Zellkerne wurden auf Deckgläschen kultivierte Zellen mit dem Hoechst-Kernfarbstoff H 33258 (Sigma-Aldrich) behandelt. Hierzu wurde der Kernfarbstoff in PBS verdünnt (Endkonzentration 1 µg/ml) und den Zellen nach der Zweitantikörper-Inkubation zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 10 min bei RT. Die Zellen wurden daran anschließend für je 3 x 10 min mit PBS gewaschen und zur Mikroskopie eingedeckt.

### **3.2.23 Immunelektronenmikroskopie**

Für die Immunelektronenmikroskopie wurden Rattennierenstücke in einer Mischung aus 0,1 % (v/v) Glutaraldehyd und 2 % (w/v) Formaldehyd (in PBS verdünnt) über Nacht bei 4 °C fixiert. Anschließend wurden das Gewebe 3 x 10 min in PBS gewaschen und in Ethanol über mehrere Verdünnungsstufen (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 96 %) je 5 min entwässert. Nach einer Inkubation für 3 x 10 min in 100 % Ethanol (getrocknet über Kupfersulfat) erfolgte die Kunstharz-Einbettung des Gewebes in Methacrylatharz (LR-White, siehe 3.1.2) für 1 Stunde oder über Nacht bei 4 °C. Nach dem Auswechseln des LR-Whites wurde das Gewebe in Gelatine-Vorrichtungen (Plano) eingebettet und das Kunstharz durch UV-Bestrahlung (360 nm) bei 4 °C für 2-3 Tage ausgehärtet.

Mit einem Mikrotom wurden Ultradünnschnitte von 70 nm Dicke hergestellt und auf Nickelnetze aufgebracht. Die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte durch Inkubation der Schnitte für 60 min mit 0,2 % Gelatine in PBS. Die Schnitte wurden mit dem Erstantikörper (Anti-Kanadaptin 1:100) für 2 Stunden bei RT inkubiert und in PBS



mit 0,2 % Triton X-100 gewaschen. Die Zweitantikörper-Inkubation wurde mit einem mit kolloidalen Goldpartikel-markierten (1 nm im Durchmesser) Ziegen-anti-Maus-Antikörper der Firma Aurion (siehe 3.1.17.2) durchgeführt. Die ultrakleinen Goldkörner wurden nach der Methode von Danscher (1981) durch Silberauflagerung vergrößert. Diese erfolgte in 10 ml frisch hergestellter Silberlösung. Nach der Silberverstärkung wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser mehrmals gespült und das Gewebe mit Bleizitrat und Uranylazetat kontrastiert. Zuletzt wurden die Schnitte nochmals mit destilliertem Wasser gewaschen und konnten dann mit einem Zeiss Elektronenmikroskop LEO912 betrachtet werden.

Silberlösung: 1 ml 1 M Zitratpuffer, pH 3,7; 6 ml 50 % (v/v) Gummi arabicum Lösung; 1,5 ml 0,09 g Hydroquinon und 1,5 ml 0,011 g Silberlaktat-Lösung.

### **3.2.24 Western-Blot (Burnette, 1981)**

Das Trenngel wurde nach der SDS-PAGE (siehe 3.2.10.2) auf eine markierte Nitrozellulosemembran (Biodyne®, Gibco BRL Life Technologies) gelegt, welche auf drei Lagen Zellulosepapier lag. Auf das Polyacrylamidgel wurden ebenfalls drei Lagen Zellulosepapier gelegt. In allen Fällen wurde vor Zusammenbau des Stapels das Filterpapier sowie die Nitrozellulosemembran mit Transferpuffer getränkt. Der aus 3x Filterpapier/Nitrozellulosemembran/Trenngel/3x Filterpapier bestehende Stapel wurde zwischen die Graphitplatten der Blot-Apparatur gelegt und der Proteintransfer bei einer Stromstärke von 42 Milliampere für 1,5 Stunden durchgeführt.

Anschließend wurden die Proteine auf der Nitrozellulosemembran durch eine Ponceau-Färbung sichtbar gemacht. Hierzu wurde die Membran in der Ponceau-Lösung für wenige Minuten inkubiert und daran anschließend zur Sichtbarmachung der Proteinbanden mit Aqua dest. gewaschen. Für die Antikörperinkubation wurde die Membran zur vollständigen Entfärbung in PBS gewaschen und dann 1 Stunde in einer Magermilch/PBS-Lösung (5 % w/v) schüttelnd inkubiert. Es erfolgte die Zugabe des in Magermilch/PBS-verdünnten Erstantikörpers und eine Inkubation des Ansatzes über Nacht bei 4 °C. Die Membran wurde für 3 x 10 min mit PBS/Tween (0,05 %) gewaschen, dann folgte die Inkubation der Membran mit dem ebenfalls in Magermilch/PBS-verdünnten Zweitantikörper für 1 Stunde bei RT. Nachdem die Membran für 3 x 10 min mit PBS/Tween (0,05 %) gewaschen worden war, wurde eine ECL-Entwicklung (siehe 3.2.27) durchgeführt.

Transferpuffer (1 l): 25 mM Tris/HCl; 192 mM Glyzerin; 0,1 % SDS; 20 % Methanol ad 1 l mit Aqua dest.

Ponceau S Lösung: 2 g Ponceau S (Carl Roth); 30 g Trichloressigsäure; 30 g Sulfansalizylat mit Aqua dest. ad 100 ml.

### **3.2.25 Proteinexpression durch IPTG-Induktion und Proteinaufreinigung**

5 ml einer über Nacht gewachsenen Kultur des gewünschten Bakterienklons (p6xHis-K1 in *E. coli* BL21 (DH3) pLysS; Hübner et al. 2002) wurden in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin angezogen. 2,5 ml dieser Kultur wurden am nächsten Tag in 100 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampizillin im Schikanenkolben gegeben und die Kultur unter schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 bis 1 inkubiert. Nach Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration) wurde die Inkubation für weitere 4 Stunden fortgesetzt. Daran anschließend wurde die Kultur bei 3.000 rpm, 4 °C für 10 min sedimentiert. Das Bakteriensediment wurde in Puffer A aufgenommen und durch abwechselnde Inkubation in flüssigem Stickstoff bzw. in 37 °C mit daran anschließender Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden durch eine Zentrifugation

bei 10.000 rpm, 4 °C für 10 min entfernt und der klare Überstand auf eine Nickel-NTA-Säule (Qiagen) gegeben. Die Säule wurde mehrfach mit Puffer B gewaschen und das Fusionsprotein 6xHisK1 mit Puffer C von der Säule eluiert. Das Eluat wurde schließlich 3 x gegen je 2 l Intrazellulärpuffer über Nacht bei 4 °C dialysiert. Das Volumen wurde mit Hilfe der Ultrafiltration (siehe 3.2.26) reduziert und der Proteingehalt des Ultrafiltrats wie unter 3.2.28.2 beschrieben bestimmt.

Puffer A	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 8,3; 300 mM NaCl; 1 mM Imidazol; 1 mg/ml Lysozym
Puffer B	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 8,3; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol
Puffer C	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 8,3; 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol
Intrazellulärer Puffer (pH 7,4)	110 mM KCl; 5 mM NaH <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; 5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 mM EGTA; 0,1 mM CaCl <sub>2</sub> ; 20 mM HEPES; 1 mM DTT; 5 µg/ml Leupeptin

### 3.2.25.1 Proteinexpression durch IPTG- und M13/T7 Phagen-Induktion

Die Expression des Fusionsproteins 6xHisK1 (Hübner et al., 2002) konnte ebenfalls mit Hilfe von filamentösen T7-Polymerase exprimierenden M13/T7-Phagen durchgeführt werden. Die Expression der phagenkodierten T7-Polymerase steht dabei unter der Kontrolle eines lacZ-Promotors und ist damit IPTG-abhängig.

Phagen-Anzucht: 5 ml LB-Medium mit Tetrazyklin (10 µg/ml) wurden mit *E. coli* XL1-Blue versetzt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 bei 37 °C schüttelnd inkubiert. 100 µl dieser Kultur wurden zu 100 ml LB-Medium gegeben, ebenso 100 µl eines M13/T7 Phagenstocks. Nach einer Übernachts-Inkubation bei 37 °C wurde die Bakterienkultur 2 x zentrifugiert (10.000 rpm, 20 min, 4 °C), der klare Überstand 20 min bei 70 °C inkubiert und bei 4 °C gelagert.

Titer-Bestimmung der Phagen: 100 µl einer entsprechenden in PBS hergestellten M13/T7-Phagenverdünnung wurden zu 200 µl einer sich noch in der logarithmischen Wachstumskurve befindlichen XL1-Blue Bakterienkultur gegeben. Parallel dazu wurde 0,7 %ige Agarose (Carl Roth) auf 55 °C erwärmt und davon 3 ml in entsprechend temperierte Greiner-Röhrchen gegeben. Die Phagen-infizierte Bakterienkultur wurde der Agarose zugegeben und das Gemisch auf eine 37 °C-vorgewärmte LB-Agar-Platte gleichmäßig verteilt. Nach einer 30-minütigen Präinkubation bei RT erfolgte die Übernachtinkubation bei 37 °C. Die Phagen-infizierten Bakterien zeichneten sich gegenüber den nicht infizierten Bakterien durch ein langsames Wachstum aus und bildeten dadurch in dem ansonsten trüben Bakterienrasen leicht durchsichtbare Plaques. Diese Plaques wurden zur Bestimmung der Phagenmenge (pfu: plaque forming units) ausgezählt.

Phagen-induzierte Expression: Für die Expression von 6xHisK1 wurden 100 ml LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampizillin) mit 1 ml einer p6xHis-K1 enthaltenen XL1-Blue Übernachtskultur (mit 10 µg/ml Ampizillin) versetzt, schüttelnd bei 37 °C inkubiert und bei einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,5 mit IPTG (Endkonzentration 1 mM) versetzt. 1 Stunde später wurden dem Ansatz M13/T7-Bakteriophagen zugegeben und die Inkubation bei 37 °C schüttelnd über Nacht fortgesetzt. Die Bakterienkultur wurde schließlich sedimentiert und entsprechend aufgearbeitet (siehe 3.2.25). Die Menge der zugegebenen M13/T7-Bakteriophagen berechnete sich auf Basis eines Verhältnisses von Bakterien zu Bakteriophagen von 1: 10<sup>5</sup>. Dabei wurde der Berechnung eine Bakterienzahl von 10<sup>8</sup> Zellen/ml bei einer OD<sub>600</sub> von 1 zugrunde gelegt.

### 3.2.26 Ultrafiltration nukleinsäurehaltiger Lösungen

Die Entsalzung, Entfernung von Oligonukleotiden sowie die Konzentrierung nukleinsäurehaltiger Lösungen erfolgte mittels Ultrafiltration durch eine semipermeable Membran. Hierzu wurde die Centricon<sup>®</sup> YM 50 Filtereinheit (Amicon) verwendet. Die Filtereinheit wurde vor Gebrauch mit 2 ml Aqua dest. gefüllt, 10 min bei 5.000 rpm zentrifugiert und das Filtrat (Aqua dest.) verworfen. Nun konnte die gewaschene Filtereinheit eingesetzt werden. Hierzu wurde die nukleinsäurehaltige Lösung in das Probenreservoir der Filtereinheit gegeben, das Probenreservoir mit Aqua dest. aufgefüllt und erneut 10 min bei 5.000 rpm zentrifugiert. Dieser Zentrifugationsschritt wurde mehrmals wiederholt und die nukleinsäurehaltige Lösung sukzessive bei 4 °C bis zum gewünschten Endvolumen eingengt. Die konzentrierte Lösung wurde anschließend entnommen. Das Endvolumen betrug etwa 30-40 µl.

### 3.2.27 Detektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen mit Hilfe der ECL-Färbung

Zur Sichtbarmachung von Proteinen auf der Nitrozellulosemembran wurde die ECL-Färbung eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Amersham). Hierzu wurde die mit Erstantikörper und Peroxidase-konjugierte-Zweitantikörper inkubierte Nitrozellulosemembran 3 x 10 min mit PBS/Tween (0,05 %) gewaschen und in einem ausreichenden Volumen einer ECI I/ECI II-Lösung für 1 min bei RT inkubiert. Beide Lösungen (ECI I/ECI II) wurden erst kurz vor Gebrauch im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die Membran gegeben. Die Membran wurde tropfenfrei in eine entsprechende Filmkassette gelegt und mit einer Klarsichtfolie bedeckt. Schließlich wurde auf die abgedeckte Membran für wenige Minuten ein Chemilumineszenzfilm (Hyperfilm<sup>TM</sup>ECL<sup>TM</sup> High performance chemiluminescence film, Pharmacia) gelegt und dieser daran anschließend zur Entwicklung in entsprechende Entwickler- und Fixierlösungen inkubiert.

ECI I: 1 ml Luminol-Stocklösung (250 mM 3-Aminophthalhydrazid in DMSO);  
440 µl p-Cumarsäure (90 mM 4-Hydroxycinnaminsäure in DMSO) und  
10 ml 1 M Tris/HCl pH 8,5 mit Aqua dest. ad 100 ml.

ECI II: 64 µl Wasserstoffperoxid (30 %); 10 ml 1 M Tris/HCl pH 8,5 mit Aqua  
dest. ad 100 ml und bei 4 °C lagern.

PBS/Tween: 1 l PBS; 0,5 g Tween

### 3.2.28 Proteinbestimmungen

#### 3.2.28.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit Amidoschwarz

Diese Art der Proteinbestimmung wurde eingesetzt, wenn Proteinlösungen in Laemmli Sample Puffer vorlagen. Als Standardprotein wurde bovines Serumalbumin in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt und diente als Eichprotein. Jeweils 2 x 5 µl der Eichlösung und Proteinprobe wurden auf eine Zelluloseazetatfolie (Schleicher & Schuell) aufgetragen und getrocknet. Anschließend wurde die Folie in Färbelösung 1 für 10 min schüttelnd inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in Entfärbelösung 2 wurde die Folie getrocknet, die sichtbaren Proteinspuren ausgeschnitten, diese in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml Auflöselösung 3 versetzt. Die Ansätze wurden für 30 min in einem 50 °C Wasserbad inkubiert. Die Proteinbestimmung erfolgte spektralphotometrisch bei 620 nm in einem Photometer.

Amidoschwarz-Proteinstandards:	Proteinstandard BSA P7656 (1,93 mg BSA; Sigma-Aldrich), Lyophilisat in 490 µl Probenpuffer lösen; Anfertigung einer Verdünnungsreihe mit den Endkonzentrationen: 40; 20; 10; 5; 2,5 und 1,25 µg/10 µl.
Färbelösung 1 (500 ml):	2,5 g Amidoschwarz; 225 ml Methanol; 225 ml Aqua dest. und 50 ml Eisessig vermischen. Licht geschützt verwahren.
Entfärbelösung 2 (500 ml):	237,5 ml Methanol; 237,5 ml Aqua dest. und 25 ml Eisessig vermischen. Immer frisch ansetzen!
Auflöselösung 3 (100 ml)	80 g Trichloressigsäure; 80 ml Ameisensäure und 10 ml Essigsäure gut vermischen.

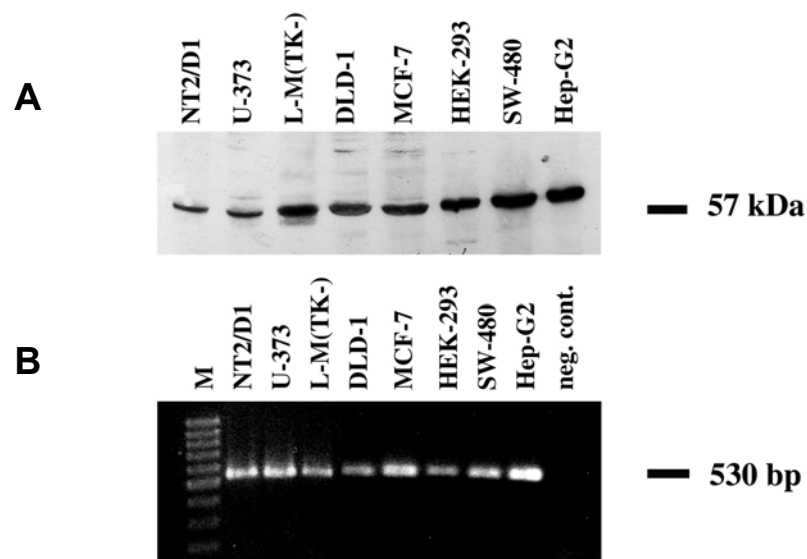
### **3.2.28.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit dem Bradford-Reagenz**

Die auf der unspezifischen Bindung des Coomassie-Farbstoffes basierende Methode eignet sich zur schnellen Proteinbestimmung. Als Eichprotein wurde wieder bovines Serumalbumin in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Roth). Es wurden ausschließlich Mikroansätze verwendet. Die Absorptionsmessungen wurden nach einer 10-minütigen Inkubation der Proteinlösung mit dem Bradford-Reagenz durchgeführt. Die Extinktionsbestimmung erfolgte bei 595 nm.

## 4. Ergebnisse

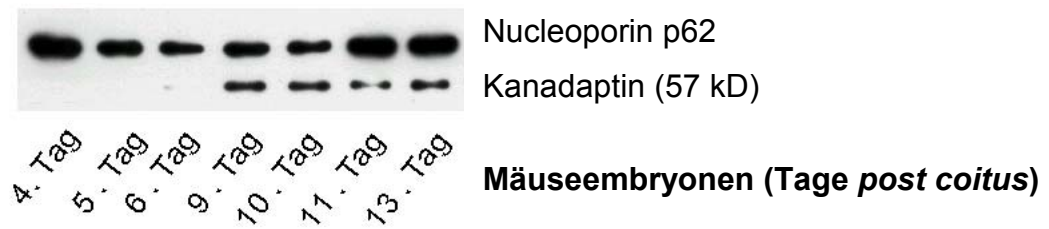
### 4.1 Untersuchungen zur Expression von Kanadaptin mittels Western-Blot-Analysen und RT-PCR

Expressionsuntersuchungen der Arbeitsgruppe Al-Awqati (Chen et al., 1998) und Hübner (Hübner, persönliche Mitteilung) zeigten, dass Kanadaptin nicht nur in der Niere, sondern auch in anderen Geweben der Ratte exprimiert wird. Kanadaptin wurde dabei besonders stark in der Niere, im Gehirn und der Leber sowie in einem humanen Nierenkarzinom (Onkozytom) gefunden. Auch in allen bisher untersuchten kultivierten Zellen konnte mit dem Kanadaptin-Antikörper eine für Kanadaptin typische 57 kD-Immunbande nachgewiesen werden (Abb.3A). Die Expression von Kanadaptin wurde ebenso parallel auf Transkriptionsebene gezeigt. Hierzu wurden Primer aus entsprechend identischen Bereichen der Mauskanadaptin bzw. humanen Kanadaptin cDNA-Sequenz abgeleitet und in eine RT-PCR eingesetzt (Abb.3B).



**Abb.3: Nachweis der Expression von Kanadaptin in verschiedenen Zelllinien mit Hilfe der Western-Blot-Analyse und RT-PCR. A:** Proteine aus Gesamtextrakten verschiedener kultivierter Zellen wurden gelelektrophoretisch getrennt, auf einen Nitrozellulosefilter transferiert und mit einem monoklonalen Antikörper gegen das Kanadaptin der Maus inkubiert. Eine immunreaktive Bande von 57 kD konnte in allen Gesamtextrakten nachgewiesen werden. **B:** Gesamt-RNA wurde aus entsprechenden Zelllinien isoliert und zusammen mit den Primern 5'-AGAGGAAGACCGAGAGGCAGAATC-3' and 5'-TTTCCGAGATACTGCTTCCTGC-3' in eine RT-PCR eingesetzt. In allen Ansätzen konnte in einer Agarose-Gelelektrophorese ein für die Kanadaptin-cDNA spezifisches 530 bp Amplifikat detektiert werden. Als negative Kontrolle diente ein RT-PCR-Ansatz ohne Primerzugabe.

Eine EST (Expressed Sequence Tag) - Datenbankrecherche ergab darüber hinaus, dass Kanadaptin schon im Zweizellstadium der Maus exprimiert wird (GenBank<sup>TM</sup> accession no. BB709436). Diese Ergebnisse zeigten, dass Kanadaptin nicht nur nahezu ubiquitär, sondern auch sehr früh exprimiert wird. Die frühe Expression von Kanadaptin konnte mit Hilfe der Western-Blot-Analyse bestätigt werden. Hierzu wurden aus verschiedenen schwangeren Mäusen Embryonen mit unterschiedlichen Entwicklungsstadien isoliert und die daraus gewonnenen Gesamtextrakte einer Western Blot-Analyse unterzogen. Eine erste detektierbare Expression von Kanadaptin konnte ab dem 9. Tag *post coitus* nachgewiesen werden.



**Abb.4: Bestimmung der Expression von Kanadaptin in Mausembryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien.** Gesamtproteine von verschiedenen Mausembryonenextrakten (4.-13. Tag *post coitus*) wurden gelelektrophoretisch getrennt, auf einen Nitrozellulosefilter transferiert und mit einem monoklonalen Antikörper gegen das Kanadaptin der Maus inkubiert. Eine immunreaktive Kanadaptin-Bande von 57 kD konnte ab dem 9. Embryonaltag detektiert werden. Ein Antikörper gegen das ubiquitär exprimierte Kernporenprotein Nucleoporin p62 wurde als interne Beladungskontrolle verwendet.

Detaillierte Untersuchungen an der Rattenniere zeigten eine starke Expression von Kanadaptin in der Rinde und eine zunehmend schwächere Expression im Mark und der Papille (siehe Abb.5).

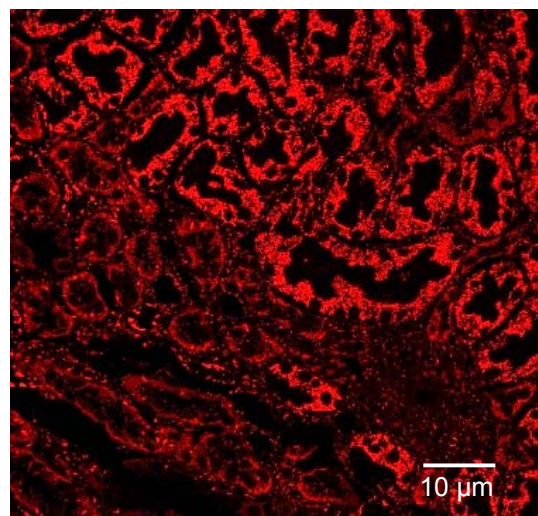


**Abb.5: Untersuchung zur Expression von Kanadaptin in der Rattenniere.** Unter einem Stereomikroskop wurde von einer frisch entnommenen Rattenniere die Rinde, das Mark und die Papille isoliert, diese in Laemmli Sample Puffer (Laemmli, 1970) homogenisiert und der Proteingehalt der jeweiligen Extrakte mit Hilfe der Amidoschwarz-Methode (siehe 3.2.28.1) bestimmt. Eine daran anschließende Western-Blot-Analyse zeigte eine starke Expression von Kanadaptin in der Rinde, dagegen eine schwache im Mark und in der Papille. Die Western-Blot-Analysen wurden mit dem monoklonalen Kanadaptin-Antikörper durchgeführt.

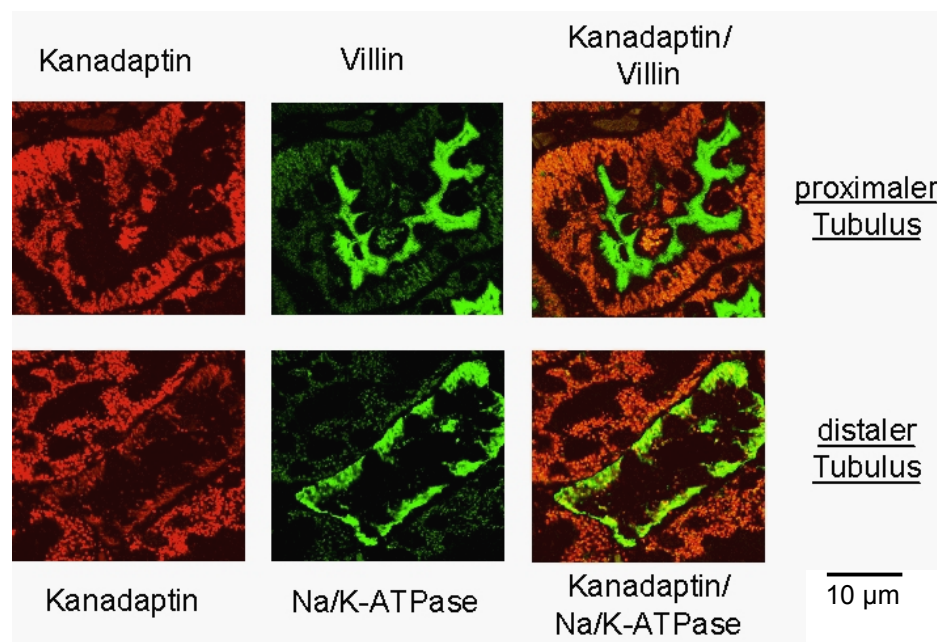
## 4.2 Immunlokalisation von Kanadaptin in Semidünnschnitten und fixierten, kultivierten Zellen

Daran anschließende immunzytochemische Untersuchungen an in Epon eingebetteten Semidünnschnitten der Rattenniere bestätigten, dass Kanadaptin am stärksten in der Nierenrinde exprimiert wird (siehe Abb.6).

**Abb.6: Immunzytochemische Untersuchungen an der Rattenniere.** In Epon eingebettete Semidünnschnitte der Rattenniere wurden sequenziell mit dem monoklonalen Kanadaptin-Antikörper sowie einem Cy<sup>TM</sup>3-markierten Ziege-gegen-Maus-Zweitantikörper inkubiert. Die daran anschließende Immunfluoreszenzmikroskopie erfolgte mit einem LSM 510 UV konfokalen Laserscanningmikroskop (Carl Zeiss - wurde freundlicherweise vom Institut für Molekulare Infektionsbiologie in Würzburg zur Verfügung gestellt). Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus dem Bereich der Rinden-Mark-Grenze. Die Nierenrinde liegt in der rechten, oberen diagonalen Hälfte, das Nierenmark in der linken, unteren diagonalen Hälfte des Bildes.



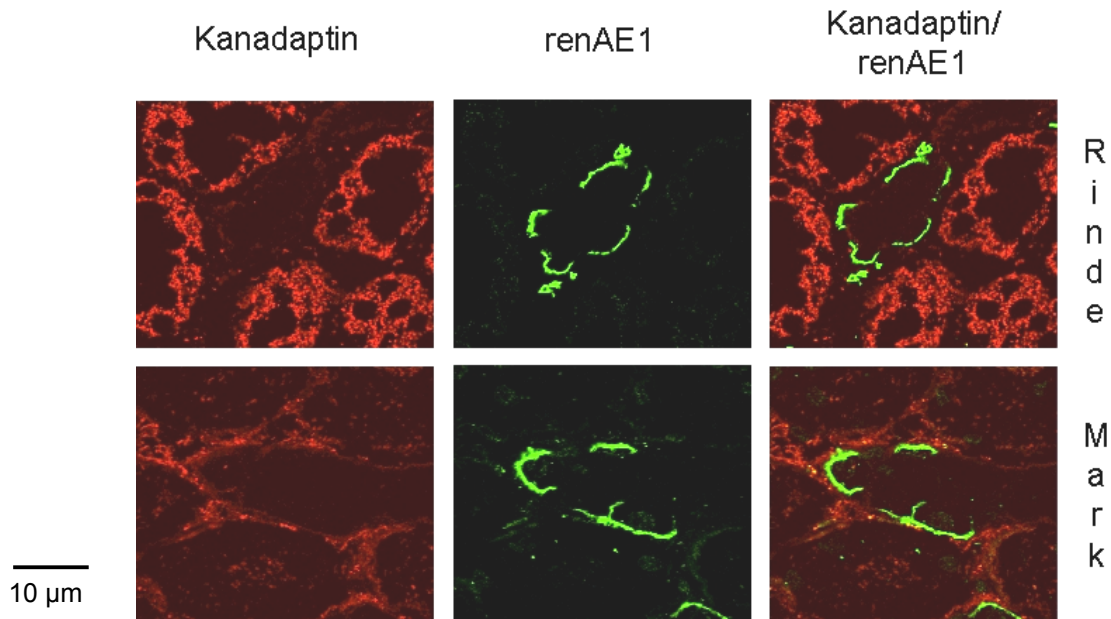
Dagegen war eine Immunreaktivität in den Tubuluszellen des angrenzenden Marks wesentlich schwächer ausgeprägt. Welche Tubuluszellen die stärkste Kanadaptin-spezifische Antikörperreaktion zeigten, wurde in daran anschließenden Doppelimmunfluoreszenzexperimenten untersucht. Hierzu kamen der monoklonale Kanadaptin-Antikörper sowie gegen Villin bzw.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase gerichtete Antikörper zum Einsatz. Durch den Villin-Antikörper wurden spezifisch Mikrovilli-besetzte Zellen des proximalen Tubulus dargestellt, dagegen markierte der gegen die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase gerichtete Antikörper Zellen des distalen Tubulus. Die Untersuchungen ergaben, dass proximale Tubuluszellen die stärkste Kanadaptin-spezifische Immunreaktivität zeigten. Distale Tubuluszellen waren dagegen nur sehr schwach Antikörper-markiert. In der Kaninchenniere zeigten dagegen sowohl proximale als auch distale Tubuluszellen eine starke Kanadaptin-spezifische Immunreaktivität (Hübner, persönliche Mitteilung).



**Abb.7: Immunzytochemische Untersuchungen an der Rattenniere.** Semidünnschnitte der Rattenniere wurden zwecks Doppelimmunfluoreszenzuntersuchung entweder mit Anti-Kanadaptin und Anti-Villin oder Anti-Kanadaptin und Anti- $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase inkubiert. Der die Mikrovilli darstellende polyklonale Villin-Antikörper (apikale Immunfluoreszenz !) identifizierte proximale Tubuluszellen. Der für die basolaterale  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-spezifische Antikörper (basolaterale Immunfluoreszenz !) markierte dagegen distale Tubuluszellen. Als Zweitantikörper kamen ein Cy<sup>TM</sup>3-gekoppelter Ziege-gegen-Maus-Antikörper (spezifisch für Anti-Kanadaptin, rote Immunfluoreszenz !) bzw. Cy<sup>TM</sup>2-gekoppelte Ziege-gegen-Kaninchen-Antikörper (spezifisch für Villin- bzw.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Antikörper, grüne Immunfluoreszenz) zum Einsatz.

Inwieweit Kanadaptin, wie von Chen et al., 1998 für die Kaninchenniere beschrieben, in Sammelrohrepithelzellen der Rattenniere, insbesondere in den säuresezernierenden Schaltzellen (A-Schaltzellen) exprimiert wird, wurde ebenfalls mit Hilfe der Immunzytochemie untersucht. Hierzu wurden in Epon eingebettete Semidünnschnitte der Rattenniere sowohl mit Anti-Kanadaptin als auch mit einem humanen renAE1-spezifischen Antikörper inkubiert. Überraschenderweise konnte in A-Schaltzellen der Rinde und des Marks keine signifikante für Kanadaptin spezifische Immunfluoreszenz detektiert werden.

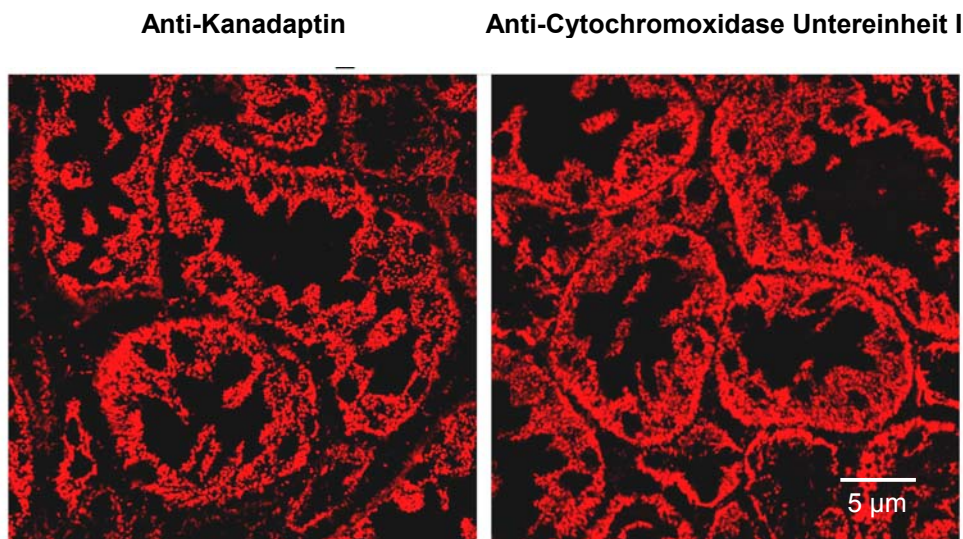




**Abb.8: Immunzytochemie von Kanadaptin und renAE1 in der Rattenniere.** Doppelinkubationen mit Anti-Kanadaptin (rote Fluoreszenz) und einem affinitätsgereinigten polyklonalen Antikörper gegen renAE1 (grüne Fluoreszenz) wurden an Semidünnschnitten der Rattenniere (Rinde und Mark) durchgeführt. Sowohl in A-Schaltzellen der Rinde als auch des Marks konnte keine signifikante kanadaptinspezifische Immunfluoreszenz beobachtet werden. Dagegen zeigten Epithelzellen des proximalen Tubulus eine starke kanadaptinspezifische, granuläre Immunfärbung. Als Zweitantikörper kamen ein Cy<sup>TM</sup>3-gekoppelter Ziege-gegen-Maus-Antikörper bzw. Cy<sup>TM</sup>2-gekoppelte Ziege-gegen-Kaninchen-Antikörper zum Einsatz.

In allen durchgeführten immunzytochemischen Untersuchungen zeigte der Kanadaptin-Antikörper in den epithelialen Zellen des proximalen Rattentubulus eine intensive, gränuläre, mitochondrien-ähnliche Immunfluoreszenz. Eine ähnliche Immunfluoreszenz wurde auch in anderen Geweben der Ratte und des Menschen (Leber, exokriner Pankreas, Kleinhirn, humanes renales Onkozytom – Hübner, persönliche Mitteilung) beobachtet. Zur Verifizierung dieser Beobachtungen wurden Semidünnschnitte der Rattennierenrinde mit dem Mitochondrien-spezifischen Antikörper (Anti-Cytochromoxidase Untereinheit I, Molecular Probes) inkubiert. Es wurde eine typische für Mitochondrien spezifische Immunfluoreszenz detektiert, die sich mit der Anti-Kanadaptin-spezifischen Immunfluoreszenz deckte. Diese Ergebnisse deuteten erstmals darauf hin, dass Kanadaptin nicht nur im Zellkern, sondern möglicherweise auch in Mitochondrien lokalisieren kann.

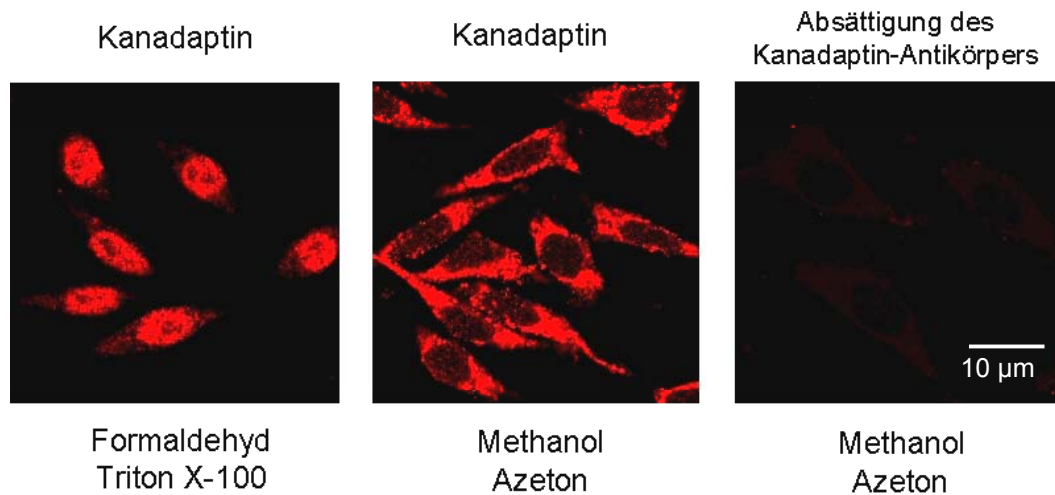




**Abb.9: Immunfluoreszenz-Untersuchungen mit Kanadaptin- und Cytochromoxidase Untereinheit I-spezifischen Antikörpern an Semidünnschnitten der Rattennierenrinde.** Semidünnschnitte der Rattennierenrinde wurden mit Anti-Kanadaptin oder Anti-Cytochromoxidase Untereinheit I inkubiert. Die Antikörperbindung wurde mit einem Cy<sup>TM</sup>3-konjugierten Ziege-gegen-Maus-Zweitantikörper nachgewiesen. Beide Antikörper produzierten eine granuläre für Mitochondrien spezifische Immunfluoreszenz.

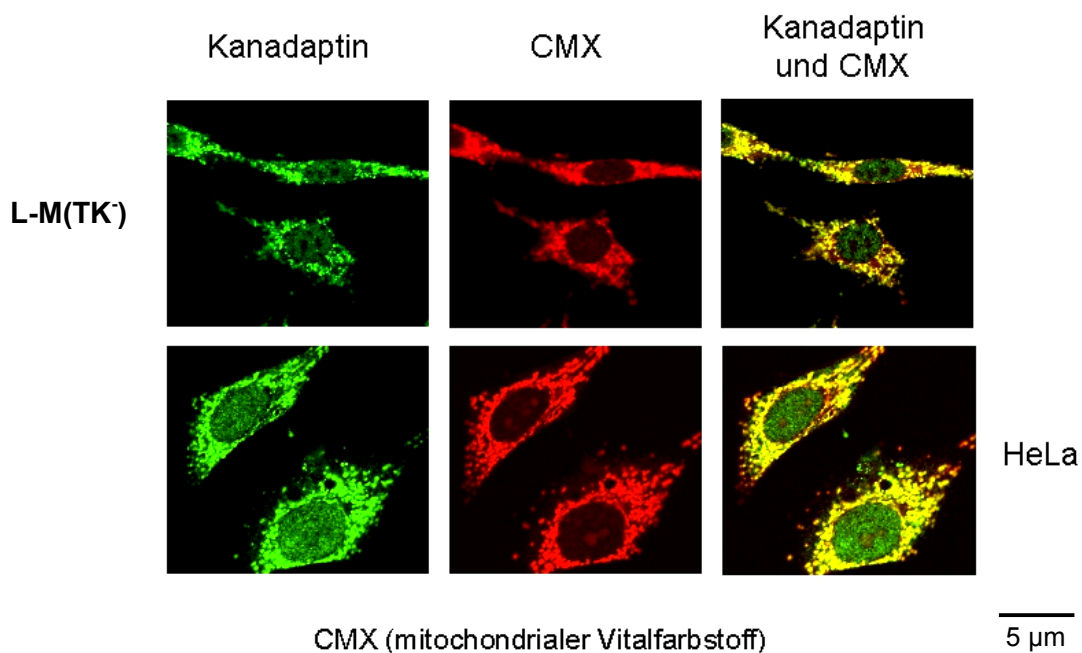
Gegenüber diesen Befunden zeigten frühere immunzytochemische Experimente an Formaldehyd und Triton X-100 behandelten Zelllinien eine ausschließlich auf Zellkerne beschränkte Immunfluoreszenz für Kanadaptin (Hübner et al., 2002). Untersuchungen von Scheller et al. (2000) zur subzellulären Lokalisation des Glukokortikoid-Rezeptors halfen diese Diskrepanz der differentiellen Immunreaktivitäten des Kanadaptin-Antikörpers an Semidünnschnitten bzw. kultivierten Zellen zu interpretieren. Diese zeigten nämlich, dass die Darstellung der rezeptorspezifischen Immunfluoreszenz von Fixierungs- und Permeabilisierungsbedingungen abhängig sein kann. So konnte der Rezeptor, sobald Formaldehyd-/Azeton-behandelte Zellen mit Triton X-100 permeabilisiert wurden, im Zellkern, dagegen in Abwesenheit von Triton X-100 in Mitochondrien nachgewiesen werden. Eine ebenfalls von Fixierungs- und Permeabilisierungsbedingungen abhängige Immunfluoreszenz wurde auch für das karyophile bzw. desmosomale, zytoplasmatische Plaque-Protein Plakophilin beschrieben (Mertens et al., 1996). Basierend auf diesen Beobachtungen wurden deshalb kultivierte Mausfibroblasten (L-M(TK<sup>-</sup>)-Zellen) nach Fixierung mit Formaldehyd oder Methanol in Abwesenheit von Triton X-100 und stattdessen mit Azeton behandelt. Nun zeigten auch diese Zellen nach entsprechender Antikörperinkubation eine granuläre, für Mitochondrien typische Immunfluoreszenz.

Die Spezifität dieser Immunfluoreszenz konnte durch entsprechende Präinkubation des Kanadaptin-Antikörpers mit dem bakteriell exprimierten 6xHisK1-Fusionsprotein nachgewiesen werden (siehe Abb.10).



**Abb.10: Immunfluoreszenz-Untersuchungen an L-M(TK<sup>-</sup>)-Zellen unter verschiedenen Fixierungs- und Permeabilisierungsbedingungen.** Die Untersuchungen an Formaldehyd/Triton X-100- (linkes Bild) und Methanol/Azeton-behandelten L-M(TK<sup>-</sup>)-Zellen (mittleres Bild) wurden in Gegenwart des monoklonalen Kanadaptin-Antikörpers durchgeführt. Im Konkurrenzexperiment (rechtes Bild) dagegen wurde der Kanadaptin-Antikörper mit dem bakteriell exprimierten Kanadaptin-spezifischen Fusionsprotein 6xHisK1 präinkubiert. In allen Fällen wurde ein mit Cy<sup>TM</sup>3-gekoppelter Ziege-gegen-Maus-Zweitantikörper verwendet. Mit Formaldehyd/Triton X-100 behandelte Zellen zeigten eine nukleäre Immunfluoreszenz, mit Methanol/Azeton behandelt, zeigten die Zellen dagegen eine granuläre, mitochondrienähnliche Immunfluoreszenz. Eine Präinkubation des Antikörpers mit 6xHisK1 führte fast zu einer kompletten Reduktion der Immunfluoreszenz sowohl an Methanol/Azeton- als auch an Formaldehyd/Triton X-100 behandelten Zellen (nicht gezeigt).

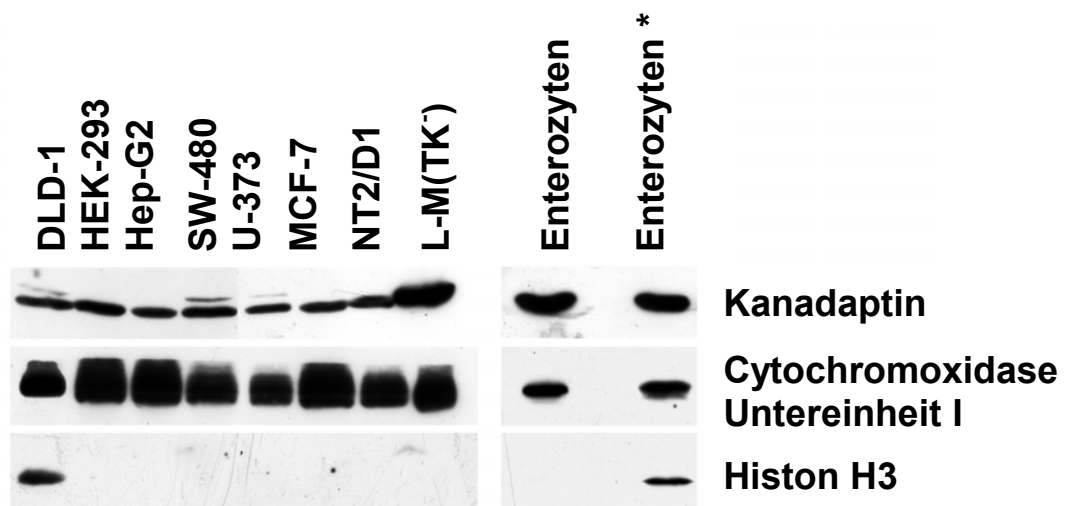
Zur weiteren Bestätigung der beobachteten mitochondrialen Lokalisation von Kanadaptin wurden Doppelimmunfluoreszenz-Untersuchungen angewendet. Sie erfolgten in Gegenwart eines mitochondrialen Vitalfarbstoffes (MitoTracker, CMX) und des Kanadaptin-Antikörpers. Sowohl in L-M(TK<sup>-</sup>)-Zellen als auch in HeLa-Zellen konnte eine Kolokalisation der CMX-spezifischen bzw. Kanadaptin-spezifischen Immunfluoreszenz beobachtet werden (siehe Abb.11).



**Abb.11: Mitochondriale Immunfluoreszenzen an L-M(TK<sup>-</sup>)-Zellen und HeLa-Zellen.** Methanol/Azeton-behandelte L-M(TK<sup>-</sup>)- (oben) und HeLa-Zellen (unten) wurden sowohl mit dem mitochondrialen Vitalfarbstoff Mitotracker Red CMXRos (CMX) (rote Fluoreszenz) als auch mit dem Kanadaptin-Antikörper inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit einem Cy<sup>TM</sup>2-gekoppelten Ziege-gegen-Maus-Antikörper (grüne Immunfluoreszenz) behandelt. In beiden Zelllinien konnte eine Kolokalisation der Kanadaptin- und CMX-spezifischen Immunfluoreszenz (rechts) beobachtet werden.

#### 4.3 Subzelluläre Fraktionierung von Extrakten kultivierter Zellen

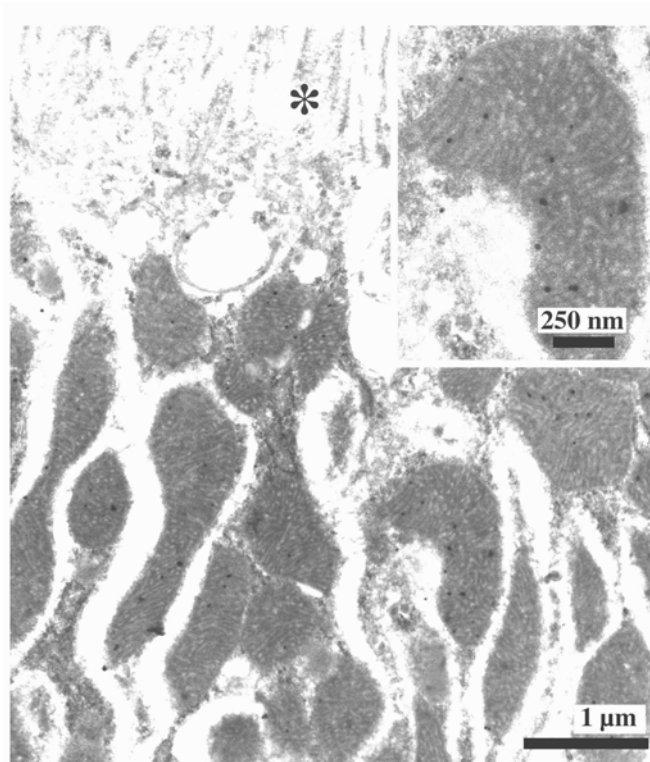
Zum weiteren Nachweis der Lokalisation von Kanadaptin in den Mitochondrien wurden zusätzlich zu den immunzytochemischen Experimenten aus verschiedenen Kanadaptin-positiven Zelllinien/Zellen (siehe Abb.3) Mitochondrien-angereicherte Extrakte hergestellt und einer Western-Blot-Analyse unterzogen. In allen Fällen zeigten diese Cytochromoxidase-positiven und Histon H3-negativen Extrakte eine kanadaptinspezifische immunreaktive Bande von 57 kD (siehe Abb.12). Diese konnte in Extrakten von Mausfibroblasten (L-M(TK<sup>-</sup>), humanen teratokarzinomen Hodenzellen (NT2/D1), Mammakarzinomzellen (MCF-7), Gliomzellen (U-251), Kolonkarzinomzellen (SW-480), Hepatozyten (Hep-G2), menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK-293) und Rattenenterozyten detektiert werden. Als Positivkontrolle dienten Gesamtzellextrakte der Kolonkarzinomzelllinie DLD-1 sowie von Rattenenterozyten.



**Abb.12: Western-Blot-Untersuchungen mitochondrialer Extrakte.** Western-Blot-Analysen von Mitochondrienextrakten unterschiedlicher Säugetierkulturzellen und Rattenenterozyten zeigten eine immunreaktive Kanadaptin-Bande bei 57 kD. Nur zellkernfreie (mit dem Phasenkontrastmikroskop überprüft), Histon-negative und Cytochromoxidase Untereinheit I-positive Extrakte (mittels Western-Blot-Analyse überprüft) wurden als Mitochondrienextrakte mit dem Kanadaptin-Antikörper untersucht. Als Positivkontrolle diente ein Gesamtzellhomogenat von DLD1-Zellen bzw. Rattenenterozyten (\*).

#### 4.4 Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen

Eine weitere Bestätigung der mitochondrialen Kanadaptinlokalisierung ergaben immunelektronenmikroskopische Untersuchungen an Ultradünnschnitten der Rattennierenrinde. Nach Verwendung des Kanadaptin-Antikörpers und eines goldmarkierten Zweitantikörpers zeigte sich in proximalen Tubuluszellen eine Verteilung der Goldkörner über den gesamten mitochondrialen Querschnitt (siehe Abb.13).



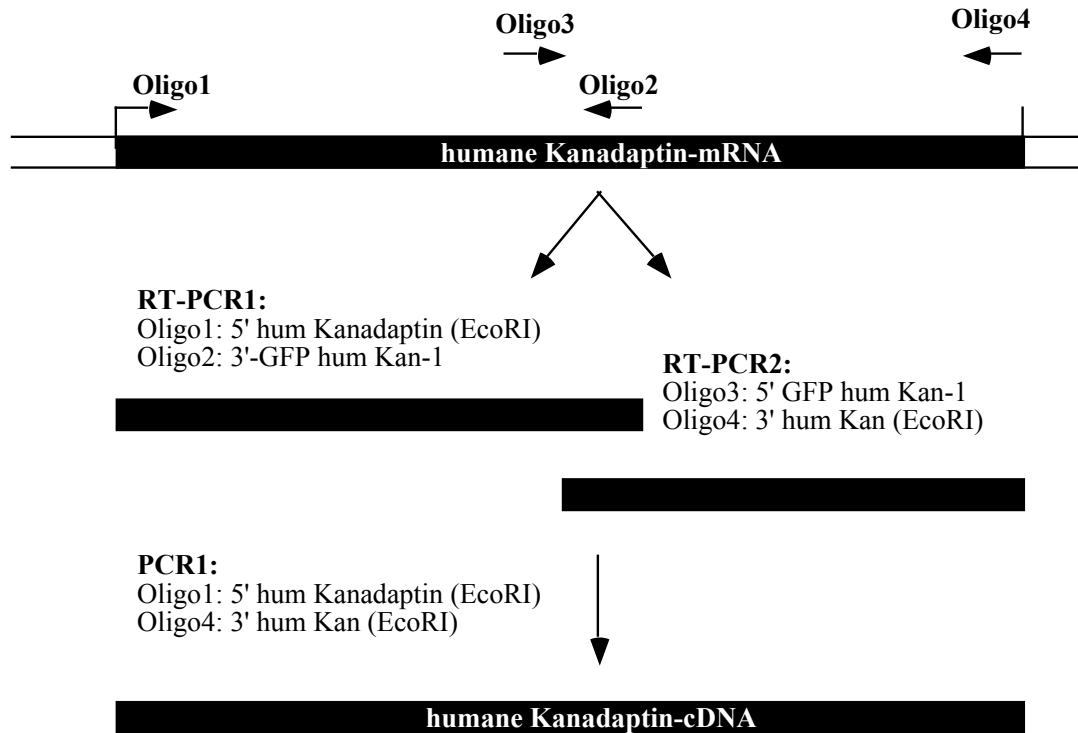
**Abb.13: Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen von Mitochondrien in proximalen Tubuluszellen der Rattenniere.** In Methacrylatharz (LR-White) eingebettete Ultradünnschnitte wurden mit dem Kanadaptin-Antikörper und einem Gold-markierten Zweitantikörper inkubiert. In den proximalen Tubuluszellen (am apikalen Bürstensaum zu erkennen (\*)) konnte eine auffällig hohe Goldpartikeldichte innerhalb der Mitochondrien detektiert werden.

#### 4.5 Klonierung von humanem Kanadaptin aus NT2-Zellen

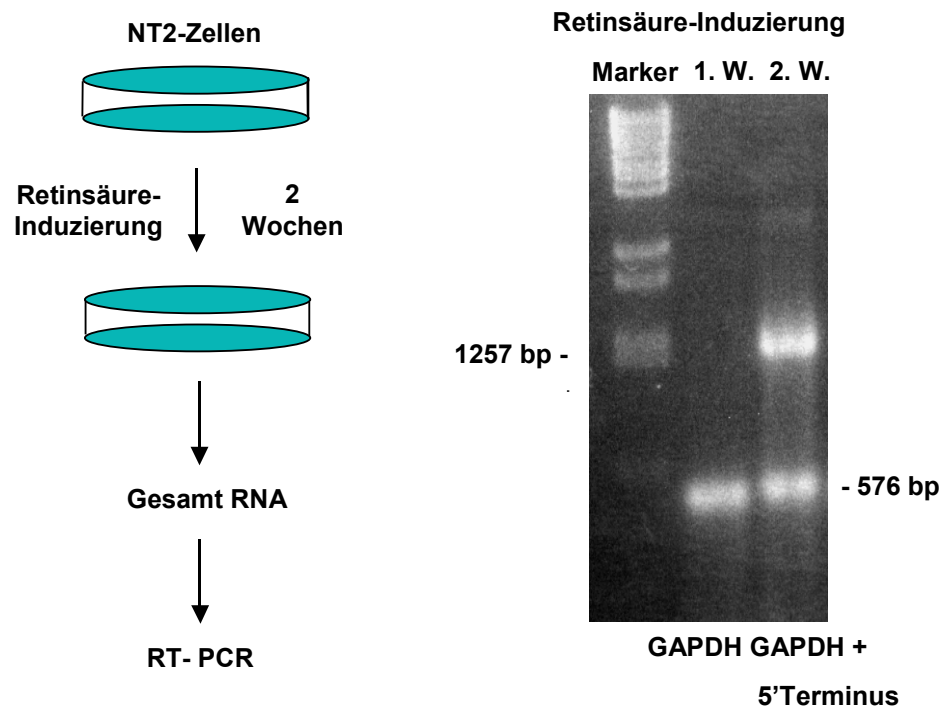
Neben dem Kanadaptin der Maus wurde eine weitere Isoform identifiziert. Sie befindet sich im Menschen und ist mit 792 Aminosäuren deutlich größer als das Kanadaptin der Maus. Humanes Kanadaptin wurde von zwei voneinander unabhängigen Labors kloniert (Helix Research Institute, Genomics Laboratory; 1532-3 Yana, Kisarazu, Chiba 292-0812, Japan und Department of Pathology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Prannok Road, Bangkok 10700, Thailand). Zum einen wurde die humane Kanadaptin-cDNA aus einer humanen Teratokarzinom-Zelllinie (NT2/D1) nach 2-wöchiger Retinsäure-Behandlung (10 mM) und zum anderen aus der menschlichen Niere kloniert.

Für subzelluläre Lokalisationsuntersuchungen wurde in anfänglichen Experimenten versucht, die humane Kanadaptin-cDNA aus der menschlichen Niere zu klonieren. Dieser Ansatz verlief jedoch erfolglos, so dass die cDNA schließlich aus entsprechend Retinsäure-behandelten NT2/D1-Zellen kloniert wurde. Hierzu wurde wie unter 3.2.8.1 beschrieben die Gesamt-RNA isoliert und die für humanes Kanadaptin kodierende cDNA mittels RT-PCR amplifiziert (siehe 3.2.13.2). Aufgrund der Größe des Leserahmens von 2.391 bp wurde nicht das gesamte Transkript auf einmal amplifiziert. Stattdessen wurden in einem ersten Schritt 5'- und 3'-spezifische RT-PCR Reaktionen durchgeführt (siehe 3.2.13.2). Die daraus hervorgegangenen, mittig überlappenden Amplifikate wurden in einem zweiten Schritt in eine daran anschließende kombinierte Linker-PCR eingesetzt (siehe 3.2.13.7 und Abb.14).

**Ausgangsmaterial:** Gesamt-RNA aus NT2/D1-Zellen nach 2-wöchiger Retinsäure-Behandlung



**Abb.14:** RT-PCR mit kombinierter Linker-PCR zur Amplifizierung der humanen Kanadaplin-cDNA. Beschreibung, siehe Text.



**Abb.15: Nachweis der Retinsäure-induzierten Expression der humanen Kanadaplin-cDNA.**

Das linke Bild zeigt die Gewinnung von Gesamt-RNA aus Retinsäure-behandelten NT2-Zellen und die daran anschließende RT-PCR der 5'-terminalen Kanadaplin-cDNA. Im rechten Bild ist ein mit Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel dargestellt, das in Spur 3 das entsprechende RT-PCR-Produkt nach 2-wöchiger Retinsäure-Induzierung zeigt. Der 5'-Terminus der humanen Kanadaplin-cDNA lies sich nach einer einwöchigen Retinsäure-Induzierung nicht amplifizieren (Spur 2). Als interne Kontrolle wurde die RT-PCR mit GAPDH-spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. Diese amplifizierten in beiden RT-

PCR-Reaktionen ein 576 bp großes GAPDH-spezifisches cDNA-Fragment. Als Längenstandard wurde der F-Marker (Lambda DNA/Eco91I (BstE II) von MBI Fermentas verwendet.

#### 4.6 Die Multidomänenstruktur von humanem Kanadaptin

Eine Untersuchung der Proteinsequenz zeigt, dass humanes Kanadaptin eine große Homologie zum Kanadaptin der Maus besitzt:

```

                                MLAPLRNAPGREGATSPSPPTDATGSLGEWDVDRNVKTEGVWSKERISKLHRLRMADILSOS
ETLASODLSGDFKKPALPVSPAARSKAPASSSSNPEEVOKEGPTALQDSNNGEPDIPPPQPCGDFRSLQEEQSRPTTAVSSPGGPAPAPPYQEPWGGP
ATAPYSLETLKGGTILGTRSLKGTSYCLFGRLSGCDVCLHPSVSRYHAVLQHRASGPDGECDSNGPGFYLYDLGSTHGTFLNKTRIPRTYCRVHVGHV

VRFGGSTRLFILQGPEDREAESLTVTQLKELRKQQQILLEKKMLGEDSDDEEEMDTSERKIN-AGSQDDEMGCTWGMGEDAVEDDAEENPIVLEFQQ
RFGGSTRLFILQGPEDREAESLTVTQLKELRKQQQILLEKKMLGEDSDDEEET E K G QDDE GCTWGMGEDAVED AEENPI L FQQ
MRFGGSTRLFILQGPEDREAESLTVTQLKELRKQQQILLEKKMLGEDSDDEEANTTEGKSSRSG-QDDELGCTWGMGEDAVEDEAEENPIALDFQQ

                                NLS1
EREAIFYIKDPKKALQGFFDREGEELLEYEFDEQGHSTWLCRVRLPVDDSTGKQLVAEAIHSGKKKEAMIQCSLEACRILDTLGLLRQEA VSRKRAKNWED
REAFYIKDPKKALQGFFDREGEELLEYEFDEQGHSTWLCRVRLPVDDSTGKQLVAEAIHSGKKKEAM QCSLEACR LDTLGLLRQEA VSRKRAKNWED
DREAIFYIKDPKKALQGFFDREGEELLEYEFDEQGHSTWLCRVRLPVDDSTGKQLVAEAIHSGKKKEAMVQCSLEACRVLDTLGLLRQEA VSRKRAKNWED

EDFYDSDDDTFLDRTGLIEKKRLNRMKKAGKIDEKPFESLVAKLNDARELSEISERLKASSQVLSESP-SQDSLDAFMSEMKS GSTLDGVSRRKKLHL
EDFYDSDDDTFLDRTGL EKKRLNRMKKAGK DEKPFESLVAKLNDAREL EISERLKASS VLSE P SQDSLDAFMSEMKS GSTLDGVSRRKKLHL
EDFYDSDDDTFLDRTGLVEKKRLNRMKKAGKIDEKPFESLVAKLNDARELAEISERLKASSKVLSE-PSSQDSLDAFMSEMKS GSTLDGVSRRKKLHL

                                bpNLS
RTFELRKEQQRLKGLIKIVKPAEIPELKKTETQTGAENKAKKLTLPLFGAMKGGSKFKLKTGTGKLPKRPPELPTLMRMKDEPEV-EEEEEEEEEE
RTFELRKEQQRLKGLIK VPAEIPELKKT E QTT AENK KKL LPLFGAMKGGSKFKLKTGTGKLPKRPPELPP LM MKDEPEV EEEEEEEEEEE
RTFELRKEQQRLKGLIKLIVKPAEIPELKKTETQTGAENKTKKLALPLFGAMKGGSKFKLKTGTGKLPKRPPELPPALMQMKDEPEVEEEEEEEEEEE

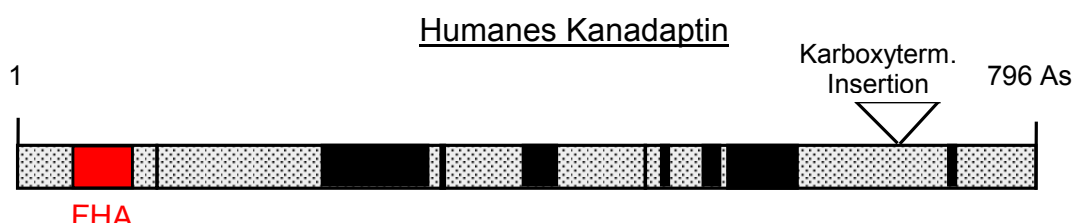
                                NLS2
KEKEEHEKKKLEDGSLSRPQPEIEP-EAAVQEMRPPTDLTHFKETQTHENMSQLEEEQNKDYQDCSKTTS LCAGPSASKNEYEK-SRGELKKKKTGPP
K KEEHE EDG Q EAAV P CSK T A P A NEY K R E-KKKK PGPP
KVKEEHEERV-EDGGVRLQEPLELEAAVEHPSAPSE-----PSCSKETKSHAAP-A--NEY-KQDRDEPKKKKSPGPP

KLPPPTLSSKYPEDDPDYCVWVPPEGQSGDGRTHLNDKYGY
K PP LSSKY EDDPDYC WVP EGQSGDGRTHLNDKYGY
KFPPILSSKYREDDPDYCVWVPREGQSGDGRTHLNDKYGY

```

**Abb.16:** Vergleich der Aminosäuresequenzen der Kanadaptinisoformen aus Maus und Mensch (humanes Kanadaptin; aminoterminal Extension; karboxyterminale Insertion; Mauskanadaptin; identische Aminosäuren).

Hierdurch besitzt humanes Kanadaptin eine ähnliche Domänenstruktur wie das Kanadaptin der Maus (siehe Abb.16). Außer der P-Schleife sind alle Domänensequenzen der Kanadaptin-Isoform der Maus im humanem Kanadaptin konserviert, auch die Kernlokalisationssequenzen. Darüber hinaus zeigt humanes Kanadaptin eine aminoterminal Extension mit einer charakteristischen Forkhead-Assoziations-Domäne (FHA-Domäne), die dem Kanadaptinprotein der Maus fehlt. Da sich diese FHA-Domäne in vielen DNA-bindenden Proteinen befindet (Stone et al., 1994) und möglicherweise Kernlokalisationsseigenschaften besitzt, wurden mit der humanen Kanadaptin-Isoform im zweiten Teil der Arbeit subzelluläre Lokalisationsuntersuchungen an entsprechend transient transfektierten Zelllinien durchgeführt.





**Abb.17: Domänenvergleich zwischen dem Kanadaplin des Menschen und der Maus.** Humanes Kanadaplin zeigt große Homologie zum Kanadaplin der Maus (95 %: siehe auch Abb.16). Innerhalb der aminoterminalen Extension enthält humanes Kanadaplin die für nukleäre Proteine typische Forkhead-Assoziations-Domäne (FHA). Während Kanadaplin der Maus an Position 1 ein Methionin (M) besitzt, weist menschliches Kanadaplin an homologer Position 263 ein Valin (V) auf.

#### 4.7 Die Forkhead-Assoziations-Domäne von humanem Kanadaplin

Mit Hilfe der PROSITE-Datenbank (Bairoch, 1993; Bairoch et al., 1997)/SMART (Simple Modular Architecture Research Tool; Schultz et al., 1998; Schultz et al., 2000) konnte innerhalb der humanen Kanadaplin-Aminosäuresequenz eine aminoterminal gelegene Forkhead-Assoziations-Domäne (FHA-Domäne) identifiziert werden. Die FHA-Domäne ([www.isrec.isb-sib.ch/domains/dd/](http://www.isrec.isb-sib.ch/domains/dd/)) gehört zu der stark konservierten Familie der Phosphoprotein-Bindedomänen.

Das Sequenzprofil einer typischen FHA-Domäne umfasst etwa 55-140 Aminosäurereste (Hofmann und Bucher, 1995; Durocher et al., 1999; Li et al., 2000). FHA-Domänen werden in zwei Familien gruppiert, in die NIPP1- und die RAD53-ähnliche FHA-Domänenfamilie (Boudrez et al., 2000). Die FHA-Domäne der humanen Kanadaplin-Isoform wird der NIPP1-FHA-Domänenfamilie zugeordnet (siehe Abb.18).

Die FHA-Domäne besteht aus 11 zum Teil parallel verlaufenden  $\beta$ -Faltblättern (siehe Abb.19). Auffallend sind innerhalb eines  $\beta$ -Faltblattes drei hochkonservierte Blöcke (IGR – S...HA – NGT), die verschieden weit voneinander getrennt sind.

##### NIPP1-like

Hs-NIPP1	EWAGKPPGLHLDVVKGDKLIEKLIIDEKKYTFGR	5	DETIDHQSCEVSRVHAALVYH	5	VELIDLNSTHGHGELGHIRLEPHKQQIPIDSTVSEGASTRAYTL
Mm-Kanad.	ESWGSEATAPYSLETILGGTILGTRTLKDTSCCEGR	4	DICLHPSPVSRVHVLQHR	14	FYLYDLGSGTHGSEINKTRIPRTYCRVHVGHVMEGGSTRFLIL
Dd-PinA	PEWASKIISNVYLEIKNGVNIDRVDISKDKETVEGR	5	SVLLDHPSPVSRVHAALVYH	5	FYLYDLGSAIGTOVNDQVKPLTPTTVKENFTFEGSSSKHFL
Ce-Trembl	PEEAKKNARWRNYPEKGEESLQVLYIHRQSAYLIGR	5	DIPVDHPSCSKQHAVLQFR	16	PYLYDLGSGAGDEINEKKIEPQRYIELQEKDMLKGGPSTREYV
Os-EST	PEWSAAGHPHFFDEVLRDGTIVDKLDVSRKAYMEGR	4	DEVLEHPTISRFHVLQFR	4	FELYDLGSGTHGSEINKTQVKKIYVEIHVGDVIRGQSSRLYIF
At-Trembl	PDWATEBRAGVYSDEVVRDGGQILDRIHLDERRHIFGR	5	DEVLDHQSCEVSRVHAALVYH	4	IEVLDLCSAHGSEVANERLTKDTPVELEVQSLRGAASTRIYLL
Consensus	P Wu P a L- hK 1 1 1 hEGR		Dh 1-H o S+ HA 1 a+		hal DL S GoFl 1 1 h+Fu So+ alh

##### RAD53-like

Sc-RAD53	SSKKKGNGRFLTKPLPDSIIQESLEIQGVNPFETIGR	4	NCKIEDNRLSRVCFIFKK	17	DIWYCHTGNVSYINNRMRIQGTKFLLDQDGEIKI IWDKNNKFV
At-KAPP	VEDQSRWLFLEVIAGPAIGLQHAVNSTSSSKLPVKIGR	4	DLALKDSEVSGKHAQITWN	5	WELVDMGSLNGTLVNSHSISHPDLGSRKWNPELASDDIITLG
Sc-MEK1	DIEMAGGVAPAHLEVNVGGYNTEQTIPIVHKQLVKVGR	5	QLVLINPSSISSVCEVFCV	8	MFYVKDCSLNGTYINGLLLRDKTKYLLKHCVDIELSQSGSEENDI
Mm-MNF	PGGRGRCCLRAPEPGPALARLEGREFEFILMRQPSVTIGR	9	SMGLSSFISRRHLQLSFQ	2	HFYLRCLGRNGV.FVDGAFQRRGAPALQLPQQCTFRFPSTAIKI
Hs-Kf1A	LGVSFSPKKTPHLVNINEDPIMSCECLLYIKDGIITRVGR	7	DIVLSGHFIKEECVFRSD	12	PCEGADTYVNGKKVTEPSILRSNGRIIMGKSHVFRFTHPQARQ
Dm-KLP38B	LELTAEQKQACLVNLTADPILSGTLFYLPLQGLVRIGR	12	DIVLDGPLVALQICSEIHE	9	GSEDFETYVNGELLKDRRLQFLHGDRLVIGGSHYFRISNPFCSQR
Consensus	1 1 h LGR		h 1 lu H h		NG h h 1

GR

S H

NG

**Abb.18: Klassifizierung von FHA-Domänen.** Gezeigt sind FHA-Domänen von verschiedenen Proteinen. Bezüglich ihres Sequenzmusters kann man sie in die Familie der NIPP1- bzw. RAD53-

ähnlichen FHA-Domänen einteilen (Boudrez et al., 2000). Die FHA-Domäne des humanen Kanadaptins wird der NIPP1-ähnlichen FHA-Domänenfamilie zugeordnet (siehe auch unterer Sequenzblock). Eine innerhalb der 5'-nichttranslatierten Region der Kanadaptin-cDNA der Maus liegende putative FHA-Domäne kann ebenfalls der NPP1-ähnlichen FHA-Domänenfamilie zugeordnet werden. Abkürzungen: At, Arabidopsis thaliana; Ce, Caenorhabditis elegans; Db, Dictyostelium discoideum; Dm, Drosophila melanogaster; Hs, Homo sapiens; Mm, Mus musculus; Os, Oryza sativa; Sc, Saccharomyces cerevisiae.

Eine Profilbeschreibung der FHA-Domäne befindet sich bei PROSITE (Bairoch und Boeckmann, 1992) unter der Zugangsnummer PS50006 (Hofmann und Bucher, 1995).

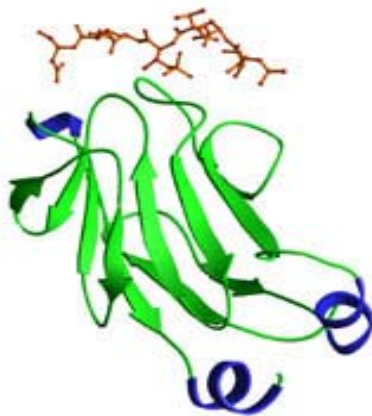
Konservierte Sequenzbereiche der FHA-Domäne von humanem Kanadaptin:

<sup>188</sup>YCLF**GRL**SGCDVCLHPSV**SRYH**AVLQHRASGPDGECDS**NG**PGFYLYDLGS  
THGTFLNKTR

Die FHA-Domäne wurde 1995 von Hofmann und Bucher aus einer Gruppe von Forkhead-Transkriptionsfaktoren identifiziert. Seitdem entdeckte man sie auch bei vielen Signalproteinen, wie Adenylatzyklasten, Proteasen, Kinesinen und Glykoproteinen (smart.embl-heidelberg.de/; Schultz et al., 2000). Außerdem sind sie auch bei Proteinkinasen (Ser/Thr- und His-Kinasen) oder Phosphatasen anzutreffen.

Bisher fand man FHA-Domänen in über 100 unterschiedlichen Proteinen - sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten (Li et al., 2000; Durocher et al., 2000).

Während alle FHA-Domänen in der Primärsequenz stark voneinander abweichen, sind sie sich in der Sekundär- und Tertiärstruktur sehr ähnlich. Die Domänenstruktur ist von denen anderer Phosphoprotein-bindender Domänen klar unterscheidbar (siehe Abb. 19).



**Abb.19: Die FHA- (Gabelkopfdomäne)**

besteht aus 11 zum Teil parallel verlaufenden  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen mit kurzen  $\alpha$ -Helix-Insertionen zwischen den  $\beta$ -Strängen 2 und 3 und einer  $\alpha$ -helikalen Region am externen C-Terminus. Die N- und C-Termini liegen nahe der  $\beta$ -Stränge.

Aufgrund des Faltungsmusters befindet sich die Peptid-Binderegion auf der gegenüber liegenden Seite der FHA-Domäne. Das Bild zeigt die N-terminale FHA-Domäne von Rad53 in Verbindung mit einem Phosphothreonin-Peptid (Durocher et al., 2000).

#### 4.8 Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von humanem Kanadaptin in verschiedenen Zelllinien

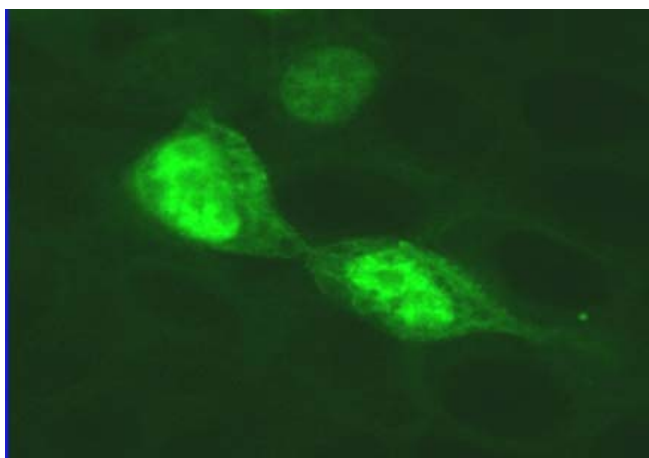
Wie Anfangs erwähnt, unterscheidet sich das Kanadaptin des Menschen von dem der Maus vor allem dadurch, dass das humane Kanadaptin eine FHA-Domäne-enthaltende aminoterminal Extension besitzt. Es war deshalb das Ziel, herauszufinden, welchen Einfluss diese Extension auf die subzelluläre Lokalisation der humanem Kanadaptin-Isoform ausübt. Die entsprechenden Lokalisationsstudien wurden alle an transient transfizierten HEK-293, MDCK- und HeLa-Zellen durchgeführt. Hierzu wurde die cDNA des humanen Kanadaptins, wie unter Abb.14 dargestellt, kloniert und über eine Zwischenklonierung im pGEM<sup>®</sup>-T Vektor in die EcoR I-Schnittstelle des



eukaryontischen Expressionsvektors pEGFP N3 bzw. pEGFP C1 inseriert (siehe Anhang III). Die daraus resultierenden Expressionsvektoren, pGFP-humKan bzw. phumKan-GFP, kodierten für Kanadaptin-Fusionsproteine, die das grünfluoreszierende Protein entweder karboxyterminal (humKan-GFP, Abb.20) oder aminoterminal (GFP-humKan, Abb.21) enthielten. Die Transfektionen wurden mit dem Transfektionsreagenz Effectene<sup>TM</sup> (siehe 3.2.3) durchgeführt.

Bei GFP handelt es sich um ein grünfluoreszierendes Protein aus der Qualle *Aequorea victoria*. Extrakte der Lichtorgane von *Aequorea* enthalten zwei Proteine, von denen eines unter Zugabe von Ca<sup>2+</sup> blaues Licht (460 nm) emittiert, während das andere nach entsprechender Anregung grün fluoresziert (508 nm). In der Natur gibt es etwa 20 verschiedene GFP-Typen, von denen das GFP aus *Aequorea victoria* ein kompaktes, globuläres Protein von etwa 27 kD ist, das sein Emissionsmaximum bei 508/509 nm besitzt. Das GFP macht es möglich, exprimierte Proteine für Lokalisations- oder Bindungsstudien in lebenden Zellen zu beobachten. 16 bis 24 Stunden nach Transfektion wurden die entsprechend transfektierten Zellen in 4 % Formaldehyd fixiert und daran anschließend unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 135 TV, siehe 3.1.1) betrachtet. Wie beim Kanadaptin der Maus war nach Expression von humKan-GFP die Fluoreszenz nur in Zellkernen nachzuweisen (siehe Abb.20).

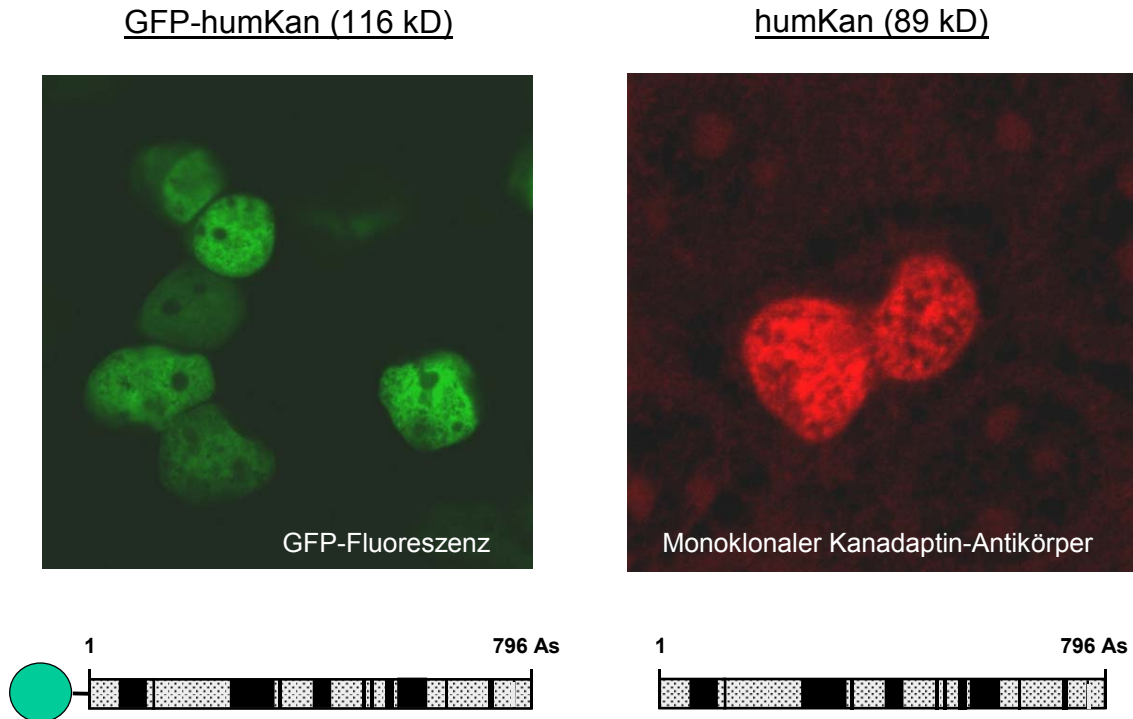
Um auszuschließen, dass das GFP einen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation des Fusionsproteins nimmt, wurde das humane Kanadaptin auch ohne GFP exprimiert. Hierzu wurde die cDNA von humanem Kanadaptin, wie unter Abb.14 gezeigt, kloniert und über eine Zwischenklonierung im pGEM<sup>®</sup>-T Vektor in die EcoR I-Schnittstelle des eukaryontischen Expressionsvektors pcDNA 3.1 (+) inseriert (siehe Anhang III). Der daraus resultierende Expressionsvektor phumKan kodierte für humanes Kanadaptin (Abb.21). Die Transfektionen wurden mit dem Transfektionsreagenz Effectene<sup>TM</sup> (siehe 3.2.3) durchgeführt. 16 bis 24 Stunden nach Transfektion wurden die transfektierten Zellen 10 min in 4 % Formaldehyd fixiert, 5 min in PBS/Triton X-100 permeabilisiert, in 1-2 % BSA/NGS für 1 Stunde blockiert, mit dem Kanadaptin-Antikörper (1:50 in PBS, Transduction Laboratories) über Nacht bzw. nach 3 x 5 min Waschen mit PBS für 1 Stunde mit dem Cy<sup>TM</sup>3-konjugierten Ziege-gegen-Maus-Zweitantikörper (1:600 in PBS, Dianova) inkubiert. Die so behandelten Zellen wurden schließlich 3 x 5 min mit PBS gewaschen, in NPG (Sigma) eingebettet und unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 135 TV) betrachtet. Auch hier lokalisierte Kanadaptin im Zellkern (siehe Abb.21).



humKan-GFP (116 kD)



**Abb.20: Humanes Kanadaptin mit karboxyterminalem GFP in MDCK-Zellen.**

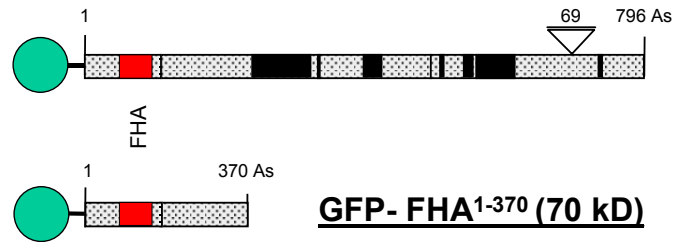
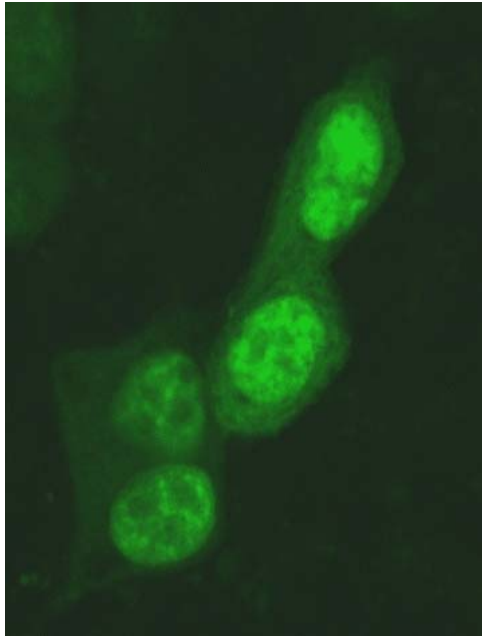


**Abb.21: Humanes Kanadaplin mit C- und N-terminalem GFP in MDCK-Zellen.**

Diese Experimente zeigten, dass humanes Kanadaplin sowohl als Wildtyp als auch als GFP-Fusionsprotein wie das Kanadaplin der Maus hauptsächlich im Zellkern lokalisiert. Da über die FHA-Domäne bekannt ist, dass sie auch über kernlokalisierende Eigenschaften verfügt (Hofmann und Bucher, 1995), richtete sich der weitere Fokus der Untersuchungen auf die nähere Charakterisierung der FHA-Domäne.

#### **4.9 Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von FHA-Domäne-enthaltenden Fusionsproteinen**

Zur Untersuchung einer möglichen Kernlokalisationsaktivität der FHA-Domäne wurde der Expressionsvektor pGFP-humKan mit BamH I geschnitten und die für den Karboxyterminus kodierende cDNA deletiert und der verbleibende Vektor religiert. Der daraus resultierende Expressionsvektor wurde pGFP-FHA<sup>nt1-1110</sup> genannt und kodierte für die gesamte aminoterminalen FHA-Domäne-enthaltene Extension (siehe Anhang IV). Mit pGFP-FHA<sup>nt1-1110</sup> transfizierte Zellen zeigten für das 70 kD große Fusionsprotein eine überwiegend nukleäre Akkumulation (siehe Abb.22).

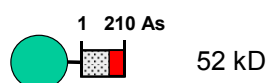
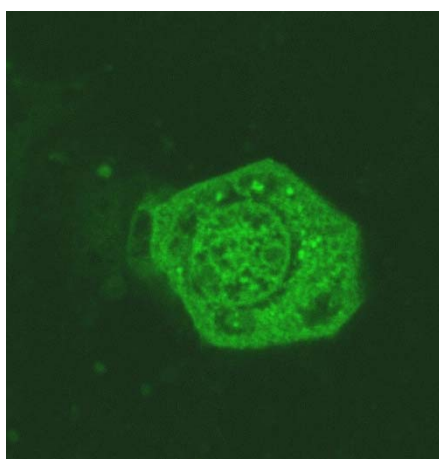


**Abb.22: Subzelluläre Lokalisation von GFP-FHA<sup>1-370</sup> in MDCK-Zellen.**

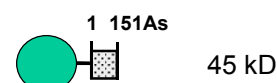
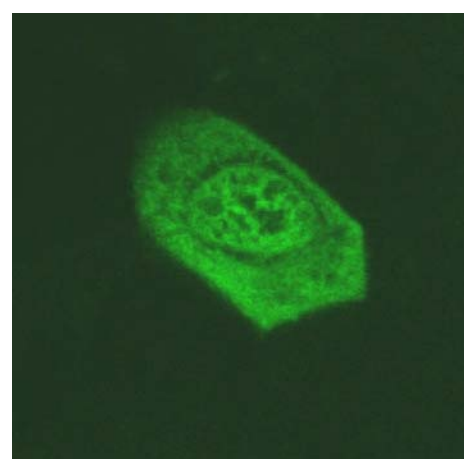
Um heraus zu finden, welche Rolle die FHA-Domäne bei der nukleären Akkumulation von GFP-FHA<sup>1-370</sup> spielt, wurde der FHA-Domäne enthaltene Aminoterminus systematisch trunkiert. Hierzu wurden Expressionsvektoren konstruiert, die GFP-Fusionsproteine mit einer karboxyterminal trunkierten FHA-Domäne (GFP-humKan FHA<sup>1/2</sup>) bzw. ohne FHA-Domäne (GFP-humKan  $\Delta$ FHA) exprimierten.

Dazu wurde der Expressionsvektor pGFP-humKan mit Kpn I bzw. mit Sma I geschnitten und religiert. Mit den daraus resultierenden Vektoren pGFP-humKan<sup>nt1-630</sup> FHA<sup>1/2</sup> bzw. pGFP-humKan<sup>nt1-453</sup>  $\Delta$ FHA (siehe Anhang IV) wurden MDCK-Zellen transfektiert. 16 bis 24 Stunden nach Transfektion wurden die transfektierten Zellen in 4 % Formaldehyd fixiert und unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 135 TV) betrachtet. Beide Fusionsproteine zeigten eine gleichmäßige Zellkern/Zytoplasma-Verteilung (siehe Abb.23).

GFP-humKan FHA<sup>1/2</sup>

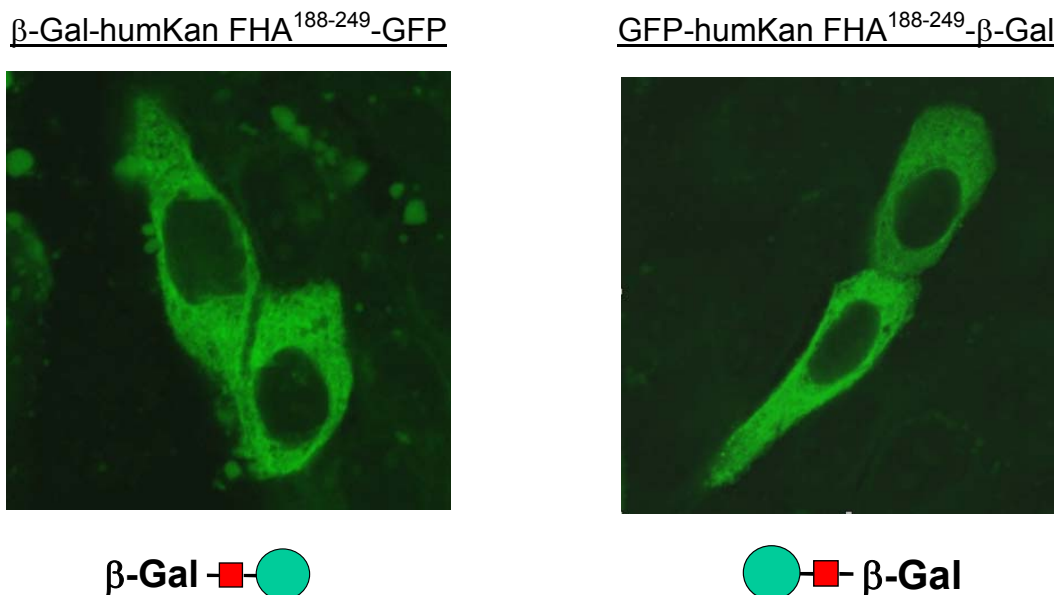


GFP-humKan  $\Delta$ FHA



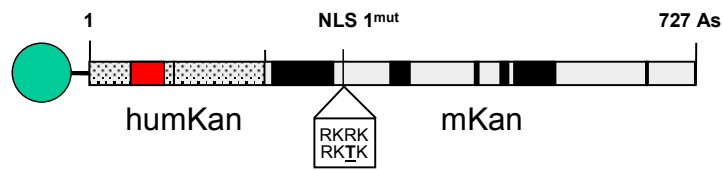
**Abb.23: Subzelluläre Lokalisation von GFP-humKan<sup>1-210</sup>FHA<sup>1/2</sup> und GFP-humKan<sup>1-151</sup>  $\Delta$ FHA Fusionsproteinen in MDCK-Zellen.**

Basierend auf diesen Ergebnissen gab es mehrere Möglichkeiten der nukleären Akkumulation von GFP-FHA<sup>1-370</sup>. Beispielsweise durch Diffusion von GFP-FHA<sup>1-370</sup> durch den Kernporenkomplex mit daran anschließender Bindung an nukleäre Strukturen (Stone et al., 1994), durch aktiven Transport aufgrund einer in GFP-FHA<sup>1-370</sup> liegenden NLS oder durch Bindung an ein karyophiles Protein (Huckepack-Transport). Um heraus zu finden welche Rolle die FHA-Domäne bei der nukleären Akkumulation von GFP-FHA<sup>1-370</sup> spielt, wurde die komplette FHA-Domäne in ein ausschließlich zytoplasmatisch lokalisierendes Fusionsprotein inseriert. Hierzu wurde die FHA-Domäne durch eine PCR mit den beiden Oligonukleotiden 5' hum Kan FHA Nhe I und 3' hum Kan FHA Nhe I aus pGFP-humKan isoliert, das Amplifikat in den pGEM<sup>®</sup>-T Vektor zwischenkloniert und nach dem Herausschneiden des FHA-Amplifikates mit Nhe I in die Nhe I-Schnittstellen der Vektoren pHM829 und pHM830 inseriert (siehe Anhang V). 16 bis 24 Stunden nach Transfektion in MDCK-Zellen wurden die Zellen in 4 % Formaldehyd fixiert und daran anschließend unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 135 TV) betrachtet. Beide Expressionsprodukte,  $\beta$ -Gal-humKan FHA<sup>188-249</sup>-GFP und GFP-humKan FHA<sup>188-249</sup>- $\beta$ -Gal, lokalisierten ausschließlich im Zytoplasma.



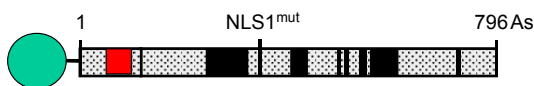
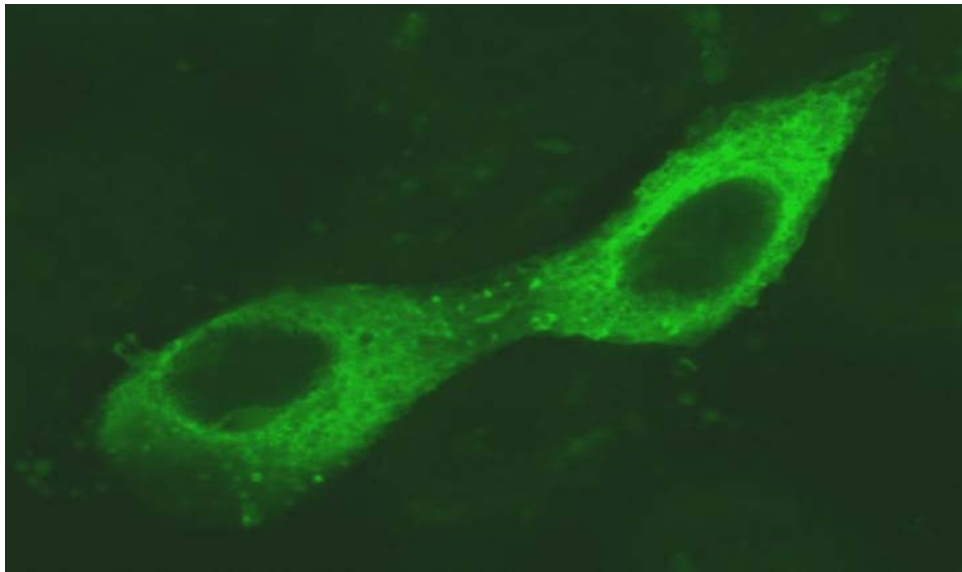
**Abb.24:** Subzelluläre Lokalisation von  $\beta$ -Gal-humKan FHA<sup>188-249</sup>-GFP und GFP-humKan FHA<sup>188-249</sup>- $\beta$ -Gal in MDCK-Zellen.

Die Ergebnisse zeigten, dass die isolierte FHA-Domäne über keine eigenen Kernlokalisierungseigenschaften verfügt. Inwieweit für die Translokation von GFP-FHA<sup>1-370</sup> in den Zellkern FHA-flankierende Sequenzen benötigt werden bzw. Wechselwirkungen mit einem karyophilen Protein Voraussetzung sind, wurde durch subzelluläre Lokalisationsexperimente mit einem aus humanen und murinen Anteilen zusammengesetztes Kanadaptinprotein untersucht. Hierzu wurde der Expressionsvektor pGFP-humKan mit BamH I linearisiert. Parallel dazu wurde aus dem pGFP-K6 Vektor (Hübner et al., 2002) die NLS1-mutierte Mauskanadaptin-cDNA über eine BamH I-Restriktion isoliert und in den BamH I-linearisierten pGFP-FHA<sup>nt1-1110</sup>-Vektor inseriert (siehe Anhang VI). Der daraus resultierende Expressionsvektor wurde pGFP-humKan<sup>1-789</sup>/mKan<sup>1-1521</sup> mit punktmutierter NLS1<sup>Arg191→Thr</sup> genannt. 16 bis 24 Stunden nach Transfektion von MDCK-Zellen wurden die Zellen in 4 % Formaldehyd fixiert und daran anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 135 TV) betrachtet. Es zeigte sich eine zytoplasmatische Lokalisation des chimären Kanadaptin-Fusionsproteins.



**Abb.25: Aminoterminal GFP-konjugiertes Mensch<sup>1-263</sup>/Maus-Volllängen-Kanadaplin mit punktmutierter NLS1<sup>Arg191→Thr</sup> (116 kD).**

Aminoterminal GFP-konjugiertes Mensch<sup>1-263</sup>/Maus-Volllängen-Kanadaplin mit punktmutierter NLS1<sup>Arg191→Thr</sup> (116 kD)



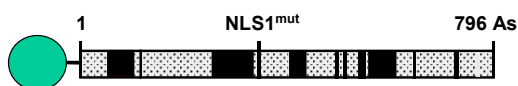
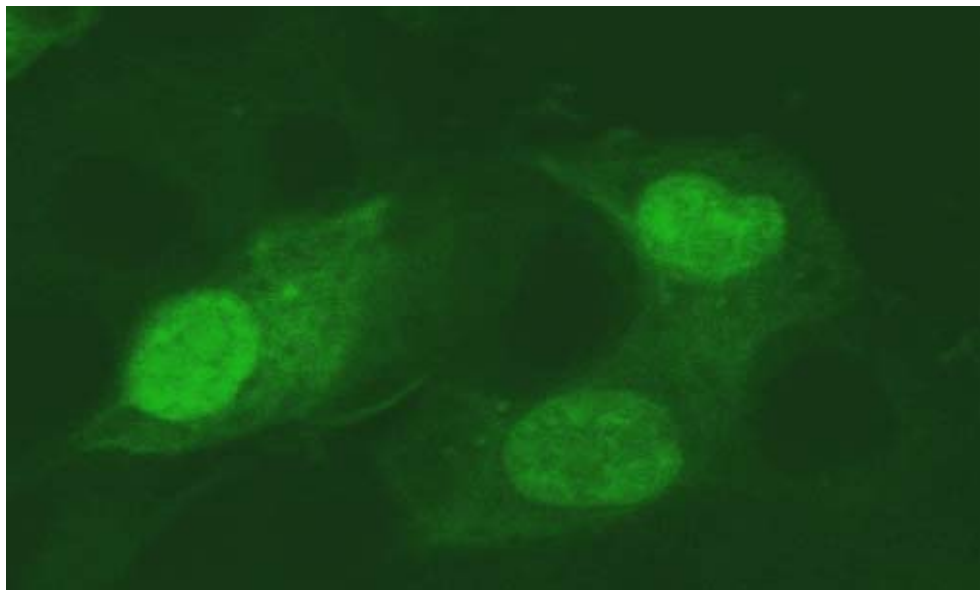
**Abb.26: Subzelluläre Lokalisation von aminoterminal GFP-konjugiertem Mensch<sup>1-263</sup>/Maus-Volllängen-Kanadaplin mit punktmutierter NLS1<sup>Arg191→Thr</sup> in MDCK-Zellen.**

#### 4.10 Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von NLS-mutierten humanen Kanadaplin-Fusionsproteinen

Nachdem die unter 4.9 beschriebenen Fusionsproteine gezeigt hatten, dass die FHA-Domäne keinerlei kernlokalisierende Eigenschaften besitzt, wurde in den folgenden Experimenten untersucht, welchen Einfluss die an homologer Position zur murinen NLS1 liegende NLS1 auf die subzelluläre Lokalisation des humanen Kanadaptins ausübt. Hierzu wurde eine entsprechende NLS1-Mutante des humanen Kanadaptins hergestellt. Die Mutation wurde durch punktmutierte Oligonukleotide erzeugt. Die Konstruktion des NLS1-punktmutierten humanen Kanadaptins erfolgte ähnlich der Volllängen-cDNA-Klonierung (siehe Anhang VII). Hierzu wurden zu Anfangs in Gegenwart der Oligonukleotide 5' hum Kan genom12 und 3' DeltaNLS 1 bzw. 5' Delta NLS 1 und 3' hKan-3 aus dem pGFP-humKan-Expressionsvektor, die gesamte humane Kanadaplin-cDNA abdeckende, überlappende PCR-Fragmente amplifiziert (1.359 bp und 1.032 bp). Beide Amplifikate wurden in einer zweiten PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden 5' GFP hum Kan-1 und 3' GFP hum Kan-1 zur NLS1-mutierten

humanen Kanadaptin-cDNA amplifiziert (siehe 3.2.13.6). Die cDNA wurde daran anschließend in den pGEM-T® Vektor zwischenkloniert. Über eine Hind III-Restriktion wurde das Fragment aus dem Klonierungsvektor wieder freigesetzt und in den Hind III-linearisierten pEGFP C1-Expressionsvektor inseriert. 16 bis 24 Stunden nach Transfektion in MDCK-Zellen wurden die transfektierten Zellen in 4 % Formaldehyd fixiert und daran anschließend unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 135 TV) betrachtet. Im Gegensatz zum NLS1-mutierten Kanadaptin der Maus (Hübner et al., 2002) akkumulierte das NLS1-mutierte humane Kanadaptin (GFP-humKan NLS1<sup>mut</sup>) überwiegend im Zellkern (siehe Abb.27).

#### GFP-humKan NLS1<sup>mut</sup>



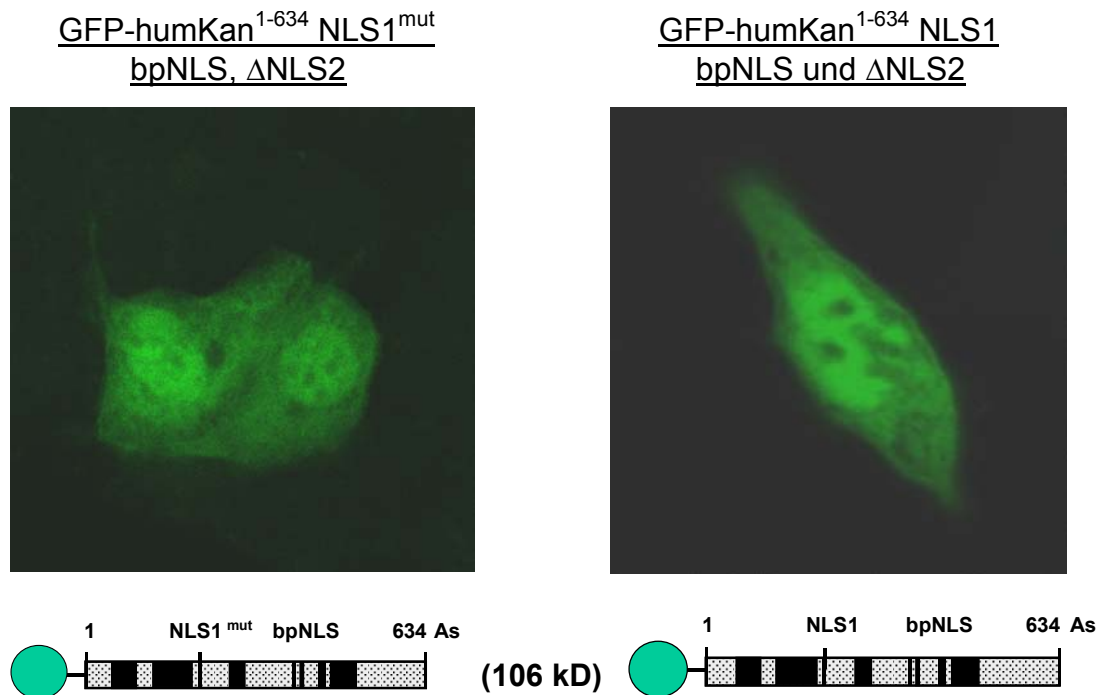
**Abb.27: Subzelluläre Lokalisation des humanen NLS1-mutierten GFP-Kanadaptinfusionsproteins in MDCK-Zellen. Das Protein ist überwiegend in den Zellkernen, z. T. aber auch im Zytoplasma lokalisiert.**

Dieses Experiment zeigte, dass eine Punktmutation innerhalb der NLS1 offensichtlich keinen signifikanten Einfluss auf die Kerntranslokation des GFP-humKan NLS1<sup>mut</sup>-Fusionsproteins ausübt. Es wurde deshalb angenommen, dass die karboxyterminal positionierten Kernlokalisationssequenzen (bpNLS, NLS2) möglicherweise für die Kernlokalisierung des Fusionsproteins verantwortlich sind. Aus diesem Grund wurde der NLS2-enthaltene Karboxyterminus deletiert (siehe Abb.28).

Hierfür wurde der Expressionsvektor pGFP-humKan<sup>nt1-1902</sup> NLS1<sup>mut</sup> mit Bgl II geschnitten und dieser nach Deletion der NLS2 enthaltenen cDNA religiert. Der entsprechende Expressionsvektor wurde pGFP-humKan<sup>1-634</sup> NLS1<sup>mut</sup> bpNLS, ΔNLS2 genannt (siehe Anhang VIII). 16 bis 24 Stunden nach Transfektion von MDCK-Zellen mit dem NLS2-deletierten Expressionsvektor wurden diese in 4 % Formaldehyd fixiert und daran anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 135 TV) betrachtet. Das Fusionsprotein GFP-humKan<sup>1-634</sup> NLS1<sup>mut</sup> bpNLS lokalisierte zwar immer noch im Zellkern, doch erhöhte sich der zytoplasmatische Anteil der Fluoreszenz signifikant (siehe Abb.28). Demnach schien die deletierte NLS2 erheblichen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation des Fusionsproteins auszuüben. Um jedoch einen möglichen Einfluss der NLS1 auf die Lokalisation des Fusionsproteins GFP-humKan<sup>1-634</sup> NLS1<sup>mut</sup>

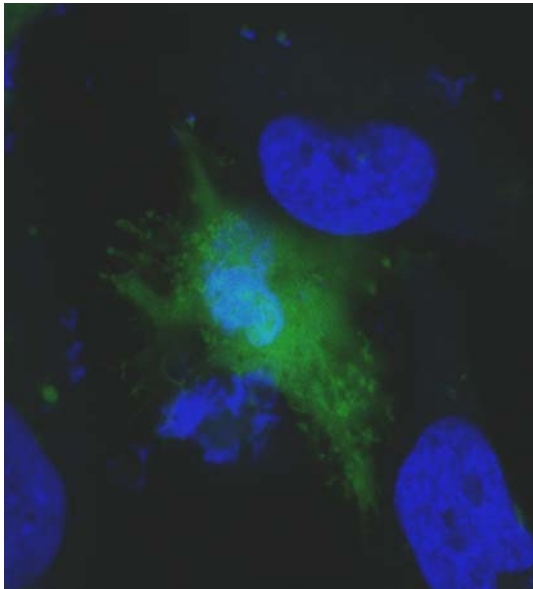


bpNLS zu berücksichtigen, wurde parallel ein für GFP-humKan<sup>1-634</sup> NLS1 bpNLS kodierender Expressionsvektor konstruiert. Hierzu wurde der Expressionsvektor pGFP-humKan ebenfalls mit Bgl II geschnitten, die für die NLS2 kodierende cDNA deletiert und der verbleibende Vektor religiert. Der Expressionsvektor wurde pGFP-humKan<sup>1-634</sup> NLS1 bpNLS,  $\Delta$ NLS2 genannt (siehe Anhang IX). Transfektionen von MDCK-Zellen mit pGFP-humKan<sup>1-634</sup> NLS1 bpNLS,  $\Delta$ NLS2 zeigten, das GFP-humKan<sup>1-634</sup> NLS1 bpNLS ähnlich lokalisierte, wie das GFP-humKan<sup>1-634</sup> NLS1<sup>mut</sup> bpNLS-Fusionsprotein.



**Abb. 28:** Subzelluläre Lokalisation der Expressionsprodukte GFP-humKanNLS1<sup>mut</sup> bpNLS und  $\Delta$ NLS2 sowie GFP-humKanNLS1 bpNLS und  $\Delta$ NLS2 in MDCK-Zellen.

Um die karyophilen Eigenschaften der verbliebenen bpNLS zu untersuchen, wurde mit Hilfe der PCR in Gegenwart der Oligonukleotide 5' humKan N-EcoR I/2 und 3' humKan N-EcoR I/2 sowie dem Expressionsvektor pGFP-humKan<sup>nt1-1902</sup> NLS1<sup>mut</sup> bpNLS,  $\Delta$ NLS2 ein bpNLS- und NLS2-deletiertes humanes Kanadaptin cDNA-Fragment amplifiziert, dieses im pGEM<sup>®</sup>-T Vektor zwischenkloniert und über eine EcoR I-Restriktion schließlich in den Expressionsvektor pEGFP C1 kloniert. Mit dem daraus resultierenden Expressionsvektor pGFP-humKan<sup>nt1-1716</sup> NLS1<sup>mut</sup>( $\Delta$ bpNLS,  $\Delta$ NLS2) (siehe Anhang X) transfizierte HeLa wurden 16 bis 24 Stunden später mikroskopiert. In allen Fällen zeigten GFP-humKan<sup>1-572</sup> NLS1<sup>mut</sup>( $\Delta$ bpNLS,  $\Delta$ NLS2)-exprimierte HeLa-Zellen Apoptose-ähnliche Veränderungen (siehe Abb.29), so dass es nicht möglich war, die subzelluläre Verteilung des Fusionsproteine näher zu untersuchen.



GFP-humKan<sup>1-572</sup>NLS1<sup>mut</sup>  
( $\Delta$ bpNLS,  $\Delta$ NLS2), 92 kD



**Abb.29: Subzelluläre Lokalisation von GFP-humKan<sup>1-572</sup>NLS1<sup>mut</sup>( $\Delta$ bpNLS, $\Delta$ NLS2), 92 kD in HeLa-Zellen.** Die Zellkerne wurden mit dem Hoechst-Farbstoff H 33258 gefärbt (siehe 3.2.21.2), um apoptotische Zellkerne transfektierter Zellen darzustellen.

## 5. Diskussion



## 5.1 Untersuchungen zum Kanadaptin der Maus

Auf der Suche nach Bindeproteinen des renalen Chlorid/Bikarbonat-Anionenaustauschers (renAE1) wurde 1998 von Chen et al. mit Hilfe des Zwei-Hybrid-Systems das Protein Kanadaptin (kidney anion exchanger adaptor protein) entdeckt. Immunzytochemische Untersuchungen mit einem polyklonalen, gegen das komplette Kanadaptin gerichteten Antikörper an der Kaninchenniere zeigten eine auf das gesamte Epithel der Sammelrohre beschränkte, zytoplasmatisch diffuse Immunfluoreszenz. In renAE1-exprimierenden Schaltzellen wurde zusätzlich eine an vesikulären Strukturen gebundene Kanadaptin-spezifische Immunfluoreszenz detektiert. Überraschenderweise wurde keine Kolo-kalisation zwischen dem basolateral positionierten renAE1 und Kanadaptin beobachtet. Da es sich bei den zytoplasmatischen Strukturen um renAE1-enthaltene Vesikel handelte, wurde für Kanadaptin eine Funktion beim Transport renAE1-enthaltener Vesikel zur basolateralen Membran postuliert. Neben der Expression in der Niere ergaben Northern Blot-Untersuchungen, dass Kanadaptin auch in renAE1-negativen Geweben exprimiert wird.

Auch eine Western-Blot-Analyse zeigte, dass Kanadaptin in verschiedenen Geweben der Ratte exprimiert wird (Gößmann, persönliche Mitteilung). So wurde ein besonders hoher Gehalt von Kanadaptin neben der Niere auch im Gehirn und in der Leber gefunden. Den niedrigsten Gehalt zeigten Gewebextrakte aus Lunge und Milz.

Aber auch in kultivierten Zelllinien wurde eine Expression von Kanadaptin beobachtet - sowohl auf Translations- als auch auf Transkriptionsebene (siehe Abb.3). Diese Befunde deuteten daraufhin, dass Kanadaptin über renAE1-unabhängige Funktionen verfügen muss. Diesbezüglich zeigten Hübner et al. (2002), dass Kanadaptin über karyophile Eigenschaften verfügt und NLS- sowie Importin-abhängig in den Zellkern kultivierter Zellen translozieren kann. Eine Expressed-Sequence-Tagged (EST)-Datenbankanalyse ergab darüber hinaus, dass Kanadaptin zu einem sehr frühen Zeitpunkt exprimiert wird. So finden sich erste Kanadaptin-spezifische EST-Sequenzen im Zweizellstadium der Maus (GenBank<sup>TM</sup> accession no. BB709436). Mit Hilfe der Western-Blot-Analyse konnte auf Proteinebene ebenfalls gezeigt werden, dass Kanadaptin zu einem frühen Zeitpunkt der embryonalen Entwicklung der Maus exprimiert wird. So wurde eine erste signifikante Kanadaptinexpression am 9. Embryonaltag detektiert (Abb.4).

Nachdem eine für Kanadaptin weitverbreitete und frühembryonale Expression nachgewiesen werden konnte, fokussierten sich daran anschließende Untersuchungen auf die subzelluläre Lokalisation von Kanadaptin in der Niere der Ratte. Die mit einem monoklonalen Kanadaptin-Antikörper durchgeführten immunzytochemischen Untersuchungen an Semidünnschnitten von in Epon-eingebetteter Rattenniere ergaben eine starke Immunreaktivität im proximalen Tubulusepithel (Abb.6). Auch nicht-radioaktive *in situ*-Hybridisierungen an Gefrierschnitten der Rattenniere in Gegenwart verschiedener Kanadaptin-spezifischer Ribosonden zeigten eine auf Epithelzellen des proximalen Tubulus beschränkte Hybridisierungsreaktion (Gößmann, persönliche Mitteilung). Darüber hinaus fand sich in renAE1-exprimierenden Schaltzellen entgegen den Beobachtungen der Arbeitsgruppe von Prof. Al-Awqati keine auffällige Immunfluoreszenz (Abb.8).

Die in proximalen Tubuluszellen beobachtete Immunfluoreszenz beschränkte sich hauptsächlich auf zytoplasmatische Strukturen, die an Mitochondrien erinnerte. Eine ähnliche subzelluläre Immunfluoreszenz wurde durch einen gegen die Cytochromoxidase Untereinheit I gerichteten Mitochondrien-spezifischen Antikörper hervorgerufen (Abb.11). Basierend auf diesen Ergebnissen lag die Vermutung nahe, dass Kanadaptin in Zellen des proximalen Tubulusepithels in Mitochondrien lokalisiert. Irritierend war in diesem Zusammenhang eine von Hübner et al. (2002) gemachte

Beobachtungen, dass an Formaldehyd/Triton X-100 behandelten Kulturzellen Kanadaptin ausschließlich in Zellkernen lokalisiert. Eine im Jahre 2000 publizierte Veröffentlichung zur subzellulären Lokalisation des Glukokortikoidrezeptors half diese Diskrepanz hinsichtlich der unterschiedlichen Lokalisation von Kanadaptin in kultivierten Zellen bzw. Rattennierenzellen zu interpretieren. Scheller et al. (2000) beobachteten nämlich, dass die immunzytochemische Darstellung der subzellulären Lokalisation des Glukokortikoidrezeptors davon abhängig ist, unter welchen Bedingungen Zellen fixiert bzw. permeabilisiert wurden. So wurde eine hauptsächlich nukleäre Immunfluoreszenz des Rezeptors in Formaldehyd/Triton X-100 bzw. Methanol/Triton X-100 behandelten Hepatomazellen beobachtet, während in Abwesenheit des Detergenz Triton X-100 Antikörperinkubationen eine für Mitochondrien typische Immunfluoreszenz zeigten (Scheller et al., 2000). Ausgehend von diesen Befunden wurden deshalb immunzytochemische Untersuchungen an Methanol/Azeton- bzw. Formaldehyd/Azeton-behandelten Mausfibroblasten durchgeführt. Wie im Falle des Glukokortikoidrezeptors lies sich unter diesen Bedingungen auch eine für Kanadaptin spezifische mitochondriale Immunfluoreszenz hervorrufen. Wurden Immunanalysen von Methanol- oder Formaldehyd-fixierten Mausfibroblasten in Gegenwart von Triton X-100 durchgeführt, rief der Antikörper eine hauptsächlich auf Zellkerne beschränkte Immunfluoreszenz hervor (Abb.10). Auch an anderen kultivierten Zellen (z. B. Hep-G2, U-373, SW-480; Hübner, persönliche Mitteilung) konnte diese vom Fixierungs- und Permeabilisierungsprotokoll abhängige Immunfluoreszenz beobachtet werden. Die mitochondriale Lokalisation wurde schließlich durch Doppelinkubation Methanol/Azeton behandelter Mausfibroblasten mit dem Kanadaptin-Antikörper und einem für Mitochondrien spezifischen Vitalfarbstoff eindeutig nachgewiesen (Abb.11).

Auch andere Arbeitsgruppen konnten für bestimmte Proteine, die sich durch mehrere subzelluläre Lokalisationen auszeichnen, wie das desmosomale Plaqueprotein Plakophilin 1, eine vom Fixierungs- und Permeabilisierungsprotokoll unterschiedliche Immunlokalisation zeigen. So zeigte Plakophilin 1 je nach Behandlungsprotokoll eine entweder rein desmosomale oder ausschließlich nukleäre Immunfluoreszenz (Schmidt et al., 1997). Darüber hinaus ergaben subzelluläre Fraktionierungen von Extrakten kultivierter Zellen, dass Kanadaptin in Mitochondrien enthalten ist (Abb.12). Dass die mitochondriale Lokalisation nicht durch eine unspezifische Bindung von Kanadaptin an Mitochondrien hervorgerufen wurde, konnte sowohl durch immunelektronenmikroskopische (Abb.13) als auch durch biochemische Untersuchungen gezeigt werden. Im Falle der Immunelektronenmikroskopie wurde Kanadaptin innerhalb der Mitochondrien proximaler Tubuluszellen detektiert (Abb.13). Dagegen lies sich Kanadaptin auch in mit Hochsalzbehandelten Mitochondrien nachweisen (Hübner, persönliche Mitteilung). Dennoch war es in kultivierten Zellen nicht möglich, durch Überexpression entsprechender NLS1-Kanadaptinmutanten, Kanadaptin in Mitochondrien zu lokalisieren (Hübner, persönliche Mitteilung). Darüber hinaus fehlt dem Kanadaptin eine für mitochondriale Proteine typische Signalsequenz.

## **5.2 Untersuchungen zum Kanadaptin des Menschen**

Seit Februar 2000 ist die cDNA-Sequenz einer menschlichen Kanadaptin-Isoform bekannt. Sie wurde von einer japanischen Arbeitsgruppe des Helix Research Instituts (Genomics Laboratory) erstmals aus einer Retinsäure-induzierten NT2-Hodenzelllinie isoliert.

Die humane Kanadaptin-cDNA kodiert für ein mit dem Kanadaptin der Maus stark homologes Protein, dass zusätzlich aminoterminal eine 262 Aminosäuren umfassende Extension sowie eine karboxyterminale Insertion enthält. Mit einem rechnerischen Molekulargewicht von 88,9 kD ist humanes Kanadaptin (796 Aminosäuren) beträchlich

größer als das der Maus (etwa 57 kD – 507 Aminosäuren). Hinsichtlich der Domänenstruktur sind sich die Kanadaplin-Isoformen sehr ähnlich. So besitzt humanes Kanadaplin ebenfalls mehrere Kernlokalisationssequenzen. Zusätzlich findet sich innerhalb der aminoterminalen Extension ein phosphorylierungsabhängiges Proteinbindemotiv, die sogenannte Forkhead-Assoziations-Domäne (FHA-Domäne). Über eine FHA-Domäne verfügt auch das Kanadaplin der Maus. Allerdings liegt diese innerhalb des 5'-nichttranslatierten Bereiches.

Viele der FHA-Domäne-enthaltenen Proteine lokalisieren im Zellkern und spielen dort eine wichtige Rolle während des Zellzyklus, der DNA-Reparatur und der Transkriptionsregulation. FHA-Domänen höherer Eukaryonten erkennen und binden an Phosphothreonin, Phosphoserin und vereinzelt auch an Phosphotyrosin (Durocher et al., 2000). Viele FHA-Domänenproteine sind karyophile Proteinkinasen, die mit DNA-Polymerasen wechselwirken (Allen et al., 1994; Murakami und Okayama, 1995). So ist SPK1 ein zentrales Regulatorelement des S-Phase-Kontrollpunktes im Zellzyklus, das die DNA-Reparatur einleitet (Zheng et al., 1993; Allen et al., 1994; Navas et al., 1995).

FHA-Domänen haben als sehr ursprüngliche und stark konservierte Phosphopeptid-Bindefamilie eine während der Evolution große Entwicklung durchlaufen. Man findet sie sowohl in prokaryontischen als auch in niederen (Hefen) bzw. höheren eukaryontischen Proteinen (Durocher et al., 1999). Das Genom des pathogenen Bakteriums *Mycobacterium tuberculosis* kodiert beispielsweise für fünf putative FHA-Domänen-Proteine. Für ein FHA-Domänen-Protein (CY1A11.16C) wurde die Phosphorylierungsabhängige Bindung an Peptide gezeigt (Durocher et al., 1999). Ein im Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* entdecktes FHA-Domänenprotein ist das zum Pin1-Protein (PROSITE Zugangsnummer U78757) homologe PinA-Protein (Bairoch, 1993). Es verfügt über eine NIPP1-ähnliche FHA-Domäne. Das Pin1-Protein gehört zu den wenigen Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen und ist an regulatorischen, phosphorylierungsabhängigen Signalwegen während des Zellzyklus beteiligt. So könnte PinA im Schleimpilz möglicherweise über die FHA-Domäne regulierend auf mitotische Phosphoproteine und damit auf den Zellzyklus wirken.

In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist die FHA-Domänen-enthaltende Proteinkinase Rad53p an der DNA-Reparatur und dem Zellzyklus beteiligt (Fay et al., 1997). Andere Rad53p-Homologe sind das Cds1p (*Schizosaccharomyces pombe* - Murakami und Okayama, 1995), DMNK (*Drosophila* - Oishi et al., 1998) und CHK2 (Mensch - Matsuoka et al., 1998). Diese Kinasen besitzen zwei FHA-Domänen.

Beim Menschen besitzt NIPP1 (Nuclear Inhibitor of Protein Phosphatase-1) eine aminoterminaler FHA-Domäne aus 142 Aminosäureresten. NIPP1 ist ein in nukleären „speckles“ mit Spleißfaktoren kolokalisierendes RNA-bindendes Protein und interagiert mit einer Typ 1-Proteinphosphatase (PP1). Über die FHA-Domäne bindet NIPP1 phosphorylierungsabhängig an cdc5 aus *Schizosaccharomyces pombe*, ein Regulator-Protein der prä-mRNA-Prozessierung (Boudrez et al., 2000; McDonald, 1999).

Ebenfalls über die FHA-Domäne erfolgt die Bindung des humanen KI-67 Antigens an ein humanes kinesinähnliches Protein2 (hKLP2 - Sueishi et al., 2000), das die Mitose kontrolliert. KI-67 sitzt nahe mitotischer Chromosomen und fungiert als Zellproliferations-Marker, da es nur in wachstumsaktiven Zellen exprimiert wird (Gerdes et al., 1984).

Bei Pflanzen erbrachten Studien der Kinase-assoziierten Phosphatase KAPP von *Arabidopsis thaliana* erstmals Klarheit über den Einfluss der FHA-Domäne bei phosphorylierungsabhängigen Protein-Protein-Interaktionen (Stone et al., 1994; Stone

et al., 1998). Denn KAPP spielt in Verbindung mit der rezeptorähnlichen Proteinkinase (Receptor-Like-Kinase, RLK) eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion. *In vitro*-Bindungsanalysen offenbarten, dass die KAPP-FHA-Domäne mit der multiplen katalytischen RLK-Domäne interagiert (Braun et al., 1997). Dabei sind RLKs für die Hormonregulation, das Wachstum und die Entwicklung wichtig (Li und Chory al., 1997; Li et al. 1999).

Basierend auf der Erkenntnis, dass FHA-Proteine größtenteils im Zellkern lokalisieren, lag der Fokus im zweiten Teil dieser Arbeit auf Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation des humanen Kanadaptins, unter besonderer Berücksichtigung des FHA-Domänen-enthaltenen Aminoterminus. Da uns die vom japanischen Helix Research Institut klonierte Kanadaptin-cDNA nur unter hohen Auflagen zur Verfügung gestellt worden wäre, entschlossen wir uns die cDNA selbst zu klonieren (siehe Abb.14 und 15).

Erste Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von humanem Kanadaptin wurde mit Expressionsvektoren durchgeführt, die für GFP-Kanadaptin-Fusionsproteine kodierten. In transienten Expressionsexperimenten lokalisierte sowohl das amino- bzw. das karboxyterminale GFP-Fusionsprotein (GFP-humKan bzw. humKan-GFP, 116 kD) als auch das humane Kanadaptin ohne GFP (humKan, 89 kD) im Zellkern (Abb.20 und 21). Wie das Kanadaptin der Maus ist auch die menschliche Kanadaptin-Isoform in der Lage, im Zellkern zu akkumulieren.

Um die kernsignalisierende Eigenschaft der FHA-Domäne näher zu untersuchen, wurde diese im Zuge unserer Domänenanalyse ebenfalls als GFP-Fusionsprotein exprimiert.

Interessanterweise war das GFP-FHA<sup>1-370</sup> trotz seiner Größe von 70 kD in der Lage fast ausschließlich in die Zellkerne zu translozieren (Abb.22). Diese kernlokalisierende Eigenschaft verlor sich nach Teil- und Komplettdelation der FHA-Domäne. So zeigten die entsprechenden Fusionsproteine (GFP-humKan<sup>1-210</sup> FHA<sup>1/2</sup>, 52 kD und GFP-humKan<sup>1-151</sup> ΔFHA, 45 kD) eine für das Molekulargewicht typische gleichmäßige zytoplasmatisch/nukleäre Verteilung (Abb.23).

Basierend auf diesen Ergebnissen ist zu vermuten, dass die aminoternale Extension möglicherweise über direkte oder indirekte kernlokalisierende Eigenschaften verfügt. Zum einen wäre es möglich, dass GFP-FHA<sup>1-370</sup> direkt oder gebunden an ein karyophiles Protein in den Zellkern transloziert, andererseits könnte das Fusionsprotein nach passiver Diffusion durch die Kernpore infolge daran anschließender Wechselwirkungen mit nukleären Strukturen spezifisch im Zellkern akkumulieren. Zur Identifizierung potentieller Kernlokalisationssequenzen wurde somit die FHA-Domäne (Aminosäuren 188-249) vollständig isoliert und zwischen GFP und β-Galaktosidase inseriert. Subzelluläre Lokalisationsuntersuchungen ergaben jedoch, dass solche Fusionsproteine (β-Gal-humKan FHA<sup>188-249</sup>-GFP bzw. GFP-humKan FHA<sup>188-249</sup>-β-Gal) mit einem Molekulargewicht von über 400 kD nicht im Zellkern akkumulieren konnten (Abb.24). Somit scheint die FHA-Domäne alleine nicht über kernlokalisierende Eigenschaften zu verfügen. Inwieweit für eine direkte Translokation in den Zellkern flankierende Sequenzen benötigt werden, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht zu beantworten. Auch Wechselwirkungen mit einem karyophilen Protein könnten abhängig von FHA-flankierenden Sequenzen stattfinden, und so für die Kerntranslokation des GFP-FHA<sup>1-370</sup> Fusionsproteins verantwortlich sein.

Daran anschließende Experimente untersuchten den Einfluss der FHA-Domäne auf die subzelluläre Lokalisation vom gesamten humanen Kanadaptin. Durch Untersuchungen von Hübner et al. (2002) war bekannt, dass beim Kanadaptin der Maus die aminoterminal liegende NLS1, für die Kernlokalisierung zuständig ist, da eine Mutation der NLS1 (Arg<sup>191</sup>→Thr) die Kernlokalisierung von Kanadaptin fast vollständig verhindert.

Inwieweit die aminoterminal Extension von humanem Kanadaptin in der Lage ist, das zytoplasmatisch lokalisierende Kanadaptin  $\Delta$ NLS1 der Maus in den Zellkern zu transportieren, wurde durch Herstellung einer Kanadaptin-Chimere (aminoterminal GFP-konjugiertes Mensch<sup>1-263</sup>/Maus-Volllängen-Kanadaptin mit punktmutierter NLS1<sup>Arg191→Thr</sup>) untersucht. Hierzu wurde die aminoterminal Extension des Kanadaptins aminoterminal mit dem NLS1-mutierten Kanadaptin der Maus fusioniert. Aufgrund der fehlenden Kernakkumulationsaktivität vom NLS1-mutierten Kanadaptin der Maus sollte, basierend auf den Lokalisationsstudien mit GFP-FHA<sup>1-370</sup>, das chimere Kanadaptin-Fusionsprotein in der Lage sein, im Zellkern zu akkumulieren. Stattdessen wurde jedoch eine zytoplasmatische Lokalisation beobachtet (siehe Abb.26). Basierend auf diesem Ergebnis lag die Vermutung nahe, dass die aminoterminal Extension auf Wechselwirkungen mit nukleären Strukturen im Zellkern beruht. So erfolgt wie oben angenommen die nukleäre Akkumulation von GFP-FHA<sup>1-370</sup> wahrscheinlich mittels Diffusion durch den Kernporenkomplex mit daran anschließender nukleärer Retention. Dies steht in Einklang zu vielen Untersuchungen, die zeigen, dass die FHA-Domäne, phosphorylierungsabhängig, die subzelluläre, insbesondere nukleäre Lokalisation FHA-enthaltener Proteine reguliert. Eine Erhöhung des Molekulargewichtes von 70 kD auf 116 kD unterbindet die passive Diffusion des entsprechenden Fusionsproteins, so dass das chimere Kanadaptin-Fusionsprotein im Zytoplasma lokalisiert bleibt.

Welche Rolle die NLS1 von humanem Kanadaptin bei der subzellulären Lokalisation spielt, wurde in anschließenden Experimenten untersucht. Hierzu wurde ein NLS1-punktmutiertes humanes GFP-Kanadaptin-Fusionsprotein (GFP-humKan  $\Delta$ NLS1) hergestellt. Gegenüber der NLS1-Mutante vom Kanadaptin der Maus wurde für GFP-humKan  $\Delta$ NLS1 in kultivierten Zellen eine noch ausgeprägte Kernakkumulation beobachtet (Abb.27). Die Deletion der NLS2 dagegen führte zu einer signifikanten Zunahme der zytoplasmatischen Lokalisation des entsprechenden Fusionsproteins (GFP-humKan<sup>1-634</sup>NLS1<sup>mut</sup> bpNLS $\Delta$ , NLS2), dennoch konnte auch hier noch eine ausgeprägte Kernakkumulation beobachtet werden (Abb.28). Diese Untersuchungen deuteten auf eine mögliche Aktivität der noch verbliebenen bipartialen NLS hin. Unglücklicherweise zeigten Zellen, die das komplette NLS-deletierte 92 kD-Fusionsprotein GFP-humKan<sup>1-572</sup>NLS1<sup>mut</sup> ( $\Delta$ bpNLS,  $\Delta$ NLS2) exprimierten, zytoplasmatische Ausstülpungen (membrane blebbing), die typisch für apoptotische Zellen sind (Abb.29). Untersuchungen zur subzelluläre Lokalisation des Fusionsproteins konnten deshalb nicht durchgeführt werden.

Zusammenfassend zeigen die subzellulären Lokalisationsstudien, dass die nukleäre Akkumulation der Kanadaptin-Isoformen durch unterschiedliche NLSs reguliert wird. So ist die Translokation vom Kanadaptin der Maus fast vollständig von der aminoterminalen NLS1 abhängig (Hübner et al., 2002). Im Gegensatz dazu ist die nukleäre Akkumulation der humanen Kanadaptin-Isoform stark abhängig von der karboxyterminalen NLS2. Ein Grund für die NLS2-abhängige Akkumulation vom humanen Kanadaptin liegt möglicherweise darin begründet, dass die humane Isoform eine NLS2-benachbarte karboxyterminale Insertion enthält (siehe Abb.17).

### 5.3 Mögliche Funktionen der Kanadaptin-Isoformen

Der Nachweis der nukleären Lokalisation der Kanadaptin-Isoformen des Menschen und der Maus geben erste Hinweise auf die Funktionen von Kanadaptin. So ist zu vermuten, dass Kanadaptin der Maus und des Menschen an nukleären und nukleinsäureabhängigen Prozessen beteiligt sind. Unterstützt wurde diese Hypothese durch Experimente zur Identifizierung DNA-interagierender Proteine mit Hilfe eines bakteriellen SOS-Induktionsverfahrens (Perkins et al., 1999). Dieses sollte der Identifizierung eukaryontischer Gene dienen, die möglicherweise eine Rolle innerhalb

des Nukleinsäuremetabolismus und/oder der Genomstabilität spielen. Die hierzu durchgeführte Transformation eines SOS-responsiven *dinD1::lacZ* Reporterkonstruktes enthaltenen *Escherichia coli* SOS-Detektorstammes mit einer humanen Hoden cDNA-Bank führte zur Isolierung eines cDNA-Fragmentes, dessen Proteinsequenz den Aminosäuren 330-384 von humanem Kanadaptin entsprach.

Erste Ergebnisse einer Zwei-Hybrid-Untersuchung lassen ebenfalls vermuten, dass Kanadaptin eine Rolle bei nukleären Prozessen spielt (Hübner, mündliche Mitteilung).

Auf der Suche nach Proteinen der Knochenheilung wurde Kanadaptin auch in der Ratte identifiziert (Hadjargyrou et al., 2002). Mikroarrayuntersuchungen zeigten, dass das Kanadaptin der Ratte während der Knochenheilung gegenüber der Grundexpression um einen Faktor 5 stärker exprimiert wird. Demnach scheint Kanadaptin auch bei regenerativen Prozessen eine Rolle zu spielen.

Hinsichtlich der Funktion der mitochondrial lokalisierenden 57 kD-Kanadaptin-Isoformen aus Mensch, Maus und Ratte ist ebenfalls zu vermuten, dass diese an nukleinsäureabhängigen Prozessen beteiligt sind. Um welche Prozesse es sich hierbei handelt, ist unbekannt.

## 6. Literaturverzeichnis

Allen, J. B.; Zhou, Z.; Siede, W.; Friedberg, E. C.; Elledge, S. J.; (1994): "The SAD1/RAD53 protein kinase controls multiple checkpoints and DNA damage-induced transcription in yeast", *Genes Dev.* Vol. 8, No.20, S. 2401-2415.

Andrews, P. W.; (1984): "Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line *in vitro*", *Dev. Biol.* Vol. 103, No.2, S. 285-293.

Andrews, P. W.; Damjanov, I.; Simon, D.; Banting, G. S.; Carlin, C.; Dracopoli, N. C.; Fogh, J.; (1984): "Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation *in vivo* and *in vitro*", *Lab. Invest.* Vol. 50, No.2, S. 147-162.

Andrews, P. W.; Damjanov, I.; Simon, D.; Dignazio, M.; (1985): "A pluripotent human stem-cell clone isolated from the TERA-2 teratocarcinoma line lacks antigens SSEA-3 and SSEA-4 *in vitro*, but expresses these antigens when grown as a xenograft tumor", *Differentiation* Vol. 29, No.2, S.127-135.

Andrews, P. W.; Gonczol, E.; Plotkin, S. A.; Dignazio, M.; Oosterhuis, J. W.; (1983): "Differentiation of TERA-2 human embryonal carcinoma cells into neurons and HCMV permissive cells. Induction by agents other than retinoic acid", *Differentiation* Vol. 31, No.2, S. 119-126.

Andrews, P. W.; Trinchieri, G.; Perussia, B.; Baglioni, C.; (1987): "Induction of class I major histocompatibility complex antigens in human teratocarcinoma cells by interferon without induction of differentiation, growth inhibition, or resistance to viral infection", *Cancer Res.* Vol. 47, No.3, S. 740-746.

Arts, G. J.; Kuersten, S.; Romby, P.; Ehresmann, B.; Mattaj, I. W.; (1998): "The role of exportin-t in selective nuclear export of mature tRNAs", *EMBO J.*; Vol. 17, No.24, S. 7430-7441.

Bairoch, A.; (1993): "The PROSITE dictionary of sites and patterns in proteins, its current status", *Nucleic Acids Res.* Vol. 21, S. 3097-3103.

Bairoch, A.; Boeckmann, B.; (1992): "The SWISS-PROT protein sequence data bank", *Nucleic Acids Res.* Vol. 20, S. 2019-2022.

Bairoch, A.; Bucher, P.; Hofmann, K.; (1997): "The PROSITE database, its status in 1997", *Nucleic Acids Res.* Vol. 25, S. 217-221.

Birnboim, H. C.; Doly, J.; (1979): "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA", *Nucl. Acids Res.* Vol. 7, S. 1513-1523.

Bischoff, F. R.; Görlich, D.; (1997): "RanBP1 is crucial for the release of RanGTP from importin  $\beta$ -related nuclear transport factors", *FEBS Lett.* Vol. 419, S. 249-254.

Bischoff, F. R.; Klebe, C.; Kretschmer, J.; Wittinghofer, A.; Ponstingl, H.; (1994) "RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear Ras-related Ran", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 91, No.7, S. 2587-2591.

Bischoff, F. R.; Ponstingl, H.; (1991): "Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1", *Nature* Vol. 354, S. 80-82.

Bogerd, H. P.; Benson, R. E.; Truant, R.; Herold, A.; Phingbodhipakkiya M.; Cullen B. R.; (1999): "Definition of a consensus transportin-specific nucleocytoplasmic transport signal", *J. Biol. Chem.* Vol. 274, No.14, 9771-9777.

Boudrez, A.; Beullens, M.; Groenen, P.; Van Eynde, A.; Vulsteke, V.; Jagiello, I.; Murray, M.; Krainer, A. R.; Stalmans, W.; Bollen, M.; (2000): "NIPP1-mediated interaction of protein phosphatase-1 with CDC5L, a regulator of pre-mRNA splicing and mitotic entry", *J. Biol. Chem.* Vol. 275, No.33, S. 25411-25417.

Boulikas, T.; (1994): Putative nuclear localization signals (NLS) in protein transcription factors", *J. Cell Biochem.* Vol. 55, No.1, S 32-58.

Braun, D. M.; Stone, J. M.; Walker, J. C.; (1997): " Interaction of the maize and Arabidopsis kinase interaction domains with a subset of receptor-like protein kinases: implications for transmembrane signaling in plants", *Plant J.* Vol. 12, No.1, S. 83-95.

Burnette, W. N.; (1981): "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein", *A. Anal. Biochem.* Vol. 112, S. 195-203.

Busch, S. J.; Sassone-Corsi, P.; (1990): "Dimers, leucine zippers and DNA-binding domains", *Trends Genet.* Vol. 6, No.2, S. 36-40. Review.

Chen, J.; Vijayakumar, S.; Li, X.; Al-Awqati, Q; (1998): "Kanadaptin is a protein that interacts with the kidney but not the erythroid form of band 3", *J. Biol. Chem.* Vol. 273, S. 1038-1043.

Cheung, W. M.; Fu, W. Y.; Hui, W. S.; Ip, N. Y.; (1999): "Production of human CNS neurons from embryonal carcinoma cells using a cell aggregation method", *Biotechniques* Vol. 26, No.5, S. 946-948, 950-952, 954.

Clark, J. M.; (1988): "Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerises", *Nucleic Acids Res.* Vol. 16, No.20, S. 9677-9686.

Claussen, M.; Rudt, F.; Pieler, T.; (1999): "Functional modules in ribosomal protein L5 for ribonucleoprotein complex formation and nucleocytoplasmic transport", *J. Biol. Chem.*; Vol. 274, No.48, S. 33951-3395.

Claverie-Martin, F.; Wang, M.; Cohen, S. N.; (1997): "ARD-1 cDNA from human cells encodes a site-specific single-strand endoribonuclease that functionally resembles *Escherichia coli* RNase E", *J. Biol. Chem.* Vol. 272, No.21, S. 13823-13828.

Cohen, G. B.; Ren, R.; Baltimore, D.; (1995): "Modular binding domains in signal transduction proteins", *Cell* Vol. 80, S. 237-248.

Danscher, G.; (1981): "Light and electron microscopic localization of silver in biological tissue", *Histochemistry* Vol. 71, No.2, S. 177-186.



Dever, T. E.; Glynias, M. J.; Merrick, W. C.; (1987): "GTP-binding domain: three consensus sequence elements with distinct spacing", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 84, No.7, S. 1814-1818.

Dingwall, C.; Sharnick, S. U.; Laskey, R. A.; (1982): "A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus", *Cell* Vol. 30, S. 449-458.

Drenckhahn, D.; Dermietzel, R.; (1988): "Organization of the actin filament cytoskeleton in the intestinal brush border: a quantitative and qualitative immunoelectron microscope study", *J. Cell Biol.* Vol. 107, S. 1037-1048.

Drenckhahn, D.; Merte, C.; (1987): "Restriction of the human kidney band 3-like anion exchanger to specialized subdomains of the basolateral plasma membrane of intercalated cells", *Eur. J. Cell Biol.* Vol. 45, S. 107-115.

Drenckhahn, D.; Schlüter, K.; Allen, D. P.; Bennett, V.; (1985): "Colocalization of band 3 with ankyrin and spectrin at the basal membrane of intercalated cells in the rat kidney", *Science* Vol. 230, S. 1287-1289.

Durocher, D; Henckel, J; Fersht, A. R; Jackson, S.P.; (1999): "The FHA domain is a modular phosphopeptide recognition motif", *Mol. Cell.* Vol. 4, No.3, S. 387-394.

Durocher, D; Taylor, I. A.; Sarbassova, D.; Haire, L. F.; Westcott, S. L.; Jackson, S. P.; Smerdon, S. J.; Yaffe, M. B.; (2000): "The molecular basis of FHA domain:phosphopeptide binding specificity and implications for phospho-dependent signaling mechanisms", *Mol. Cell.* Vol. 6, No.5, S. 1169-1182.

Fay, D. S.; Sun, Z.; Stern, D. F.; (1997): " Mutations in SPK1/RAD53 that specifically abolish checkpoint but not growth-related functions", *Curr. Genet.* Vol. 31, No.2, S. 97-105.

Feldherr, C. M.; Kallenbach, E.; Schultz, N.; (1984): "Movement of a karyophilic protein through the nuclear pores of oocytes", *J. Cell Biol.* Vol. 99, No.6, S. 2216-22.

Fischer, U.; Huber, J.; Boelens, W. C.; Mattaj, I. W.; Luhrmann, R.; (1995): "The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs", *Cell* Vol. 82, S. 475-483.

Fomenkov, A.; Xiao, J. P.; Dila, D.; Raleigh, E.; Xu, S.-Y.; (1994): "The 'endo-blue method' for direct cloning of restriction endonuclease genes in *E. coli*", *Nucleic Acids Res.* Vol. 22, No.12, S. 2399-2403.

Fomenkov, A; Xu, S.-Y.; (1995): "Cloning of a gene from *Thermus filiformis* and characterization of the thermostable nuclease", *Gene* Vol. 163, No.1, S. 109-113.

Fontoura, B. M.; Blobel, G.; Matunis, M. J.; (1999): "A conserved biogenesis pathway for nucleoporins: proteolytic processing of a 186-kilodalton precursor generates Nup98 and the novel nucleoporin, Nup96", *J. Cell Biol.* Vol. 144, S. 1097-112.

Fornerod, M.; Ohno, M.; Yoshida, M.; Mattaj, I. W.; (1997): CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals", *Cell* Vol. 90, S. 1051-1060.

- Fry, D. C.; Kuby, S. A.; Mildvan, A. S.; (1987): "NMR studies of the AMP-binding site and mechanism of adenylate kinase", *Biochemistry* Vol. 26, No.6, S. 1645-55.
- Gerdes, J.; Lemke, H.; Baisch, H.; Wacker, H. H.; Schwab, U.; Stein, H.; (1984): "Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67", *J. Immunol.* Vol. 133, No.4, S. 1710-1715.
- Görllich, D.; Kutay, U.; (1999): "Transport between the cell nucleus and the cytoplasm", *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* Vol. 15, S. 607-60. Review.
- Görllich, D.; Prehn, S.; Laskey, R. A.; Hartmann, E.; (1994): "Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import", *Cell* Vol. 79, S. 767-778.
- Görllich, D.; Vogel, F.; Mills, A. D.; Hartmann, E.; Laskey, R. A.; (1995): "Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import", *Nature* Vol. 377, S. 246-248.
- Goldberg, M. W.; Allen, T. D.; (1993): "The nuclear pore complex: three-dimensional surface structure revealed by field emission, in-lens scanning electron microscopy, with underlying structure uncovered by proteolysis", *J. Cell Sci.* Vol. 106, S. 261-74.
- Hadjiargyrou, M.; Lombardo, F.; Zhao, S.; Ahrens, W.; Joo, J.; Ahn, H.; Jurman, M.; White, D. W.; Rubin, C. T.; (2002): "Transcriptional profiling of bone regeneration. Insight into the molecular complexity of wound repair", *J. Biol. Chem.* Vol. 277, No.33, S. 30177-30182.
- Haffar, O. K.; Popov, S.; Dubrovsky, L.; Agostini, I.; Tang, H.; Pushkarsky, T.; Nadler S. G.; Bukrinsky, M.; (2000): "Two nuclear localization signals in the HIV-1 matrix protein regulate nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex", *J. Mol. Biol.* Vol. 299, No.2, S. 359-368.
- Hall, M. N.; Craik, C.; Hiraoka, Y.; (1990): "Homeodomain of yeast repressor alpha 2 contains a nuclear localization signal", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 87, No.18, S. 6954-6958.
- Hanahan, D.; (1983): "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids", *J. Mol. Biol.* Vol. 166, S. 557-562.
- Hartley, R. S.; Margulis, M.; Fishman, P. S.; Lee, V. M.; Tang, C. M.; (1999): "Functional synapses are formed between human NTera2 (NT2N, hNT) neurons grown on astrocytes", *J. Comp. Neurol.* Vol.407, No.1, S. 1-10.
- Heitman, J.; Model, P.; (1991): "SOS induction as an *in vivo* assay of enzyme-DNA interactions", *Gene* Vol. 103, No.1, S. 1-9.
- Heitman, J.; Model, P.; (1987): "Site-specific methylases induce the SOS DNA repair response in *Escherichia coli*", *J. Bacteriol.* Vol. 169, No.7, 3243-3250.
- Heitman, J.; Zinder, N. D.; Model, P.; (1989): "Repair of the *Escherichia coli* chromosome after *in vivo* scission by the *EcoR* I endonuclease", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 86, No.7, S. 2281-2285.

Hellmuth, K.; Lau, D. M.; Bischoff, F. R.; Kunzler, M.; Hurt, E.; Simos, G.; (1998): "Yeast Los1p has properties of an exportin-like nucleocytoplasmic transport factor for tRNA", *Mol. Cell Biol.* Vol. 18, S. 6374-6386.

Hofmann, K.; Bucher, M.; (1995): "The FHA domain: a putative nuclear signalling domain found in protein kinases and transcription factors", *Trends Biochem. Sci.* Vol. 20, No.9, S. 347-349.

Hood, J. K.; Silver, P. A.; (1999): "In or out? Regulating nuclear transport", *Curr. Opin. Cell Biol.* Vol. 11, No.2, S. 241-247.

Huber, J.; Cronshagen, U.; Kadokura, M.; Marshallsay, C.; Wada, T.; Sekine, M.; Luhrmann, R.; (1998): "Snurportin1, an m3G-cap-specific nuclear import receptor with a novel domain structure", *EMBO J.* Vol. 17, No.14, S. 4114-4126.

Hübner, S.; Jans, D. A.; Xiao, C. Y.; John, A. P.; Drenckhahn, D.; (2002): "Signal- and importin-dependent nuclear targeting of the kidney anion exchanger 1-binding protein kanadaptin", *Biochem. J.* Vol. 361, S. 287-296.

Izaurrealde, E.; Kutay, U.; von Kobbe, C.; Mattaj, I. W.; Görlich, D.; (1997): "The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus", *EMBO J.* Vol. 16, No. 21, S. 6535-6547.

Jäkel, S.; Albig, W.; Kutay, U.; Bischoff, F. R.; Schwamborn, K.; Doenecke, D.; Görlich, D.; (1999): "The importin  $\beta$ /importin 7 heterodimer is a functional nuclear importreceptor for histone H1", *EMBO J.* Vol. 18, S. 2411-2423.

Jäkel, S.; Görlich, D.; (1998): "Importin  $\beta$ , transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells", *EMBO J.* Vol. 17, S. 4491-4502.

Jans, D. A.; (1995): "The regulation of protein transport to the nucleus by phosphorylation", *Biochem. J.* Vol. 311, S. 705-716.

Jans, D. A.; Hübner, S.; (1996): "Regulation of protein transport to the nucleus: central role of phosphorylation", *Physiol. Rev.* Vol. 76, S. 651-685.

Jones-Villeneuve, E. M.; McBurney, M. W.; Rogers, K. A.; Kalnins, V.I.; (1982): "Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells", *J. Cell Biol.* Vol. 94, No.2, S. 253-262.

Jones-Villeneuve, E. M.; Rudnicki, M. A.; Harris, J. F.; McBurney, M. W.; (1983): "Retinoic acid-induced neural differentiation of embryonal carcinoma cells", *Mol. Cell Biol.* Vol. 3, No.12, S. 2271-2279.

Jullien, D.; Görlich, D.; Laemmli, U. K.; Adachi, Y.; (1999): "Nuclear import of RPA in *Xenopus* egg extracts requires a novel protein XRIP $\alpha$  but not importin  $\alpha$ ", *EMBO J.* Vol. 18, S. 4348-4358.

Kalderon D.; Richardson W. D.; Markham A. F.; Smith A. E.; (1984): "Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen", *Nature* Vol. 311, S. 33-38.

- Kalderon, D.; Roberts, B. L.; Richardson, W. D.; Smith, A. E.; (1984): "A short amino acid sequence able to specify nuclear location", *Cell* Vol. 39, S. 499-509.
- Kenyon, C. J.; Walker, G. C. (1980): "DNA-damaging agents stimulate gene expression at specific loci in *Escherichia coli*", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 77, No.5, S. 2819-2823.
- Kleppner, S.R.; Robinson, K. A.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M.; (1995): "Transplanted human neurons derived from a teratocarcinoma cell line (NTera-2) mature, integrate, and survive for over 1 year in the nude mouse brain", *J. Comp. Neurol.* Vol. 357, No.4, S. 618-632.
- Kutay, U.; Bischoff, F. R.; Kostka, S.; Kraft, R.; Görlich, D; (1997): "Export of importin  $\alpha$  from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor", *Cell* Vol. 90, S. 1061-1071.
- Kutay, U.; Lipowsky, G.; Izaurralde, E.; Bischoff, F. R.; Schwarzmaier, P.; Hartmann, E.; Görlich, D.; (1998): "Identification of a tRNA-specific nuclear export receptor", *Mol. Cell* Vol.1, No.3, S. 359-369.
- Laemmli, U. K.; (1970): "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature* Vol. 227, S. 680-685.
- Landschulz, W. H.; Johnson, P. F.; McKnight, S. L.; (1988): "The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins", *Science* Vol. 240, No.4860, S. 1759-1764.
- Lanford, R. E.; Butel, J. S.; (1984): "Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen", *Cell* Vol. 37, S. 801-813.
- Lee, V. M.; Andrews, P. W.; (1986): "Differentiation of NTERA-2 clonal human embryonal carcinoma cells into neurons involves the induction of all three neurofilament proteins", *J. Neurosci.* Vol. 6, No.2, S. 514-521.
- Li, J.; Chory, J.; (1997): " A putative leucine-rich repeat kinase involved in brassinosteroid signal transduction", *Cell* Vol. 90, S. 929-938.
- Li, J; Lee, G.; Van Doren, S. T.; Walker, J. C.; (2000): "The FHA domain mediates phosphoprotein interactions", *J. Cell Sci.* Vol. 113, S. 4143-4149.
- Li, J.; Smith, G. P.; Walker, J. C.; (1999): "Kinase interaction domain of kinase-associated protein phosphatase, a phosphoprotein-binding domain", *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, Vol. 96, S. 7821-7826.
- Linz, U; Degenhardt, H.; (1990): "Polymerase chain reaction: an overview", *Naturwissenschaften* Vol. 77, No.11, S. 515-530.
- Lundberg, K. S.; Shoemaker, D. D.; Adams, M. W.; Short, J. M.; Sorge, J. A.; Mathur, E. J.; (1991): "High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*", *Gene* Vol.108, No.1, S. 1-6.

Malim, M. H.; Bohnlein, S.; Fenrick, R.; Le, S.-Y.; Maizel, J. V.; Cullen, B. R.; (1989): "Functional comparison of the Rev trans-activators encoded by different primate immunodeficiency virus species", *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* Vol. 86, No.21, S. 8222-8226.

Malim, M. H.; Bohnlein, S.; Hauber, J.; Cullen, B. R.; (1989): "Functional dissection of the HIV-1 Rev trans-activator--derivation of a trans-dominant repressor of Rev function", *Cell* Vol. 58, No.1, S. 205-214.

Malim, M. H.; Fenrick, R.; Ballard, D. W.; Hauber, J.; Bohnlein, E.; Cullen, B. R.; (1989): "Functional characterization of a complex protein-DNA-binding domain located within the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat leader region", *J. Virol.* Vol. 63, No.8, S. 3213-3219.

Malim, M. H.; Hauber, J.; Le, S.-Y., Maizel, J. V.; Cullen, B. R.; (1989): "The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA", *Nature* Vol. 338, No.6212, S. 254-257.

Maniatis, T.; Fritsch, F. E.; Sambrook, J.; (1982): "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*.

Marchuk, D.; Drumm, M.; Saulino, A.; Collins, F. S.; (1991): "Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products", *Nucl. Acids Res.* Vol. 19, No.5, S. 1154.

Markkerh, P. S.; Dingwall, C.; Laskey, R. A.; (1996): "Comparative mutagenesis of nuclear localization signals reveals the importance of neutral and acidic amino acids", *Curr. Biol.* Vol. 6, S. 1025-1027.

Martin, G. R.; Evans, M. J.; (1975): "Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies *in vitro*" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 72, No.4, S. 1441-1445.

Matsuoka, S.; Huang, M.; Elledge, S. J.; (1998): "Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase", *Science* Vol. 282, No.5395, S. 1893-1897.

Melchior, F.; Gerace, L.; (1998): "Two-way trafficking with Ran", *Trends Cell Biol.* Vol. 8, No.5, S. 175-179.

Mertens, C.; Kuhn, C.; Franke, W. W.; (1996): "Plakophilins 2a and 2b: constitutive proteins of dual location in the karyoplasm and the desmosomal plaque", *J. Cell Biol.* Vol. 135, S.1009-1025.

Michael, W. M.; Choi, M.; Dreyfuss, G.; (1995): "A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway", *Cell* Vol. 83, S. 415-422.

Moore, M. S.; (1999): "Ran and nuclear transport", *J. Biol. Chem.* Vol. 273, S. 22857-22860.

Mukaigawa, J.; Nayak, D. P.; (1991): "Two signals mediate nuclear localization of influenza virus (A/WSN/33) polymerase basic protein 2", *J. Virol.* Vol. 65, No.1, S. 245-253.

Murakami, H.; Okayama, H.; (1995): "A kinase from fission yeast responsible for blocking mitosis in S phase", *Nature* Vol. 374, No.6525, S. 817-819.

Nakielnny, S.; Dreyfuss, G.; (1999): "Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus", *Cell* Vol. 99, No.7, S. 677-690.

Navas, T. A.; Zhou, Z.; Elledge, S. J.; (1995): "DNA polymerase epsilon links the DNA replication machinery to the S phase checkpoint", *Cell* Vol. 80, No.1, S. 29-39.

Nishimura, A.; Morita, M.; Nishimura, Y.; Sugino, Y.; (1990): "A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells" *Nucleic Acids Res.* Vol. 18, No.20, S. 6169.

Oishi, I.; Sugiyama, S.; Otani, H.; Yamamura, H.; Nishida, Y.; Minami, Y.; (1998): "A novel *Drosophila* nuclear protein serine/threonine kinase expressed in the germline during its establishment", *Mech. Dev.* Vol. 71, No.1-2, S. 49-63.

Panayotatos, N.; Fontaine, A.; (1985): "An endonuclease specific for single-stranded DNA selectively damages the genomic DNA and induces the SOS response", *J. Biol. Chem.* Vol. 260, No.5, 3173-3177.

Paschal, B. M.; Gerace, L.; (1995): "Identification of NTF2, a cytosolic factor for nuclear import that interacts with nuclear pore protein p62", *J. Cell Biol.* Vol. 129, S. 925-937.

Perkins, E. L.; Sterling, J. F.; Hashem, V. I.; Resnick M. A.; (1999): "Yeast and human genes that affect the *Escherichia coli* SOS response", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol.96, No.5, S. 2204-2209.

Pleasure, S. J.; Lee, V. M.; (1993): "NTera 2 cells: a human cell line which displays characteristics expected of a human committed neuronal progenitor cell", *J. Neurosci. Res.* Vol. 35, No.6, S. 585-602.

Pleasure, S. J.; Page, C.; Lee, V. M.; (1992): "Pure, postmitotic, polarized human neurons derived from NTERA 2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons", *J. Neurosci.* Vol.12, No.5, S. 1802-1815.

Pollard, V. M.; Michael, W. M.; Nakielnny, S.; Siomi, M. C.; Wang, F.; Dreyfuss, G.; (1996): "A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway", *Cell* Vol. 86, S. 985-994.

Rexach, M.; Blobel, G.; (1995): "Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins", *Cell* Vol. 83, No.5, S. 683-692.

Robbins, J.; Dilworth, S. M.; Laskey, R. A.; Dingwall, C; (1991): "Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence", *Cell* Vol. 64, No.3, S. 615-623.

Rout, M. P.; Blobel, G.; Aitchison, J. D.; (1997): "A distinct nuclear import pathway used by ribosomal Proteins", *Cell* Vol. 89, S. 715-725.

Saiki, R. K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K. B.; Horn, G. T.; Erlich, H. A.; Arnheim, N.; (1985): "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia", *Biotechnology* Vol. 24, S. 476-80.

Sambrook, J.; Fritsch, F. E.; Maniatis, T.; (1989): "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*.

Saraste, M.; Sibbald, P. R.; Wittinghofer, A.; (1990): "The P-loop-a common motif in ATP- and GTP-binding proteins", *Trends Biochem. Sci.* Vol.15, No.11, S. 430-434. Review.

Scheller, K.; Sekeris, C. E.; Krohne, G.; Hock, R.; Hansen, I. A.; Scheer, U.; (2000): "Localization of glucocorticoid hormone receptors in mitochondria of human cells", *Eur. J. Cell Biol.* Vol. 79, S. 299-307.

Schmidt, A.; Langbein, L.; Rode, M.; Pratzel, S.; Zimbelmann, R.; Franke, W. W.; (1997): "Plakophilins 1a and 1b: widespread nuclear proteins recruited in specific epithelial cells as desmosomal plaque components", *Cell. Tissue Res.* Vol. 290, S. 481-499.

Schultz, J.; Copley, R. R.; Doerks, T.; Ponting, C. P.; Bork, P.; (2000): "SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains", *Nucleic Acids Res.* Vol. 28, S. 231-234.

Schultz, J.; Milpetz, F.; Bork, P.; Ponting, C. P.; (1998): "SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Vol. 95, S. 5857-5864.

Sorg, G. und Stamminger, T.; (1999): "Mapping of nuclear localization signals by simultaneous fusion to green fluorescent protein and to  $\beta$ -Galactosidase", *BioTechniques* Vol. 26, S. 858-862.

Southern, E. M.; (1975): "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis", *J. Mol. Biol.* Vol. 98, S. 503-517.

St. Johnston, D.; Brown, N. H.; Gall, J. G.; Jantsch, M.; (1992): "A conserved double-stranded RNA-binding domain", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 89, No.22, S. 10979-10983.

Stade, K.; Ford, C. S.; Guthrie, C.; Weis, K.; (1997): "Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor", *Cell* Vol. 90, S. 1041-1050.

Stone, J. M.; Collinge, M. A.; Smith, R. D.; Horn, M. A.; Walker, J. C.; (1994): "Interaction of a protein phosphatase with an *Arabidopsis* serine-threonine receptor kinase", *Science* Vol. 266, S. 793-796.

Stone, J. M.; Trotochaud, A. E.; Walker, J. C.; Clark, S. E.; (1998): "Control of meristem development by CLAVATA1 receptor kinase and KAPP protein phosphatase interaction", *Plant Physiol.* Vol. 117, S. 1217-1225.

Sueishi, M.; Takagi, M.; Yoneda, Y; (2000): "The forkhead-associated domain of Ki-67 antigen interacts with the novel kinesin-like protein Hklp2", *J. Biol. Chem.* Vol. 275, No.37, S. 28888-28892.

Thomas, P. S.; (1983): "Hybridization of denatured RNA transferred or dotted to nitrocellulose paper", *Methods Enzymol.* Vol. 100, S. 255-266.

Tuteja, N.; Tuteja, R.; Ochem, A.; Taneja, P.; Huang, N. W.; Simoncsits, A.; Susic, S.; Rahman, K.; Marusic, L.; Chen, J. *et al.*; (1994): "Human DNA helicase II: a novel DNA unwinding enzyme identified as the Ku autoantigen", *EMBO J.* Vol.13, S. 4991-5001.

Wahl, G. M.; Stern, M.; Stark, G. R.; (1979): "Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 76, No.8, S. 3683-3687.

Walter, C.A.; Humphrey, R. M.; Adair, G. M.; Nairn, R. S.; (1991): "Characterization of Chinese hamster ovary cells stably transformed by a plasmid with an inducible APRT gene", *Plasmid* Vol.25 ,No.3, S. 208-216.

Xu, S.-Y.; Schildkraut, I.; (1991): "Isolation of *BamH* I variants with reduced cleavage activities", *J. Biol. Chem.* Vol. 266, No.7, S. 4425-4429.

Yasuda, K.; Nakai, A.; Hatayama, T.; Nagata, K.; (1995): "Cloning and expression of murine high molecular mass heat shock proteins, HSP105", *J. Biol. Chem.* Vol. 270, No.50, S. 29718-29723.

Zeugin, J. A.; Harley, J. L.; (1985): "Ethanol Precipitation of DNA", *Focus* Vol. 7, No.4.

Zheng, P.; Fay, D. S.; Burton, J.; Xiao, H.; Pinkham, J. L.; Stern, D. F.; (1993): "SPK1 is an essential S-phase-specific gene of *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a nuclear serine/threonine/tyrosine kinase", *Mol. Cell. Biol.* Vol. 13, No.9, S. 5829-5842.



## 7. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AE	Anion Exchanger (Anionenaustauscher)
Amp	Ampizillin
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
bp	Basenpaare
cDNA	copy DNA oder komplementäre DNA
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase (Alkalische Phosphatase des Kälberdarms)
cRNA	cDNA-komplementäre RNA
kD	Kilodalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
g	Gramm
GAPDH	Glyzerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
HRP	Meerrettich-Peroxidase
humKan	humanes (menschliches) Kanadaptin
k	Kilo ( $\times 10^3$ )
Kan	Kanamycin
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
LB	Luria Bertoni-Medium
l	Liter
min	minute
M	Mol/l
mKan	mouse kanadaptin (Kanadaptin der Maus)
MOPS	4-(N-Morpholin)butansulfonsäure
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
m	milli ( $\times 10^{-3}$ )
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
NLS1 <sup>mut</sup>	punktmutierte Kernlokalisationssequenz
n	Nano ( $\times 10^{-9}$ )
Neo	Neomycin
NGS	Normal Goat Serum (Ziegen Serum)
NPG	N-Propylgallat
NS	Nukleinsäuren
nt	Nukleotide
PBS	Phosphat-Buffered Saline (Phosphat-Salzpuffer)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
RNase	Ribonuklease
RNasin	Ribonuklease-Inhibitor
rpm	rotation per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur

s	Sekunde
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natrium-Laurylsulfat)
SSC	Sodium-Saline-Citrate Buffer (Natriumsalz-Zitrat Puffer)
TAE	Tris-Azetat-EDTA Puffer
TBS	Tris-Buffered Saline
TE	Tris-EDTA Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris- (Hydroxymethyl-) aminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitan
UV	Ultraviolett
U	Units (Enzymeinheit)
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
μ	mikro (x 10 <sup>-6</sup> )
μF	Mikrofarad

Abkürzungen aller 20 nativen Aminosäuren im Drei- und Ein-Buchstaben-Code:

Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutaminsäure	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glyzin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

## 8. Anhang

### Humanes Kanadaptin und seine Nukleinsäure- und Aminosäure-Sequenzen (Oligonukleotid- und Schnittstellen)

▼AGTCTGGACCTGAACCGAGACAAGGAGGTAC/CACACTATTCACTGCTGCGTCGCAGAGCGGGCTGGGCGGCTGTCTGGACC/TCG, Kpn I XhoI  
 AGGCAAGGATCGCGTCAGACCCCGAAAGCTGGTTTGTGTTGATTAGTGATCTAAGACCGCCGGAAGC/GCTTCTTCTCAATCAAGCTATG Eco47III  
 GTCATTACGATCCCG<sup>1</sup>TTGTAACCTCTAAATATGTCCCGTTCTGCACAGCATCCCGATAACCGTTTTGTTTTCTCATATTATGACC  
 TTCTC

1 atg tta gca cca ctt cgc aac gct<sup>2</sup> cca ggt cgt gaa gga gca act tca cca tcg ccg cct aca gac  
 M L A P L R N A P G R E G A T S P S P P T D  
 gcc act ggg agc ttg gga gag tgg gac gtg gac agg aac gta aag acc gaa ggg tgg gtt tcg aag  
 A T G S L G E W D V D R N V K T E G W V S K  
 gag c<sup>3</sup>gg att tcg aag ttg cac cgg ttg agg atg gct gac att ctc tct cag tca gag acc ctg gcg  
 E R I S K L H R L R M A D I L S Q S E T L A  
 tcg caa gac ctc agt ggg gac ttc aag aag cca gct ctg ccg gtg tcc cca gcg gcg ccg agt aag  
 S Q D L S G D F K K P A L P V S P A A R S K  
 gcc ccg gcc agc agt tct tca aac cct gag gag gta cag aag gaa ggg cc/c act gcg ttg cag gac  
 A P A S S S S N P E E V Q K E G P T A L Q D  
 tcc aat tct ggg gag ccc gac atc cct cct cct cag ccg gac tgc ggt gat ttt agg agt cta cag  
 S N S G E P D I P P P Q P D C G D F R S L Q  
 397 gag g<sup>4</sup>ag cag tcg cgc ccc acg aca gcg gtt tct tcc cct ggc ggt cca gcc c/gg gct ccc ccc tac  
 E E Q S R P T T A V S S P G G P A R A P P Y  
 caa gag cct c/ca tgg ggt ggc cct gcc aca gcc ccc tac agc tta gag acc ctg aag ggc ggc act  
 Q E P P W G G P A T A P Y S L E T L K G G T  
 atc ctt ggc acc cgt agc ttg aaa ggg acg agt tac tgc ctt ttc ggg agg<sup>5</sup> ctg tct ggc tgc gac  
 I L G T R S L K G T S Y C L F G R L S G C D  
 gtg tgc ctg gag cac cct tcg gtg tct cgg tac /cac gca gtg ctg ca/g cac agg gcg tcc ggc cct  
 V C L E H P S V S R Y H A V L Q H R A S G P  
 gac gga gaa tgc gac agc aac ggg ccg ggc ttc<sup>6</sup> tac ctc tac gat ctg gga agc acc/cat ggc act  
 D G E C D S N G P G F Y L Y D L G S T H G T  
 ttt ctc aac aaa act cgc atc cca<sup>7</sup> cct cgc acc tac tgt cga gtc cac gtt gg<sup>8</sup> cat gtt gtt cgc  
 F L N K T R I P P R T Y C R V H V G H V V R  
 ttt gga ggc agc<sup>9</sup> acc cgg ctc ttt atc ctg ca/g Vgga cca gag gaa gac cga gag gca gaa tc<sup>10</sup>c gag  
 F G G S T R L F I L Q G P E E D R E A E S E  
 859 tta aca gta aca cag ttg aag gaa ttg cgc aag cag cag caa ata ttg ttg gag aag aag atg cta  
 L T V T Q L K E L R K Q Q Q I L L E K K M L  
 a▼ga gaa gac tca gat gaa gaa gag gaa atg gat acc tct gaa agg aag ata aat gct ggt agc caa  
 R E D S D E E E E M D T S E R K I N A G S Q  
 gat gat gag atg g<sup>11</sup>gt tgc acc tgg gga atg<sup>12</sup> g▼ga gaa gat gca gta gag gat gat gct gaa gag aac  
 D D E M G C T W G M G E D A V E D D A E E N  
 cct att gtc tta gag ttt cag cag gaa agg gag gcc ttt tat ata aag/gat ccc aaa aag gtt ctc  
 P I V L E F Q Q E R E A F Y I K D P K K V L  
 caa ggc ttt ttt gac cga gaa g▼ga gaa gaa tta gaa tat gaa ttt gat gaa cag gga cat agc act  
 Q G F F D R E G E E L E Y E F D E Q G H S T  
 tgg ctc tgc a/gg gtg ag▼ga tta cct gtg gac gat tca act gga laa caa ctg gtg gct gag gcc att  
 W L C R V R L P V D D S T G K Q L V A E A I  
 13 ac tca gga aag aaa aaa gaa gca atg atc cag tgc tca ttg gaa gct tgt ccg att ctt gac act

Apa I  
 Sma I  
 Nco I  
 Kpn I, Pst I  
 Nco I  
 MRF/VRF-Übergang  
 Pst I  
 BamH I  
 Pst I

1321 H S G K K K E A M I Q C S L E A C R I L D T  
 ttg gga ttg ctt ~~cgg~~ ~~cag~~ ~~gaa~~ ~~gca~~ ~~gta~~ ~~tct~~ ~~cgg~~ ~~aaa~~<sup>14</sup> agg aaa gcc aag aac tgg gaa gat gaa gac  
 L G L L R Q E A V S R K R K A K N W E D E D NLS I  
 ttt tat gat agt gat gat gac aca ttt ctt gat agg act ggc ctg att gag aag aag cgt ctg aac  
 F Y D S D D D T F L D R T G L I E K K R L N  
 aga atg aag aag gct ggc aag att gat gag aag cca gag acc ttt gaa tca ttg ~~ggt~~ gca aaa tta  
 R M K K A G K I D E K P E T F E S L V A K L  
 aat gat gct gaa agg gaa ctt tct gaa att tct gag aga ttg aaa gcc tca agc caa ~~g~~tt cta tca  
 N D A E R E L S E I S E R L K A S S Q V L S  
 gag tct cca tct cag gat tct tta gat gcg ttc atg tca gaa atg aaa tca **ggc agt aca tta gat**  
 E S P S Q D S L D A F M S E M K S G S T L D  
~~ggt~~<sup>15</sup> gtg tcc cgg aag aaa ctt cac ctg aga act ttt gaa ctg agg aaa gaa caa cag aga ctt aaa  
 G A S R K K L H L R T F E L R K E Q Q R L K  
 ggg tta ata aaa att gta aag cca gca gag att cca gaa cta aaa ~~aa~~g act gaa act cag act aca  
 G L I K I V K P A E I P E L K K T E T Q T T  
 ggt gca gaa aac aaa gct aaa aag ctt aca ttg cct cta ttt **ggt gcc atg aaa gga gga agc**<sup>16</sup>aaa  
 G A E N K A K K L T L P L F G A M K G G S K bpNLS  
 1849 ttc aaa tta aaa act gga aca gta ~~ggg~~aag tta ccc ccc aag cgt cca gaa ctc cct cca act cta  
 F K L K T G T V G K L P P K R P E L P P T L  
 atg aga atg aaa gat gag cct gaa gta gaa gag gag gag gaa gag gaa gag gaa gaa gag aaa gaa  
 M R M K D E P E V E E E E E E E E E E E K E  
 aag gag gag cat gaa aag aaa aaa ctg gag gat gga agc ctc agt agg cca cag cca gag ata gag  
 K E E H E K K K L E D G S L S R P Q P E I E  
 cca gaa gca gca gtg cag gaa atg agg cct ccc ~~aca~~/ gat ctc **aca cat ttt aaa gaa acc caa acc**<sup>17</sup> Bgl II  
 P E A A V Q E M R P P T D L T H F K E T Q T  
 cat ~~g~~aa aac atg tct caa ctt agc gag gaa gaa cag aat aaa gat tat caa gac tgt agc aaa acc  
 H E N M S Q L S E E E Q N K D Y Q D C S K T  
 act tca ttg tgc gca gga ccc tca ~~g~~ca tca aag aat gaa tat gag aaa agc aga ggt gaa ttg aag  
 T S L C A G P S A S K N E Y E K S R G E L K  
 aaa aag aaa aca cct ggt cca ggc ~~aaa~~ctt cca cca aca ctt tct tcc aaa tat **cgt gaa gat gac**  
 K K K T P G P G K L P P T L S S K Y P E D D NLS II  
 2311 **cca gac** ~~tac~~<sup>18</sup> tgt gtg tgg gtc cca cct gaa ~~g~~gt caa agt gga gat ggc aga acc cat ~~cct~~ aat gac  
 P D Y C V W V P P E G Q S G D G R T H L N D  
**aag tat ggc tat tga**<sup>19</sup>  
 K Y G Y Stop

TTGCTTCAGAATCCCAAAAGAAAACCTTGTGGACCATGTGACATGGAATATTTGGGATAATGTATCAAATTGAATGGCCAGAGAAGTTTA Mls I  
 ATTTGTAAGATCTGGTGAATCTGGCTTTTCGTTCTGTGTTCTTGGCTTCCTAAATTTATCTGCCCCACATGATTCATGCATTGATATTTA (Bal I)  
 TGTTTAAAGTGTTTATATATGTATGTAAAAAGGGAACCATATGTTTTGAGAATTTGTAAAGTGAGAGACATGATCCTATTAAATAAGA  
 AGGC

- |  |  |
|--|--|
| 1: 5' hum Kan-2                                | 12: 3' hum Kan genomI2                 |
| 2: 5' hum Kanadaptin                           | <b>cat tcc cca ggt gca acc cat ctc</b> |
| cgg gaa ttc <b>tat gtt agc acc act tcg caa</b> | 13: 5' GFP hum Kan-1                   |
| <b>cgc t</b>                                   | <b>caa ctg gtg gct gag gcc att c</b>   |
| 5' hum Kan N-EcoRI/2                           | 3' GFP hum Kan-1                       |
| gaa ttc <b>atg tta gca cca ctt cgc aac g</b>   | <b>gaa tgg cct cag cca cca gtt g</b>   |
| 5' hum Kan N-EcoRI-3                           | 5' Kanadaptin-3                        |
| <b>cgg gaa ttc acc atg tta gca cca ctt cgc</b> | <b>aaa caa ctg gtg gct gag g</b>       |
| <b>aac</b>                                     | Überlappungsbereich des                |
| 3: 5' h Kan N I                                | N- und C- terminus (siehe Abb.13)      |

4: 5' h Kan N II	14: 3' GFP hum Kan-2
5: 5' hum Kan FHA Nhe I	15: 3' (nested)hKanFHA
6: 5' hKanGAP-FHA/EcoRI	16: 5' hKan-2
7: 3' hum Kan FHA Nhe I	17: 5' (nested)hKan-3
ggc gct agc <b>gat gcg agt ttt gtt gag aaa</b>	18: 5' h Kan GAP/EcoRI
<b>agt gc</b>	5' Kanadaptin-5
8: 3' hum Kan N-EcoRI/2	cgt gag <b>gat gac cca gac tac</b>
gaa ttc tca <b>aac atg ccc aac gtg gac tcg</b>	3' hKan-3
5' Kanadaptin-6	19: 3' hum Kan
<b>act tac tgt aga gtc cac gtc g</b>	cgg gaa ttc <b>tca ata gcc ata ctt gtc</b>
9: 5' GFP-Kanadaptin	<b>att aag</b>
10: 5' hum Kan genomI2	3' GFP-Kanadaptin
11: 3' (nested)hKanFHA	gga att cca gta gcc <b>ata ctt gtc att</b>
<b>cca tct cat cat ctt ggc tac c</b>	<b>aag</b>

Intronlängen [Nukleinsäuren]

▼ I1: 100  
 ▽ I2: 522  
 ▼ I3: 104  
 ▼ I4: 1211  
 ↓ I5: 1449  
 ↓ I6: 344  
 ↓ I7: 3300  
 ↓ I8: 1602  
 ▼ I9: 373  
 ◇ I10: 907  
 ↓ I11: 3156  
 ↓ I12: 2654  
 ↓ I13: 677  
 ⊥ I14: 5059  
 ↓ I15: 879  
 ▼ I16: 100

## Das humane Kanadaplin-Gen auf Chromosom 2

gccaagtcc	ctccaggggt	ttcctcggtc	acgggtccgcc	ggcgcaggca	28424381	
atcacaggg	cctgaggtcg	cctgacgttc	agggcagccg	gaagacgggg	28424431	
AGGTCTGGAC	CTGAACCGAG	ACAAGGAGGT	AC/CACACTAT	TCACTGCTGC	28424481	<a href="#">Kpn I</a>
GTCGCAAGCG	GGCTGGGCGG	CTGTCTGGAC	C/TCGAGAGGC	CTGAGGCAAG	28424531	<a href="#">Xho I</a>
GATCGCGTCA	GACCCCGAAA	GCTGGTTTGT	TGATTAGTGA	TCTAAGACCG	28424581	
CCGCAGG/AC	TTCTTCTCAA	TCAAGCTATG	CAACAGGAAG	TCATTACGAT	28424631	<a href="#">Eco47III</a>
CCCC <sup>1</sup> TTGTAA	CCTCTAAATA	TGTCCCCGTT	CTGCACAGCA	TCCCGATAAC	28424681	
CGTTTTGTTT	TTCTCATATT	ATGACCTTCT	C			
			atgttagca	ccacttcgca	28424731	
acgt <sup>2</sup> ccagg	tcgtgaagga	gcaacttcac	catcgccgcc	tacagacgcc	28424781	
actgggagct	tgggagagt	ggacgtggac	aggaacgtaa	agaccgaaga	28424831	
gtgggtttcg	aaggagc <sup>3</sup> ga	tttcgaagtt	gcaccggttg	aggatggctg	28424881	
acattctctc	tcagtcagag	accctggcgt	cgcaagacct	cagtggggac	28424931	
ttcaagaagc	cagctctgcc	ggtgtcccca	gcggcgcgga	gtaaggcccc	28424981	
ggccagcagt	tcttcaaacc	ctgaggaggt	acagaaggaa	gggco/actg	28425031	<a href="#">Apa I</a>
cgttgcaaga	ctccaattct	ggggagcccg	acatccctcc	tcctcagccg	28425081	
gactgcgggtg	atttttaggag	tctacaggag	g <sup>4</sup> agcagtcgc	gccccccgac	28425131	
agcggtttct	tcccttggcg	gtccagcc/gg	gtccccccct	accaagagcc	28425181	<a href="#">SmaI</a>
tc/atgggggt	gccgctgcc	cagcccccta	cagcttagag	acctgaaggg	28425231	<a href="#">Nco I</a>
cggcactatc	cttggcacc	gtagcttgaa	agggacgagt	tactgccttt	28425281	
tcggggag <sup>5</sup> ct	gtctggctgc	gacgtgtgcc	tggagcacct	tcggtgtctc	28425331	
ggtac/acgc	atgctgca/g	acaggcgctc	ggcctgacgg	agaatgacac	28425381	
:PstI						
agcaacgggc	cgggcttc <sup>6</sup> ta	cctctacgat	ctgggaagca	cc/atggcac	28425431	<a href="#">Nco I</a>
ttttctcaac	aaaactcgca	tccc <sup>7</sup> actcg	cacctactgt	cgagtccacg	28425481	
ttgggcatgt	t <sup>8</sup> gttcgcttt	ggaggcagc <sup>9</sup> a	cccggctctt	tatcctgca/g	28425531	<a href="#">M/VRF</a>
gtaggtagaa	aaacctagaa	ttgaaatttc	gggttcattg	gactgcgttc	28425581	
ttgtgcttct	taagcttttg	atgaggaaga	agaatctccc	actcagcgat	28425631	
tacgaaagt	aaggaatcaa	gtctggccta	tcactcttcag	acggctgtac	28425681	
acattgctat	atttctgaaa	gtcatgttca	caatcccga	ctctaaaata	28425731	
acttgtttgg	ccaggcgcg	tggctcgcgc	ctgtaatccc	aacacttttg	28425781	
gaggcccagg	cgggaggatc	gcttttagccc	aggagtttga	gaggaggctg	28425831	
ggcaacatgg	caagaccctg	tctcttaaaa	aaaaaaaaaa	aaattagcca	28425881	
ggcatcatgg	tcccagctgc	tcaggaggct	gaggtgggag	gatcacctga	28425931	
gcccaggagg	tcaaggctgc	agtgaggtgt	attacagcca	ctgcactcca	28425981	
gtccagccta	ggcgacagag	caagaccctg	tctctaaata	aataaataac	28426031	
ctttttttcc	ttggttcac	ag				
			ggaccaga	ggaagaccga	gaggcagaat <sup>10</sup>	28426081
cc						
nnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	28426131	
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	28426181	
nnctag						
	gaga	agactcagat	gaagaagagg	aatggatac	ctctgaaagg	28426231
aagataaatg	ctggtagcaa	gatgatgaga	tgg <sup>11</sup> gttgca	ctggggaatg <sup>12</sup>	28426281	
g						
gtaagaaat	taaaattgct	gccggagtta	atatttttaag	ttcattacaa	28426331	
gtggtaccct	taaatgtttt	tttaaatacat	acagcttttc	atggctcctt	28426381	
gagatagata	gggcaaacac	aattttgcaca	tgaggtaacc	aaaaccgaga	28426431	
gagattcact	gactttactg	ttgtaaagaa	attgacttat	aggcactttg	28426481	
gatttttttaa	aaattttattt	ttaatgcact	ctcttggttca	aaacttgtcc	28426531	
taagcataaa	attattattt	ttacaattct	aaaattttat	atttattaag	28426581	
tactgacctt	gtgctatgtg	attatcattg	gaggggatgg	aactctattc	28426631	
aatcaaataa	atgggatgtt	attcaatata	ggatattctc	ttgaattttt	28426681	
tgtactttgt	gaagatatcc	tgaatgtgg	aatatcta	cagataaagc	28426731	
tgggtccctta	gccaaaataa	taaactttct	ttaacaccag	atattttaga	28426781	

FHA-Domäne

DSRM-Domäne	aaatggatat	tcaggagatg	ggagtataaa	aaggtagaag	atggcattaa	28426831	
	tatatagttg	ggaagatagg	aaaaattatg	aaattacttg	tgctaagtgc	28426881	
	caaacaaaag	ctagaaacca	taagtatgct	agagtgaaag	tttgagagaag	28426931	
	agagaacagt	cactggggac	ttagacctgt	gttgtctgat	atggtagcca	28426981	
	ccagccacat	gtggttactg	agcacttgca	gtgtggctag	ttgcaattga	28427031	
	tgtgtgctgt	aaatgcaaaa	tacacactga	atttcaaaga	cttagtctga	28427081	
	aaaaaagaat	gtaaaatata	tctttcatga	tatttttata	ttgatgacat	28427131	
	gttgaaatga	caataatttt	acctgtttcc	ttttaatttt	ttaatgtggc	28427181	
	taatagaaaa	tttaagatga	cgcatacagc	tgtcattata	tttctgttgg	28427231	
	acagcactga	cttagatctt	tgggaaactt	aatttttttt	atttttagtag	28427281	
	agatgggggt	tcaccatgtt	ggccaagctg	gtcttgaact	cctgaccttg	28427331	
	tgatccacct	gccttggcct	cccaaagtgc	tgggattaca	ggcatgagcc	28427381	
	actgcgccca	gcctaaacta	tatctttatg	cagcctgaga	gaatagtggg	28427431	
	tatcattcaa	atagtctctt	ctcatgtctg	attatctttt	ctttcttttc	28427481	
	catatcctgt	ag					
		<a href="#">gagaagat</a>	<a href="#">gcagtagagg</a>	<a href="#">atgatgctga</a>	<a href="#">agagaacctt</a>	28427531	
	<a href="#">attgtcttag</a>	<a href="#">agtttcagca</a>	<a href="#">ggaaagggag</a>	<a href="#">gccttttata</a>	<a href="#">taaag/gatcc</a>	28427581	BamH I
	<a href="#">caaaaaggct</a>	<a href="#">ctccaaggct</a>	<a href="#">tttttgaccg</a>	<a href="#">agaag</a>			
			gtatg	taaacagatt		28427631	
	ctgaccctac	cactaaaaca	tatccagagc	agtgtggttt	tctagagctt	28427681	
	catgttgagc	tttatactaa	gatatgctat	aatttttattg	ctgtccttct	28427731	
	tgttcacttt	ttactcttgt	ggtcagttgc	tttaggttta	ttttgaaaat	28427781	
	tattcctcat	tagtatggca	gaggggaaaa	aatcataaaa	aatcttgtta	28427831	
	gtctttcttc	ttatcttaaa	aaaaggaagt	actttttcct	gactcatctc	28427881	
	attcttctca	aaagatcctg	gactttgggt	gtggggaaat	tgagccaact	28427931	
	tcctgtagtt	ttttaattcc	gaattcacct	gatcttttgt	aattcctaac	28427981	
	ataggttttg	attttatatt	atatgattta	aaattttttt	tccatagagg	28428031	
	attgttttgg	taggaatact	ttgagagaat	atctatgtat	atgtatgtat	28428081	
	atctgtatat	attttatatg	tatatataaa	taatataatga	aatagctgtg	28428131	
	cacttaatat	ctgtgcttct	aaaaaccagg	caactgtgtt	aaaataacca	28428181	
	ctaaagtcta	caacttataa	aagtgaacaa	tactatacag	tgaacagagc	28428231	
	tatgtatgga	gaattgggta	ctttgatctg	agtttgtttt	tttctctgcc	28428281	
	tcagacttac	tctaatttta	ttatcagaca	ataatcccta	ggaatgagaa	28428331	
	gtgaaatgca	ttgaaattta	ttattcagtg	tggatgggga	acttgttctt	28428381	
	tttttttttt	tgagacggag	tctcgctctg	ttgcccaggc	tgaggtgcag	28428431	
	tgggtgcgatc	tcgcctcact	gcaagctccg	ccttccggat	tcacgccatt	28428481	
	ctcctgcgtc	agctcccagag	tagctgggac	tacagggccc	cgcaccacgc	28428531	
	ccggctaatt	ttttttgtat	tttttagtaga	gacgggggtt	cactgtgtta	28428581	
	gccagaatgg	tctcgatctc	ctgacctcgt	gatcctccca	tctcggccat	28428631	
	ccaaagtgct	gggattacaa	gcgtgagcac	cgcgcccagc	cagaacttgt	28428681	
	tctttttttg	agacagggtc	tactctgtgc	gccagggccg	gagtgcaatg	28428731	
	gcgcaatctt	ggctcactgc	aaccttgacc	tcttgggttt	aagctatgct	28428781	
	ccggccttag	cccccgtagt	agctgggaca	aaagtcacgt	accatcatgc	28428831	
	ccggctaatt	tctgtatttt	ttgtacagat	ggggttttgc	catgtttgcac	28428881	
	agactggttt	cgcgctcctt	aactcaagct	gtcatcccgc	ctcagcctcc	28428931	
	caaagtgtta	ggattacagg	cgtgagccac	tgctaggaac	ttgttcgtat	28428981	
	ttaacgtttg	ttctcattta	tcattgtatc	aactagtaat	ttttggattc	28429031	
	tattaataat	gttttgtctg	tctttctccc	acag			
DSRM-Domäne				<a href="#">gagaag</a>	<a href="#">aattagaata</a>	28429081	
	<a href="#">tgaatttgat</a>	<a href="#">gaacagggac</a>	<a href="#">atagcacttg</a>	<a href="#">gctctgca/gg</a>	<a href="#">gtgag</a>		Pst I
				gtatg		28429131	
	ctcttttctt	attaatgttc	ttttctggaa	aatggccaat	ttcaggttta	28429181	
	atgtatgggt	atagataaca	acccaaagag	taactttcat	ctaagtttaa	28429231	
	gctatttcta	aatttgagcc	tttatcgttt	agtaaccctt	atattatttg	28429281	
	agagtgggggt	gggatgggta	agaaatagaa	agaaaatatt	ttaaatccaa	28429331	
	cattggaaaag	atagaacaag	atggattcaa	agactgaaag	gccatctaaa	28429381	
	aaaaaaatga	ctattatcat	agcatagtag	ttgttttctt	gagaattgga	28429431	
	gcttaatgct	gtgctataat	tcccaccaa	tcaatgaag			
				<a href="#">a</a>	<a href="#">ttacctgtgg</a>	28429481	
	<a href="#">acgattcaac</a>	<a href="#">tgga aaacaa</a>	<a href="#">ctgggtggctg</a>	<a href="#">aggccattc<sup>13</sup></a>	<a href="#"> a</a>	28429531	
	<a href="#">aaaaaagaag</a>	<a href="#">caatgatcca</a>	<a href="#">gtgctcattg</a>	<a href="#">gaagcttgct</a>	<a href="#">ggattcttga</a>	28429581	
	<a href="#">cactttggga</a>	<a href="#">ttgcttcggc</a>	<a href="#">aggaagcag<sup>14</sup></a>				
			g	tcagtatata	ggagcccttt	28429631	
DSRM-Domäne							

ttttctagat	ttaaaaaaag	gaaaactcaa	cacaaacgct	aataaaaactt	28429681
ctttatgggg	ggaaaatgta	aattgtacaa	aatttttttga	agtgaaaaga	28429731
gaaaaattct	caatacccta	aggtagccac	tgttttatatt	ctcccagaca	28429781
ttttctatgc	atatatagat	gtgtgctgag	acctagatcc	tttaacaaaa	28429831
aacactcata	cacaaatgta	gtcatattaa	ttacaatctt	ttgtgactta	28429881
cttttttaac	ataagaatgt	atcatggctg	ttgttattat	tattattttt	28429931
gagatggagt	ctcactctgt	caccaggtg	ggagtcagca	gcatgatctc	28429981
ggctcactgc	aacttccgtc	tcccaggttc	aagccatcct	cctgcctcag	28430031
cttccctagt	agctgggtct	ataggttgca	ccacgcctgc	acaactaatt	28430081
tttgtattta	tttattttat	ttgagatgga	gtttcactct	tgttgcccgag	28430131
gctagagtgc	aatggcgcaa	tctcacctca	ctgcaacctc	tgccctcccg	28430181
gttcaagcga	ttctcctgcc	tcagcctccc	aagtagctgg	gattacaggc	28430231
atgcaccacc	atgcctggct	cattttgtat	ttttagtaga	gacgggggtt	28430281
ctccatgttg	gttaggctgg	tctcgaactc	ccaacctcag	gtgatccacc	28430331
tgccctcgcc	tcccaaagtg	ctgggattac	aggcatgagc	caccgcacct	28430381
ggccaatttt	tgtatttttg	atagagacga	ggtttcaccg	tgttgaccag	28430431
gctggctctg	aactcctgac	ctcaggtgat	ccaccgcct	tgccctccca	28430481
aagtgctggg	attacaggca	tgagccactg	cgcctggcgt	atcacgnnnn	28430531
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	28430581
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnngcct	28430631
cccgcctcca	atactgttcg	cacaccaata	tgcgctccat	accatagcag	28430681
caattgccat	cgtctatgaa	agtctcccgt	ccgtactcgc	tgtccatggt	28430731
gcgtcgcgtc	ctgtccgtgc	atttttcctt	cctgtcctac	acctggtacg	28430781
cttaccttcg	acctttccct	acttgccctg	ctgtgggttg	ccttcccgcg	28430831
gtctctgggtc	tcaacctcgt	cggggaaagc	ctgtatcttc	tgtgctatgc	28430881
tcctcagatt	ggagtgcagt	ggtctgatca	cagctcactg	cagcatcaac	28430931
ttccggggct	caagcgatcc	tccgcctca	gcctcctaag	tagctgggac	28430981
tacagtgcac	accaccatgc	ccagctactt	tttttagatt	tatttttagt	28431031
aaaggcaagg	tcttgctatg	ttgcccaggc	gtgggtacat	ctctttacta	28431081
tggtttattg	ggatttaggg	aaagagggaa	attagatatg	tgtgtttaat	28431131
gtaccatctt	aacctgcaaa	ttaggcttat	attaataagg	actattttcc	28431181
ttgcaaataa	tagaagtcca	attcaaacta	gcttagggga	aaggtcattg	28431231
gctgcagaag	ctgggaagaa	tagctcagga	tgaaggaaca	ggagtgaagg	28431281
aacaactgca	tgaaccagaa	cctcaagttc	tgaaaccata	acttagtact	28431331
accaaagtag	actcagcatc	accaggacat	atacaagttg	tgtgtgtgtg	28431381
tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtc	tgtgagttag	tctgtctcac	28431431
gagtgcattt	ttaaactttg	cagacagatt	cttaccctgt	gctgaaaagc	28431481
tgattgctta	cagccctgaa	cttaacagtc	tctcacttta	ataacctcat	28431531
tgtaaagaga	gcctctttgc	cccattctta	aatataaata	tgagggaaag	28431581
agtcttactg	atttggcttt	ggtcctatga	ctatccctaa	accagataaa	28431631
atgggggagg	aattttctag	gggaaagagg	tactttttatc	agaacaaagg	28431681
gagtagaatt	ttgtagggtg	aacaaaaaag	taatagctgt	catagtctct	28431731
tattgatgga	ctctttacat	attcactggt	ataaatacta	ttgcattgat	28431781
atttatagaa	taaattccta	gaagtggaa	tgctggatca	atgcattttt	28431831
aatggcagat	attgtaggct	tgaccatcaa	aaagggttga	tcaatgtaca	28431881
ttcccaccaa	ttattaatct	ttttatgttt	ttctagtcta	atagatgaga	28431931
agtatcta	ttttaaattt	gtactttatt	ttttttttaa	gtaacatatt	28431981
taaaaatatt	tattgtattt	ttctgtgaac	tgctttcatt	atcctttttc	28432031
aaattttctt	ttgggttatt	gtcctttttc	tcattttttc	ttttcctttt	28432081
ttcctcattg	attttttttt	ttttttgaga	tagagtttca	ctcttgtcac	28432131
ccaggctgga	gtgcagtggc	gctttctcgg	ctcactgcaa	cctctatctc	28432181
ccaggttcaa	gcaattctcc	tgcccttagc	tcctgagtag	ctgggattac	28432231
aggcaccgcg	cactatgccc	atctaatttt	tgtattttta	gtagagacgg	28432281
ggtttcacca	tgttggtgag	gctggtcttg	acctcaggcg	atccatcccc	28432331
cttcagcctc	ccaaagtgtc	gggattacca	tgccctggcca	tcctcattga	28432381
tttttaaaag	ccgtttgtct	attaaataaa	ttaaactatt	gcttttaatga	28432431
aaaattattt	aataagaaat	tgtgggaaaa	tatacataac	agaaaagtgt	28432481
accattttta	gcatttttaag	agtatcactc	agtggcatta	agtacattca	28432531
caatattata	gaaccatcaa	cactgttcat	tttggaaact	ttttatcatt	28432581
ccatactgaa	attggtatct	gttaaacact	aacttcattc	tcctccttcc	28432631
ccagcctctg	gcaaccacca	ttctactttt	ctgtctctat	gaatttgact	28432681
acttttaggta	tctcacatga	tgtagtaagt	gtcctttttat	atatggctta	28432731
tttcacttag	tataatgtct	tcaaggttta	gccctttgtt	tttatacgta	28432781
gtttggcagc	ttgtagaacc	tctcttttcag	tagttgatgg	tgacattttta	28432831



agctccttgc	ctacttgcct	tcttttctttt	tcttttctttt	tttaaaaaact	28432881	
tattttattca	tcatttttate	tacctctag				
		<b>t atctcggaaa<sup>14</sup></b>	<b>aggaaagcca</b>	28432931	<a href="#">NLS I</a>	
<b>agaactggga</b>	<b>agatgaagac</b>	<b>ttttatgata</b>	<b>gtgatgatga</b>	<b>cacatttctt</b>	28432981	
<b>gataggactg</b>	<b>gcctgattga</b>	<b>gaagaagcgt</b>	<b>ctgaacagaa</b>	<b>tgaagaaggc</b>	28433031	
<b>tggcaagatt</b>	<b>gatgagaagc</b>	<b>cagagacctt</b>	<b>tgaatcattg</b>			
			<b>gcaagtttta</b>	28433081		
tttatggaag	tagctgtggt	atttaaatagt	ttaatttttta	ataacataat	28433131	
gtattatttta	aatatgtttt	atgataattt	ttaaagtagt	agcattgaaa	28433181	
tctgatactg	aagtataact	tttgtggtct	gttaatttta	tggtaacaga	28433231	
caactagtct	tatccaagtt	gtttgaaaaa	aatatggctt	gctgctagat	28433281	
cctttccttc	aggatattga	tccattaatt	aacattcctt	ggatatgata	28433331	
ttacctctct	caaaaggaaa	ggaaaaagtt	ccaagttagg	gcgttctgag	28433381	
gtgaaattga	ccttagcctt	ctggcagtc	agagaagtca	aaggaatttt	28433431	
gaagaatgta	gtatggtaat	atgtagtctg	aaacagtatg	ttcttcagga	28433481	
aattatcaca	aggtgacgtg	ttaatgggta	ggtaacagac	aataataggc	28433531	
aggtaatagg	ctacctatta	gactagaaaa	aaacataaga	ttaataatgc	28433581	
agagcttgac	cagaatatgg	agaagtagac	tctcaattgg	tggaagtgt	28433631	
caatacaacc	ttttaagtga	tcaatcctac	gacatctgtc	agtattaaaa	28433681	
atgcattgat	tcagcaattg	cacttcaagg	aatttggtac	aggtattaat	28433731	
ttatagtagg	attcagagct	taaaacatta	cccaacatct	atccttttga	28433781	
tttatgtgaa	aacaaatgcc	ttgagctcct	tcttctgagt	aaaatgaagt	28433831	
ccgagttatt	cattctgttt	aattctgtgt	tttttaattc	agaaataaat	28433881	
taaatttgga	tttaacacat	aaaaagtggt	aactcctggc	tgggcatggt	28433931	
ggctcatgcc	tgtaatcca	gcacattggg	aggctgaggc	cgggtgatca	28433981	
cctgaggtca	ggagttcgag	accacactga	ccaatgtggt	gaaacccac	28434031	
ctctactaaa	aaaaaaaaaa	tacaaaaatt	agacaggcgt	ggtggtgtgt	28434081	
gcctgtagtc	ctagctactc	tgagggtcga	gacaggagaa	ttgcttgaat	28434131	
gcaggaagca	gaggttgag	tgagtcgaga	tcacgccatt	gcactgcagc	28434181	
ctgggtgaca	gtgcgagact	ccatctcaaa	aaaaaaaaaa	aaaaactatt	28434231	
aactctggcc	aggtgtggtg	gtcacacct	gtaatcctag	cactttgaga	28434281	
ggctgaggca	ggctgatcat	gaggtcagga	gattgagacc	atcctggcca	28434331	
acatggtgaa	accctgtctc	tactaaaaat	acaaaaagta	gctgggtgtg	28434381	
gtggtgcaca	cctgtagtcc	cagctacttg	ggaggctgag	gcaggagaa	28434431	
cgcttgaacc	cgggagtcgg	aggtggcaga	gagccgagat	tgccaccactg	28434481	
cactctaccc	tggcaacaga	atgaggctct	atctcaaaac	aaaaaaaaaa	28434531	
gtgttaactc	cataagtagc	agtttaactg	gacttttgaa	ttaatcttct	28434581	
taaaacttct	agtaagaata	attaaaacag	gaggatgaaa	aacagtttga	28434631	
aagaagaaaa	actttgtaac	cctgttgatt	tgggtgttac	ag		
			<b>gttgcaaa</b>	28434681		
<b>attaaatgat</b>	<b>gctgaaaggg</b>	<b>aactttctga</b>	<b>aattttctgag</b>	<b>agattgaaag</b>	28434731	
<b>cctcaagcca</b>	<b>ag</b>					
	<b>gtaagttt</b>	<b>ttcatcaaat</b>	<b>atttattaat</b>	<b>ataccacata</b>	28434781	
tagtgctcta	tgctaggcac	tggggctaca	ttagttaata	agaaatacca	28434831	
tacagaatat	ggagcctttt	aaaggagcaa	cataccgttt	tagaactaga	28434881	
aagaacatta	taaatcattt	ggttttaacct	ccttattttaa	ttgttgaggg	28434931	
gaatgaagca	cattgagaca	aaatgacttc	ccaaggtctc	atggctataa	28434981	
cctgttcctt	attcctatta	ctagtgtatg	cctctgtccg	gttttatgtt	28435031	
agtgactttt	atatggaac	tttggtgaa	ttttaaaaata	ttcaggatca	28435081	
tcttttctaaa	catgtgttat	tcttttcttg	gacag			
			<b>ttcta</b>	<b>tcagagtctc</b>	28435131	
<b>catctcagga</b>	<b>ttcttttagat</b>	<b>gcgttcatgt</b>	<b>cagaaatgaa</b>	<b>atcaggcagt</b>	28435181	
<b>acattagatg</b>	<b>g<sup>15</sup>tggtcccg</b>	<b>gaagaaactt</b>	<b>cacctgagaa</b>	<b>cttttgaact</b>	28435231	
<b>gaggaaagaa</b>	<b>caacagagac</b>	<b>ttaaagggtt</b>	<b>aataaaaaatt</b>	<b>gtaaagccag</b>	28435281	
<b>cagagattcc</b>	<b>agaactaaaa</b>	<b>aa</b>				
	<b>gtaagtct</b>	<b>tagttatatt</b>	<b>tggaattcta</b>	28435331		
aataagtatg	gtagcataga	taacattttc	aattatcgct	ttatcttctt	28435381	
aaataatcat	tatatannnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	28435431	
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	28435481	
nnnnnnnnnn	nnnnnnnatta	cgtagtagtg	caagctttca	ttcttgacgt	28435531	
cgactctatt	ggatcccatc	ttgtcaactg	aattgctatc	cttttggttt	28435581	
tgctctgttc	tccccctgcc	tttctaattt	ctactatctc	ttctttatac	28435631	
ccttctcag	ccttgctcta	atgggcttag	ccttttctaac	tatctccagc	28435681	

cgttgagaat	gttgacaggc	tcagcagttg	cagtctctca	ctatatcttt	28435731	
gtcattacta	cactgggtat	cctgcatact	gtacccccat	ccccatgcac	28435781	
actttttttt	ttaagtgtct	agagctattg	cgcttaagtg	ggagctccag	28435831	
ataagtaaga	cactcttcag	aggttggttg	gaagtagggc	tttacaccat	28435881	
ggatcaatct	cctgctgctt	atatgttctc	ctttgccagt	gacctttgta	28435931	
ctgtagtcat	ttcatgggtg	tgaagtcagt	tagcatgtgg	caaattactt	28435981	
gactaaggga	gcagcctcat	catagctctg	tgtctgtgac	agtcagcatt	28436031	
gttcttgtcc	attcaaaatc	tgttggtctg	aatacctctt	tcttattggt	28436081	
atatgcttag	atattcattt	tgtggtaatt	tttattttgc	cagagggttc	28436131	
tttgtcagta	tcatgggtatt	tttagataaa	accttgggac	tccctggaat	28436181	
agatgtgtat	aattattctt	tcttcctag				
		g actgaaactc	agactacagg		28436231	
tgagaaaaac	aaagctaaaa	agcttacatt	gcctctattt	ggtgccatga	28436281	bpNLS
aaggaggaag	c <sup>16</sup> aaattcaaa	ttaaaaactg	gaacagtagg	g		
			gtaagttgt		28436331	
gagtcaggg	gttaaacttt	tagcccttga	gttatccctg	agctaatttt	28436381	
tctcttttct	tttttgaaac	tacaaatgac	tcattccata	gtaatgtgag	28436431	
aaagggctgt	gggcttggtg	tgatcacatc	tttcccagaa	cttgggttctt	28436481	
ggattctttt	tttttttttt	ttttggagac	agagtctcac	tctgtcacca	28436531	
ggctggagt	cagtggcgtg	atctcggctg	actgcaactt	ccgcctccc	28436581	
ggttcaagca	attctcctgc	ctcagcctct	cgagtagctg	ggactacagg	28436631	
cgtgctccac	catgcccagc	taattttttgt	attttttagta	ggatgggact	28436681	
tcaccatggt	ggccaggatg	gtctccatct	cttgacctcg	tgatccacct	28436731	
gccttggcct	cccaaaatgc	tgggtttata	ggcatgagcc	attgtgcctg	28436781	
gccagtttgt	ggattctttt	tctcagctta	gggttatcaa	gaattgatga	28436831	
attaatttat	gccaatcaat	ttgcaagtaa	atggtttgta	aattagaatc	28436881	
atagttttat	aatttctcat	gaatgttgca	tttaagaatg	ggtctcctgc	28436931	
attaaatgac	tttcccagg	tggatagatg	tagtggtcag	actcaccaac	28436981	
atttaagaac	atagtgtgtg	cacttgccct	tgccatatga	tttttcttca	28437031	
tttaatcctt	ccaacacctt	ttgctgtgtg	ggaattattg	cctcttacaa	28437081	
atgaggaaat	agagtcagag	aagttaaata	ccagatcaca	ccagcgttat	28437131	
gtaactaagc	tggtaatcag	atccaggctc	gtctcttgag	ctttatgatt	28437181	
tcctgtctac	cctacaatat	atgtctgtct	gtatgttttt	gctttatcta	28437231	
tattcctatt	catagattca	gcttttataa	ggttttcatt	accctaaga	28437281	
gctgaacctt	gagtattagt	ttgctagggc	caccataaca	aaatactagg	28437331	
gattgggcag	cttaaacac	agaaatttat	ttgttcacag	ttgccagcag	28437381	
ggttggtttc	ctctaaggcc	tctctgctta	ccaatggctg	ccctcttgct	28437431	
ggctcttcag	atggccatcc	ctctgtgcac	ttgcactcct	ggtgtctctt	28437481	
cttcttcttc	taaggacatg	agtcatactg	agttagggcc	ccacccta	28437531	
agtgtcattt	taattcagtt	taattttaatt	tacagtcata	ttctgaggta	28437581	
ctggggcttg	ggacttcaaa	catgaatttg	ggcagcagg	ggcacaattc	28437631	
gtccaaaaca	ccctgaatta	gggtatactg	ccctctggtg	gcagaaatct	28437681	
gaagtcctag	ctatgtattc	tttttggttg	tttcattgag	agacagtctc	28437731	
acactgtcac	ccaggctgca	gtgcagtggc	catctcggct	cactgcaacc	28437781	
tctctctccc	gggttcaagc	gattctcctg	cctcagcttc	ccgagtgcct	28437831	
gggattacag	gcacccacca	ccacgcccc	ctaatttttt	gtattttttt	28437881	
ttagtagaga	cagttttttca	ccatggccag	actgggtctg	aactcctgac	28437931	
ctcatgattc	acctgcctcg	gcctcactat	gtattctgaa	tgagtaattg	28437981	
tttaccta	aagtaggctt	ttcaatctgt	tgcgnnnnnn	nnnnnnnnnn	28438031	
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	28438081	
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	28438131	
acaccaataa	gagaagcaaa	actaacaggc	caaacaggga	aacaagtagc	28438181	
acacaccacc	agcaaaaacg	aatcaaccgc	aaacaaaaag	cacggaagg	28438231	
gacaaatccg	agaaaaaaac	caagaccaaa	tggacacaag	agatataaca	28438281	
acgcaccaac	ggaccagaag	aaaagcaaaa	aatggaacc	agccaaaata	28438331	
ccaaaaataa	tataggacaa	ttctctaggt	acaaaccgtt	ttcaacgctg	28438381	
ccgaaacatg	tgagggtactc	ctgaacctga	ggtttaagca	gccttagact	28438431	
tcaataagaa	ttctgaatga	gtaaaagggt	tacctaacaa	gtagcatttc	28438481	
aaatctgatg	caatggggac	tcagggtttta	aatagaaaa	ctttttacta	28438531	
aacagccctc	cttagagaat	tttagaacta	agtcctatat	ttaaaagata	28438581	
atataacca	ggcgcatggg	ctaatacctg	ttatcccagc	actttgggag	28438631	
gccgaggtgg	gtggattgct	tgagctcact	agtcgagacc	agcctgggca	28438681	
acatggtgaa	accccgctct	tactaaaaat	acaaaaatta	gctgagcacg	28438731	
gtggcctg	cacctataac	cccagctact	caggaggctg	aggcaggaga	28438781	

atcgcttgaa	ccgggggaggc	agaggtttca	gtgagctgag	atcgccaccac	28438831
tgactccag	cttggggccac	agagcaagac	tctgtctcaa	aaaaaaaaaaa	28438881
aaaaagatat	aaccaagata	tgcttttggtt	ccttccctct	attccataac	28438931
tgtgatcaac	cttttctaata	aaatactttt	attgaatggc	tttgattaga	28438981
atatttagct	ttattctttg	agaaatgtct	tcctcctttt	cttcaggatc	28439031
tgtttgatgg	atttacctgc	cttgtttctt	tgaaattacg	ctaagtctaa	28439081
aatgaaaaag	cagcacaagt	gacttatttc	tgattgtctg	atttattcct	28439131
tagaagattt	tgtaatacat	tgaaatcctt	taatatcatg	agttataaca	28439181
gtccagaatt	cctgtagctg	gcaactcatc	gaaataacta	tttttagttcc	28439231
ttacaagcta	ttttcaagtg	ttttgtattt	agtaatcttt	gactctagga	28439281
actaataaag	acacttggtt	aggggtctata	gaggggtaaa	atttcatgtc	28439331
aaagtccac	ctccagcaga	cttctgtgga	gttcatcaac	ctaaaaagag	28439381
taaacattca	gtacatttag	actgacctcc	ttgaaaagat	ttttctcttg	28439431
ttgtcattaa	gtagaactac	ttgttcatgg	ttttgtttcc	ctcttag	
			aag		28439481
ttacccccca	agcgtccaga	actccctcca	actctaataga	gaatgaaaga	28439531
tgagcctgaa	gtagaagagg	aggaggaaga	ggaagaggaa	gaagagaaag	28439581
aaaaggagga	gcatgaaaag	aaaaaactgg	aggatggaag	cctcagtagg	28439631
ccacagccag	agatagagcc	agaagcagca	gtgcaggaaa	tgaggcctcc	28439681
caca/gatctc	acacatttta	aagaaaccca	aacccatg		
		gt	aatatctttc		28439731
ttctccttcc	tgtgttggtc	agtgggcagt	tacattgatt	gtggataggt	28439781
tttaaaaaagc	aaggccagtt	cttgtctgtg	catttgactt	tgtatgtgat	28439831
atactgactc	tgtagcaagg	aaacatactt	tcttggtctt	cttcctttga	28439881
ccgccagtc	ttatttgtct	tcattgcaaa	ttaagggcag	ttatttccaa	28439931
tccattccag	aattacagaa	aattgaaggc	tatggaatct	gaaaccatag	28439981
ctgctgtgga	ataatcctga	gctgctgcca	ctgtgtgagt	tggagggcag	28440031
tggaacaggg	tacatgatgg	ggcctgatca	gggtggtctc	ggataagtca	28440081
accctatttc	attttttcct	ccatccctaa	aacagaggcc	aaaccataat	28440131
tgtactcatt	ggactaaagt	tctcaagaag	gatcttgctt	cattcatttt	28440181
tgtgtgtttg	gaacctagca	caaaacctga	cacatatcca	cccgcctcag	28440231
caaataatttg	atgaaaaatg	ttgaaagacg	gaatagattg	atattcatat	28440281
agatatatgc	atcaattaat	tctgtatttt	ctatatatat	attctaatta	28440331
caaaggggta	tatgttcatt	ttagaaacta	tagatcatac	ataaaaagtc	28440381
aaaggaaaaa	aaagaaatcc	ccacaacccc	acccctaaag	atcattgttt	28440431
atcttttttag	tatcctttca	tcccttgta	actgcagggg	ttattttcct	28440481
gctgggtggc	caaactggtt	aggaagataa	agatctcaga	aaataaggag	28440531
tatgaggaga	aacaataaaa	actggcactg	aatgtatggg	aatgcatgca	28440581
tgtctacttc	cacaacaaac	caggcttggc	tacataaaaa	ctccaggcct	28440631
ggtatgtagc	ccttctcttg	aatcaccttc	atttgtctgg	gaaacagaaa	28440681
agttactggt	tcctcatctg	tgagaggtaa	gtattctgta	tctgcatttg	28440731
tcctttttcaa	aaaggtactt	acatgagctt	ggcttttggg	ccatatattg	28440781
tgaaggtgga	tataaacagg	tcagcaggag	gggagcaata	agtatcataa	28440831
ttttttttggt	taacagacca	aagtaagtat	gtgtgtgtaa	aaatagctta	28440881
gattttgaaa	cttggtttat	aagattaaat	aattagttaa	tttggccagg	28440931
cacagctgca	cgctgtaat	cccagcactt	tgggaggccg	aggcggtatg	28440981
atcacctgag	gtcaggagtt	cgagaccagg	ctggccaatg	tgggtgagacc	28441031
ccgtctctac	taaaaataca	gaaaaaatta	gttgggcgtg	atggtgcatg	28441081
cttgtaatca	caggtactca	ggagggctct	gagcaggcag	gagaattgct	28441131
tgaacccggg	agacagaagt	tgacgtgaat	tgagatcatg	ccactgctct	28441181
ccagcctggg	tgatagagtg	agactgtttc	aaaaacaaaa	caaaacaaaa	28441231
ttaaataaatt	agtaaatttg	cagtgatgag	ggattacccc	aggccttttt	28441281
tcctgtgggt	tgtttttatt	tttactttta	tatttacttt	tattgagaca	28441331
gagtcttact	ttgttaccca	ggttgagata	ctgtgggtgtg	atcttggtct	28441381
tctgaagcct	tgacctccca	aggcacatgc	ttgtagagaa	aatagagtca	28441431
tagggctctc	ctatgttgct	caagctggct	tcaaactcct	ggcctcaagc	28441481
aatcctctca	cctcagcctc	ccaaagtgtc	gggattatag	gcgtaagcca	28441531
ccatgccag	tttatatatt	gctattttat	aacctagtgt	tttttttctt	28441581
atgccttaga	ctattctttt	ttaaagtgtg	tttcagagaa	ggagcatagt	28441631
ggttcatcac	atgcatatgc	cataatgtat	ttagtcaact	ctcaattggt	28441681
gaacatgtag	gttattttctt	aattttttgct	attacaaaca	tatatataac	28441731
aaattttggg	gctaggctgg	gtgactcaca	cctgtaatcc	caacattttg	28441781
ggaggccgaa	gtaggagaat	gacttgagcc	caggagtgtg	aaaccagcct	28441831
ggacaagata	gtgaaactct	atctctacaa	aaaattaaaa	aaaaaaaaata	28441881

Bgl II

ttggccaggc	atggtggtac	atgcctgtag	tcctagctac	tctgcaggct	28441931	
gaggcaggag	gatctctgta	gccagggaat	tcaaggcagc	agtgaagctat	28441981	
gattgccccca	ctgcactcca	gcttgggcaa	cagagaaaaa	ccctgtttct	28442031	
aaaataataa	taaatTTTTg	tggtcatctc	tgatttttaa	aaaaatatgt	28442081	
tctgggagta	gaatttctag	gccaaaggag	atgtacattt	ttgaggcttt	28442131	
tagtaagtat	tgctaaaaag	ttttacctca	atgtttggcta	gtgtttttaag	28442181	
tggaaaattg	gcagttttct	gtaatacatt	tgaacatat	ttattttaaaa	28442231	
ccttaagatt	agttgaagct	gatgataata	aaactggatg	attatgtact	28442281	
tagcttctct	ttctcttggt	tttgtttttg	tttgtttggc	tttccaccat	28442331	
gaattaaatc	atgacaatat	gatttgatat	tgctttttat	ag		
				aaaacatg	28442381	
<a href="#">tctcaactta</a>	<a href="#">gcgaggaaga</a>	<a href="#">acagaataaa</a>	<a href="#">gattatcaag</a>	<a href="#">actgtagcaa</a>	28442431	
<a href="#">aaccacttca</a>	<a href="#">ttgtgcgcag</a>	<a href="#">gaccctcag</a>				
		g	caagtagtac	gcagccttca	28442481	
ttgctgctct	gcacacaggt	ggctgactgg	tttcataagg	gaggggctgg	28442531	
cagctgacct	gaaggcagca	cagagaatgg	tccttttagtt	atgttgccac	28442581	
taggccccctg	gacaaagttg	gaacataaga	gaggtttgt	tttggtgcca	28442631	
tcccatttgc	ctttctttta	ctcctcttcc	accttctggg	ttccctctcc	28442681	
ctccccca	aagcacctaa	tgcttgata	cttccctctg	gctgtgcaaa	28442731	
gctctccaca	attttacatc	tcccaaagtc	aaatatgtac	ctattatggg	28442781	
agtaattcca	aaactatctt	aaaagaaatt	gttaaaagga	ctgctttact	28442831	
ctggttttac	ctgtaatggg	taaactgtgg	actagtaaaa	tcagcctcat	28442881	
tttttttaaa	cttgttcgca	taatgtgggt	atattcaaac	ttgtagaaca	28442931	
gccttaggat	ttaaaaaacta	gggttattca	tccaggaaaa	attttctctt	28442981	
gatatagttt	ttacagcagt	agaaggaatt	gttgagaatt	gcattgtcat	28443031	
gagcatcttt	tcttcaataa	ttgtaatgtt	cttttaggaa	gaattttgcc	28443081	
tttttatttt	acttatactg	aaaatagcta	ttgccagttt	ttttttctta	28443131	
aattag						
	catc	aaagaatgaa	tatgagaaaa	gcagaggtga	attgaagaaa	28443181
<a href="#">aagaaaacac</a>	<a href="#">ctggtccagg</a>	<a href="#">caaa</a>				
		gtaagt	atttcacttg	tctgggagta	28443231	
aaaatgaatc	cctttgtcat	ggaccacatc	cagaaaagtg	aatctttgga	28443281	
gactgactta	acagagttcc	cagcagcctt	attccccctc	cctagaaatc	28443331	
tagattcttt	gatttttgtt	tttgaatttt	ctgttgctct	tatcactctt	28443381	
ttccctataa	ctgctcacat	acaagctatc	tcttttatta	gtttatgaat	28443431	
ctttctttat	atcctaattt	gccatataaa	gacatttgaa	taacatatct	28443481	
ttattttcct	ccttttatta	cacaaaagg	aggatgtgat	gtactccatt	28443531	
ctacatctgt	ttttttgttt	tattttattta	tttattttatt	taaaccactc	28443581	
atggaaatta	ttttgtaaca	gtatattgag	agtttctcac	catatggagg	28443631	
acgttatcta	acagttcctt	acagatggac	acttgcatgt	tttttagtct	28443681	
tttattacaa	taatactata	atgaacaatc	ttgtatatat	ataattttgt	28443731	
gtggatatag	taagctccca	gaagtgctag	gctgtatcag	gaggtcccca	28443781	
agacactcac	aggttaggtc	attcacgaga	ggaccaggt	ctcagcgtat	28443831	
gattgtactt	gcacttatga	tatactacag	caaaaggaca	ccaggcacca	28443881	
tcagcaaagg	gagaagggaac	atggggcaaa	atatggtgga	aactggcaca	28443931	
ggcttccaag	gatgtcttcc	agtagagtca	cacaggacat	gcttaattcc	28443981	
cctaagaaca	agttgtggca	acacttgcca	aatgttgcta	actaagggaag	28444031	
ctcattagag	actcagtgcc	cagggttttt	attggcgact	gatcacatag	28444081	
gcattccctg	cctggcatct	accaaatttc	agacttccag	aaggaaagca	28444131	
ggtgttcagc	atgaatcata	ttgtttgtac	aaacagttta	ggcacaatga	28444181	
gccattcttg	tcagttaggg	tagcagaaac	cttcccaaag	tctggattcc	28444231	
cagatgccag	ccaagggcaa	accttgcaaa	taggttttca	atggatagca	28444281	
gtcagccttg	ctctgttaac	ttttctaaac	cttggccaaa	aggtaaattgc	28444331	
caaatttccc	tctatggggg	ctgtaccatt	tagcactcac	acctgcagtg	28444381	
tgtaaactgc	cccttttaaa	gagtgtcatg	taactcactg	gctgaaaatc	28444431	
agcttgat	gctttatgga	aaaaagggttc	agagagagaa	tattccccca	28444481	
agtaggttac	ttatgtcaag	atcattaata	gaaactgttc	tctgttagtt	28444531	
ttgtttgtct	aacaggcata	aggacaatag	ttcttagagt	taaaattata	28444581	
cctatatata	taatttttaa	aaaatagctt	ttgggttaca	aatggttctt	28444631	
tggttacata	gatgaatcat	atagtgatga	aatctgagat	tttagtgcac	28444681	
ctgtcaccca	agtagtgtac	attgtaccca	atatgcaatt	ttttattcct	28444731	
catccccctc	ccagcctcct	ccctctgagt	ctccaaagtc	catcatacca	28444781	
ctctgtatgc	ctttgcatac	ccatagctta	gctcccactt	ataagtgaga	28444831	
acatatggta	tttgggttttc	cactcctaag	ttactttgct	taaaataatg	28444881	

NLS II

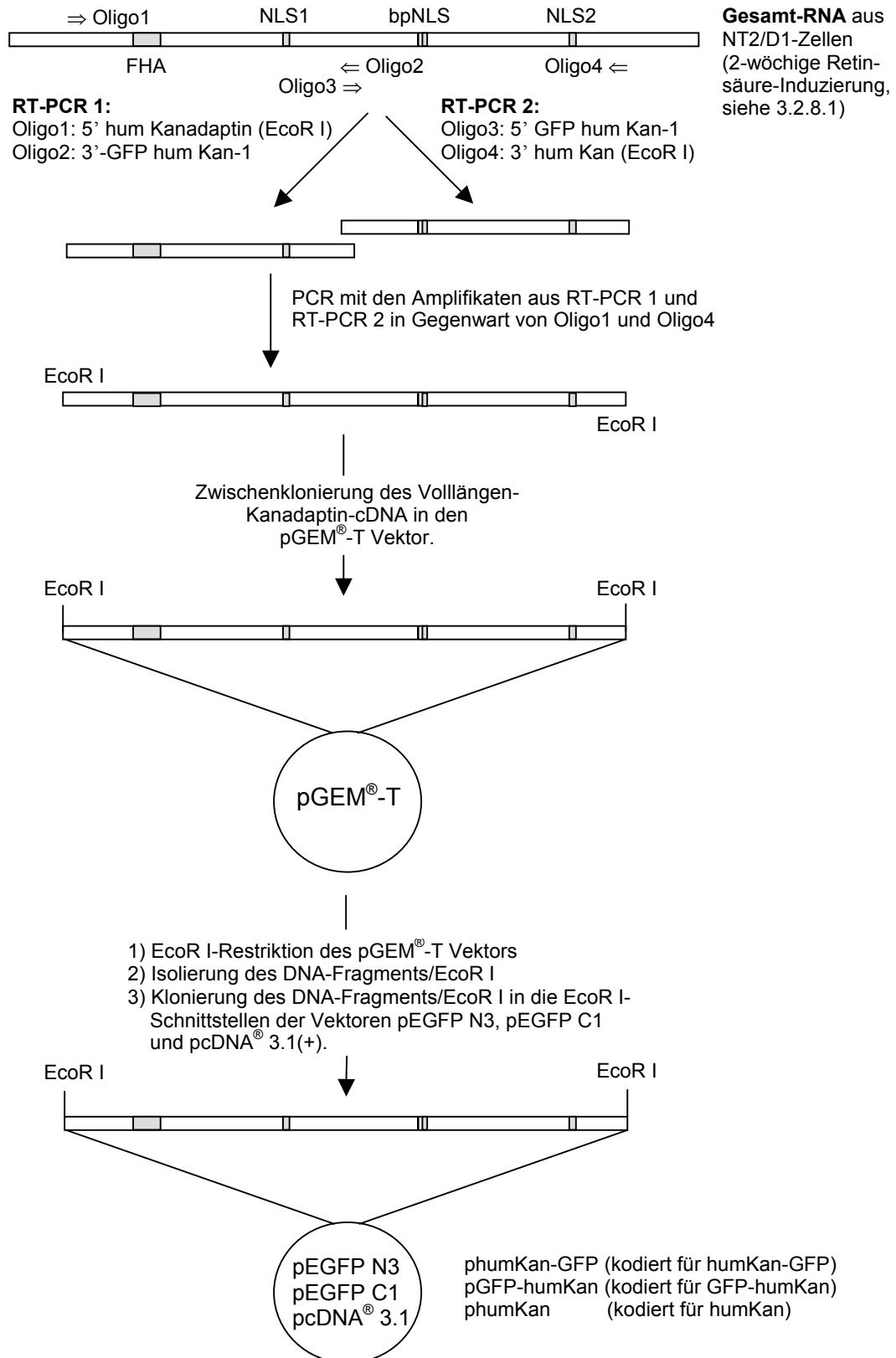
gcctctagct	ccaagttgct	gcaaaaaaat	tttatttttt	atttttattt	28444931
ttatttttga	gaccgagtct	tgctctgtca	cccaggctgg	agtgcagtgg	28444981
tgtgatcatg	gctcactgca	agcttcaatc	tcttgggctc	aagtgatect	28445031
cccacctcag	actcctgagt	agctgggact	acagttgtgt	accacaatgc	28445081
ccagctaatt	tttgtgggtt	tttttgtaga	aataagtctt	gttttgttgc	28445131
ccgggctggg	ctcaaactcc	tagcttcaaa	tgatcctggg	atgctgactt	28445181
ttattgaatg	ctttttctgc	atctattgag	atgatcata	ggtttttgtt	28445231
tttaattctg	ttgctgtgat	gtatcatatt	tattgacttg	catatgttaa	28445281
accatcccag	catccctggg	atgaaaccca	cttgatcatg	gtgtattgaa	28445331
taggggtgat	tatttttctg	atatgctggt	ggattcagtt	tactagtctt	28445381
tcattgagga	tttttgcgtc	tgtgttcacc	agggatattg	ggctctagtt	28445431
ttcttttttt	ttgttatgtc	ctttcctagt	ttttgtatca	gggcgatatt	28445481
agcttcatag	aatgagttag	ggaggattcc	ttcttttctc	ttcttttggg	28445531
atactttcag	taagattggg	accaattctt	ccttgaatgt	ctggtagaat	28445581
ctgactgtga	atccttctgg	tcctgggctt	ttttttgttg	gtggtaatat	28445631
tttttaatta	ctgactcaat	ctcactgctt	tttattgggt	tggtcaggat	28445681
ttctgtttct	tcctgattca	gtctaggagg	gttgtgtgtt	tccaggaatt	28445731
tatccatttc	tactagatgt	tctagtttgt	gtgcatagag	gtgttcatag	28445781
tagtctcaaa	ggatcttttg	tatttctgtg	gtgttgcttg	taatgtctcc	28445831
attttccttt	ctaattgaac	taatatagaa	tcttcttttc	ttgtctaate	28445881
tagctaata	tctatgaatt	tagtttatct	tttcaaaaac	cacctttttt	28445931
ttcattgatc	ttttgcagtt	tcttttgttt	caatttcatt	tagttctgct	28445981
ctgatctttg	ttatttcttt	tatgctagct	ttgggtttta	tctgttcttt	28446031
tttttttttt	ttttgagaca	gagtctcatt	ctgttgccca	gggagtgcag	28446081
tgggtgcgatc	tcagctcact	gcaacctctg	cctcccggtt	tcaagcaatt	28446131
ttcctgcctc	agctctcctg	aatagctggg	attacaggcg	tgtgtcacca	28446181
ccctagtcta	atttttgtac	ttttgttaga	agcaggattt	cagcatgttg	28446231
accaggctcg	tcttgaactc	ctggactcaa	gcgatctgcc	caccccagcc	28446281
tctcaaagtg	ctgggattat	aggtatgagc	caccgcgccc	agcctcattt	28446331
ggtctgttct	tgttctctca	gttctctgag	gtgtgacatt	aggttgtcaa	28446381
tttgtgatct	ttcagacttt	tctctctctc	tctctctctc	ttttttaaat	28446431
agagatgagg	tcttgctatg	ttatccaggc	tgggtcttgaa	ctcctgagct	28446481
caagcaatcc	tcctgccttg	gcctttcaaa	gtgctggggg	tataggcgtg	28446531
agtcaccatg	cctggctcaa	gacttcttga	tgtaggcatt	taacactata	28446581
aatttttccct	cttagcactg	cttttgctgt	atcccagagg	ttttgataac	28446631
ttgtgtcact	attattttatt	ttgaagaatt	tttaaatttc	cacgtgattt	28446681
cacttgttaa	ccgcagaaaa	tcattttnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	28446731
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	28446781
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnntaa	tttccagtga	tttcatttgt	28446831
aacccaaaaa	tcatttagaa	gcagatttgt	taatttccat	gtatttgtat	28446881
agttttgaag	gttccctttc	aagttgggtt	ctagttttat	tcgactgtgg	28446931
tctgagaaga	tacttgatat	gatttcaatt	tttttaaaat	tgagatttgt	28446981
tttgtgggtc	atcatatggt	ctatcttgga	gaatatttca	ggcactgatg	28447031
agaagattgt	atattctgca	gttctggagt	agatgttctg	taaataatgt	28447081
agttgatttg	ttctggagta	tagtatagg	ccagtgtttg	ttgactttct	28447131
gccttgatga	tctgtttgct	gttgtcagtg	gagtgtgaag	tcttccacta	28447181
tcattgtgtt	gctgtctttc	tcttttggtt	ggctctggtag	tagttgtttt	28447231
atgaatctgg	gagctccagt	tttaggtgca	tatatattta	ggattgtaat	28447281
atcttcttgt	tgggttgatc	cttttataat	tatataatag	ccttctttgt	28447331
ctttttttca	gtgttggtgc	tttaaattct	attttatttg	atataagaaa	28447381
agctactgct	gcttgcatth	ggcttccatt	tgtatggaat	atctttttcc	28447431
actcctttac	ctttagtcta	taagaagcct	cacatgttaa	gtgagtctct	28447481
tgaagatggc	agatatttg	tttgcgattt	atttatttat	ttattttatt	28447531
attgagacgg	aatctcgctc	tgtagctcag	gctggagtgc	agtggtgtga	28447581
tctcagctca	ctgtaacctc	tgccctcccg	gttcaagtga	ttctcctgcc	28447631
tcagcctccc	gagtagctgg	gactacaggc	acacaccacc	acacttggtc	28447681
aatttttgta	tttttagtag	agattttgca	acgttagcca	gactggtctt	28447731
gaattcctga	cctcaggtga	tccaccacc	tcagcctccc	caagtgcctg	28447781
gattacaggt	gtgagccact	gcgcccagcc	tgtgattttt	tttttttttt	28447831
tgagtggagt	atttagacca	tttacattga	atgttaatat	tgagatgtga	28447881
ggtactgtta	cagtcatcat	gttgatttgt	acctagatac	ttttcttctt	28447931
tcattacatt	attgttttat	aggccctgtg	agtttttatgc	tttcaagagg	28447981
ttctattctg	gtgcatgcca	accttttgtt	ttaagattta	gaactccttt	28448031
ttgcattttct	tgtagggtctg	gtctggtagt	gacaaattcc	ctcagcatgt	28448081

gcttgtctga	aaaagacttt	atcttctctt	cattcatgaa	acttagtttt	28448131
gttgataca	aaattcttga	ctaattgtta	ttctgcttaa	ggaggctaac	28448181
aataggaccc	caatcccttc	tgcagttgta	aggtttctgg	agagaaatcc	28448231
ttgtgaataa	aacaatccat	cttttctttt	tag		
			cttccac	caacactttc	28448281
ttccaaatat	cctgaagatg	accagacta	c <sup>18</sup> tgtgtgtgg	gtcccacctg	28448331
aag					
gtagatt	gtttttactt	ttttttcctc	taaggttcat	ttattttatat	28448381
ttttgaatag	gtaatataga	tttaaggttc	aacataagaa	agttacaaga	28448431
gtagtagtg	ataatttgta	taccatgttt	ggatccttat	tcaaacaac	28448481
aactgtttta	aaaaattatt	agccagtcag	ataattttga	acactacctg	28448531
gataattgat	gatactaaga	aattattttt	tattttttta	aagtgtgaat	28448581
gatgttgagt	tatgtttttt	ggaaaaagtc	cttgtcttct	aggaatatat	28448631
acggaagtgt	ttacaggtgt	aatgttatct	gggttttacc	aagtcaaaag	28448681
aaagggaaac	aattctggct	gtgcctcagc	tactcggttg	ttttcctcac	28448731
aagacaacca	attgttggtt	gtttcttatg	gatacttata	tataaaatgc	28448781
taagtagaga	ggagcatcta	tagaaaaaaa	atcataaaag	ttaacctgct	28448831
ggatcaaagg	tataaacatt	ttaaagatat	tataaattgc	attctataga	28448881
gattgtacca	gttttatgct	catacacaca	cccttaaagc	aatgtatgag	28448931
atacttactt	cctcatatgt	tcatcacagc	ttgagatttc	taatataatta	28448981
gtaactaata	taatttagtt	acttgagatg	tctgcttttt	ctatgctaac	28449031
aaatgttagg	gtagaaatga	aagagggctg	tattttgaaa	tttcatacaa	28449081
aaagtaaaat	ttctaccgta	gaataaacct	ttttgtctat	tttacttttt	28449131
ggcctactga	tatctggata	tcttttctct	cctgactttg	gaagagtaaa	28449181
taatgtattt	ctttttttat	attctgatct	ag		
			gtcaaagt	ggagatggca	28449231
gaacccatct	taatgacaag	tatggctatt	ga <sup>9</sup>		
			TTGCTTCA	GAATCCCAAA	28449281
AGAAAACCTT	GTGGACCATG	TGACATGGAA	TATTTGGGAT	AATGTATCAA	28449331
ATTGAATGGC	CAGAGAAGTT	TAGATGATTA	TTTGTAAGAT	CTGGTGAATG	28449381
GCTTTTCGTT	CTGTGTTCTT	GGCTTCCTAA	ATTTATCTGC	CCATATGATT	28449431
CTCATGCATT	TGATATTTAT	GTTTAAAAGT	GTTTATATAT	GTATGTAAAA	28449481
AGGGAACCAT	ATGTTTTGAG	AATTTGTAA	GTGAGAGACA	TGATCCTATT	28449531
AAAATAAGAA	GGC				
	aaaaatg	ttcctaatat	tttattttat	tttatttttt	28449581
ttaagagaca	gggtcttact	ctgtcaccta	ggctggggta	cagtgggtgca	28449631
atcctagctc	act				

MlsI

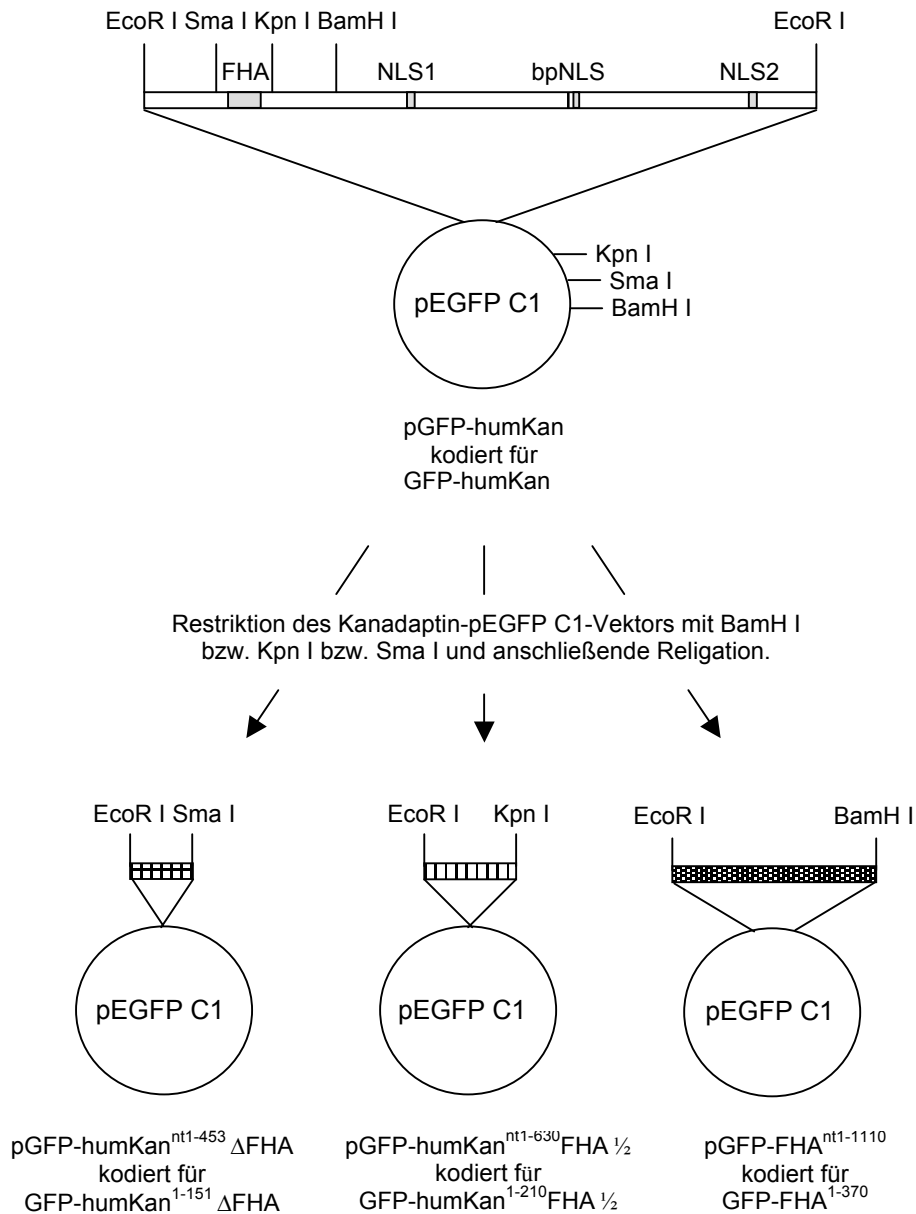
### III

## Klonierungsstrategie zur Herstellung der Expressionsvektoren phumKan-GFP, pGFP-humKan und phumKan



# IV

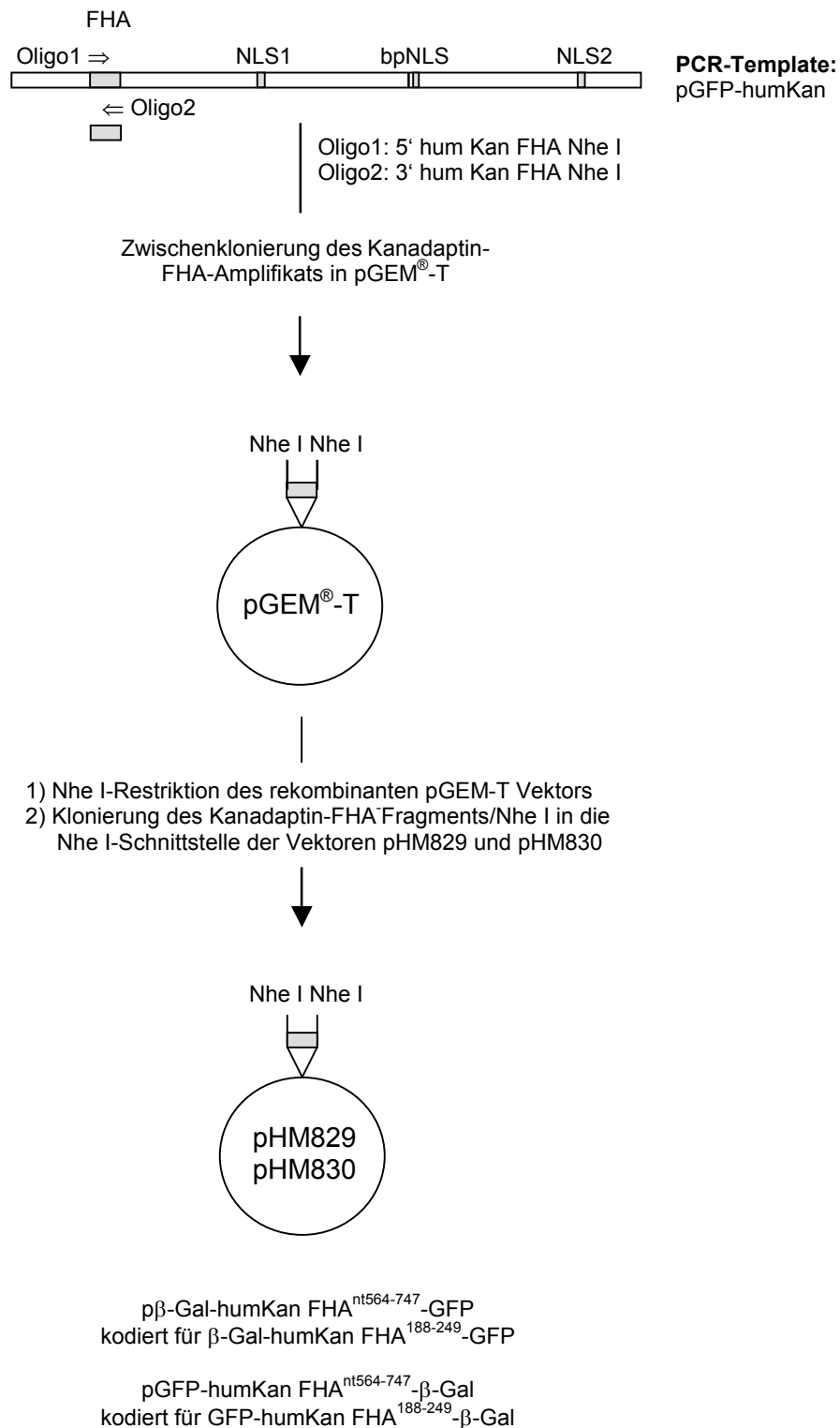
## Klonierungsstrategie zur Herstellung der Expressionsvektoren pGFP-FHA<sup>nt1-1110</sup>, pGFP-humKan<sup>nt1-630</sup>FHA<sup>1/2</sup>, pGFP-humKan<sup>nt1-453</sup>ΔFHA





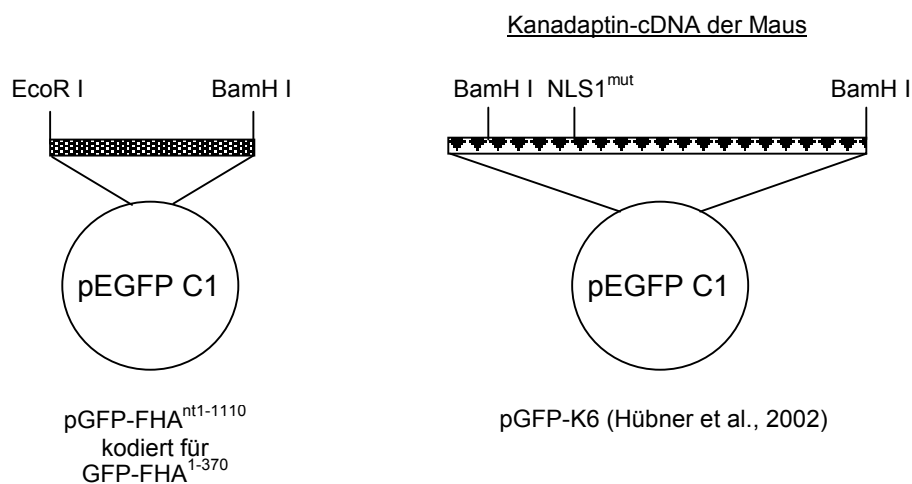
# V

## Klonierungsstrategie zur Herstellung der Expressionsvektoren p $\beta$ -Gal-humKan FHA<sup>nt564-747</sup>-GFP und pGFP-humKan FHA<sup>nt564-747</sup>- $\beta$ -Gal

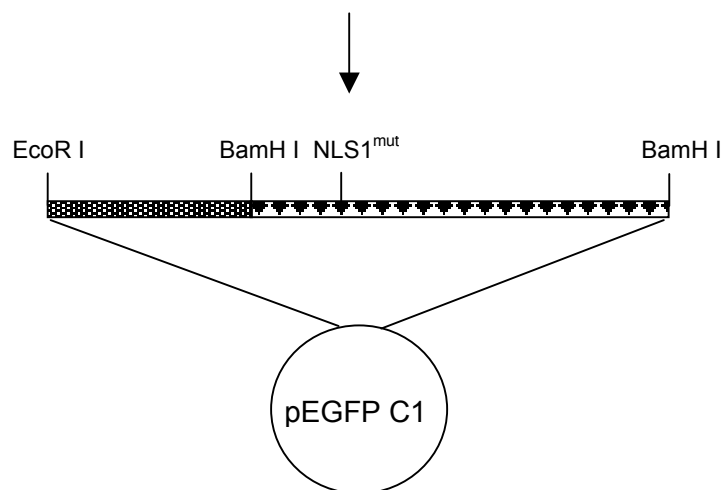


## VI

### Klonierungsstrategie zur Herstellung des Expressionsvektors pGFP-humKan<sup>nt1-789</sup>/mKan<sup>nt1-1521</sup> mit punktmutierter NLS1 (Arg<sup>191</sup>-Thr)



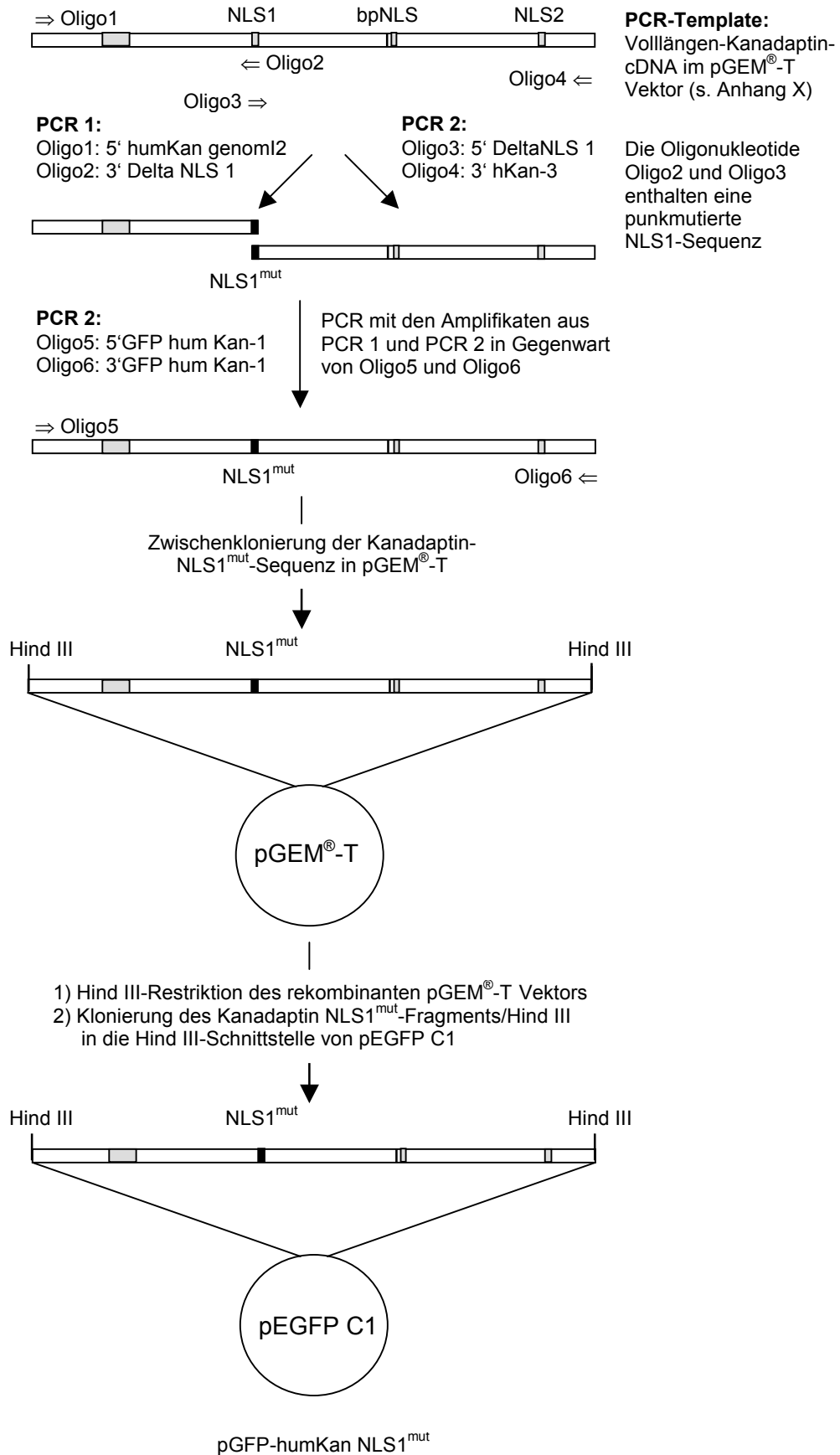
- 1) Restriktion beider Vektoren mit BamH I
- 2) Isolierung des DNA-Fragments/BamH I aus pGFP-K6
- 3) Klonierung des DNA-Fragments/BamH I aus pGFP-K6 in den pGFP-FHA<sup>nt1-1110</sup>/BamH I-Vektor.



pGFP-humKan<sup>nt1-789</sup>/mKan<sup>nt1-1521</sup> mit punktmutierter NLS1 (Arg<sup>191</sup>-Thr)  
(kodiert für aminoterminal GFP-konjugiertes Mensch<sup>1-263</sup>/Maus-  
Vollängen-Kanadaplin mit punktmutierter NLS1 (Arg<sup>191</sup>-Thr)

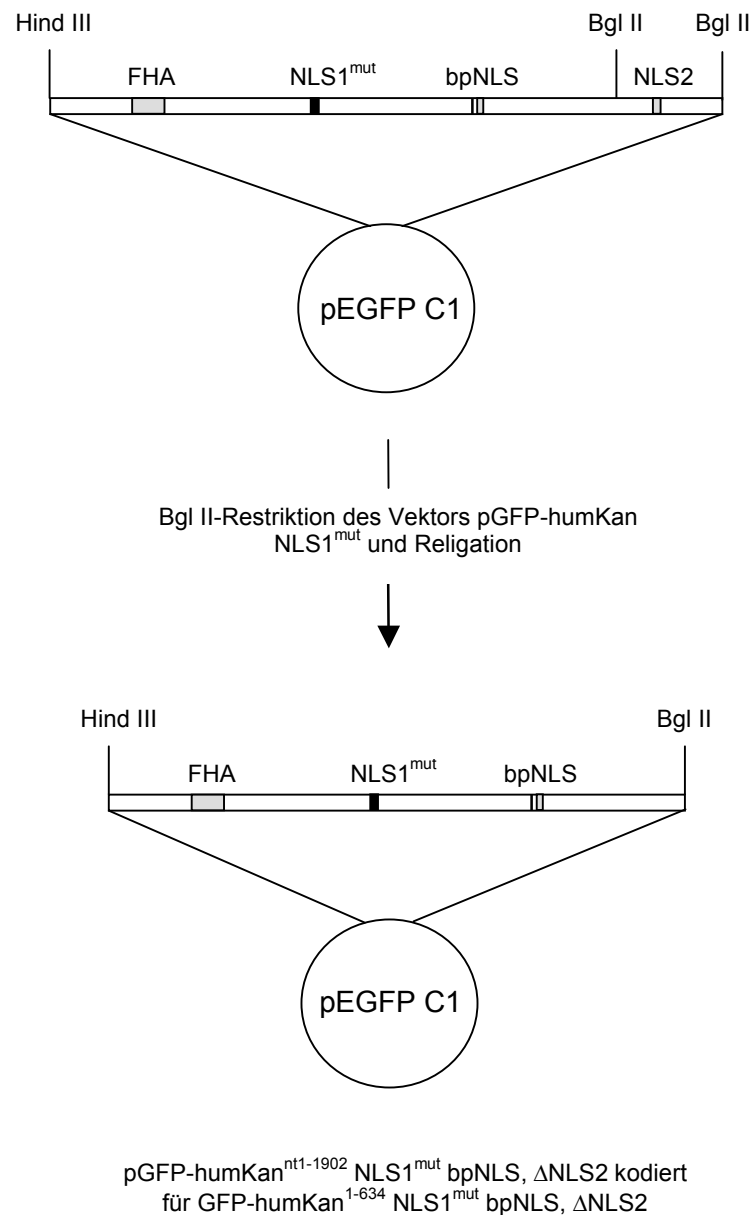
## VII

### Klonierungsstrategie zur Herstellung des Expressionsvektors pGFP-humKan NLS1<sup>mut</sup>



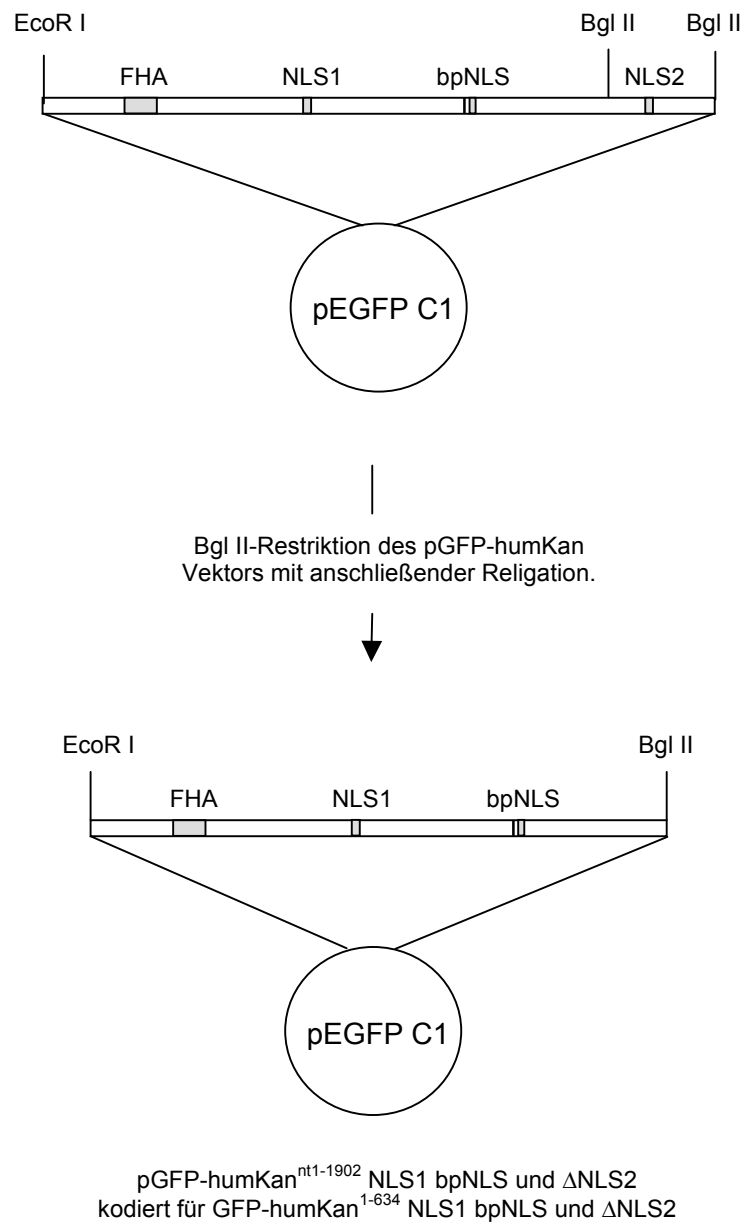
## VIII

### Klonierungsstrategie zur Herstellung der Expressionsvektoren pGFP-humKan<sup>nt1-1902</sup> NLS1<sup>mut</sup> bpNLS, ΔNLS2



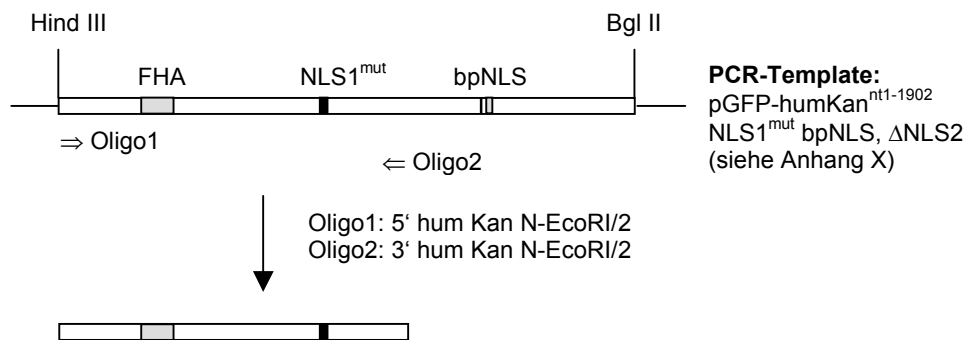
## IX

### Klonierungsstrategie zur Herstellung der Expressionsvektoren pGFP-humKan<sup>nt1-1902</sup> NLS1 bpNLS und $\Delta$ NLS2

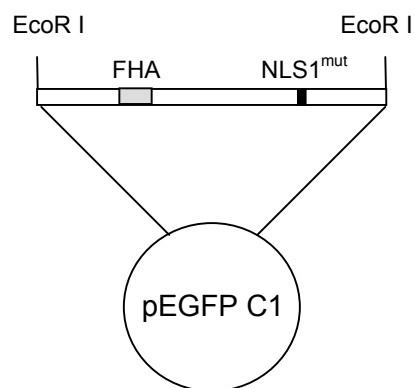


**X**

## Klonierungsstrategie zur Herstellung der Expressionsvektoren pGFP-humKan<sup>nt1-1716</sup>NLS1<sup>mut</sup>ΔbpNLS, ΔNLS2



- 1) Zwischenklonierung des humKan<sup>nt1-1716</sup>NLS1<sup>mut</sup>ΔbpNLS, ΔNLS2-Amplifikats in den pGEM<sup>®</sup>-T Vektor
- 2) EcoR I-Restriktion des rekombinanten pGEM<sup>®</sup>-T Vektors
- 3) Klonierung des humKan<sup>nt1-1716</sup>NLS1<sup>mut</sup>ΔbpNLS, ΔNLS2-Fragments in die EcoR I-Schnittstelle des pEGFP C1-Vektors



pGFP-humKan<sup>nt1-1716</sup>NLS1<sup>mut</sup>ΔbpNLS, ΔNLS2  
kodiert für GFP-humKan<sup>1-572</sup>NLS1<sup>mut</sup>ΔbpNLS,  
ΔNLS2