



Bayerische Julius-Maximilians-
Universität Würzburg
Fakultät für Biologie

Untersuchung des RNA-Kernexportes im Modellsystem *Xenopus laevis*

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

**vorgelegt von
Stefanie Glaser**

aus Straubing

Würzburg, 2008

Eingereicht am: 28. April 2008

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. M. J. Müller

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

2. Gutachter: Prof. Dr. S. Schneider-Schaulies

Tag des Promotionskolloquiums: 11. Februar 2009

Doktorurkunde ausgehändigt am:

INHALTSVERZEICHNIS

	INHALTSVERZEICHNIS	V
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Der Zellkern	1
1.1.1.	Die Entstehung des Zellkerns	1
1.1.2.	Strukturen des Zellkerns	2
1.2.	Transport durch die Kernporen	4
1.2.1.	Aufbau der Kernporenkomplexe (NPCs)	4
1.2.2.	Der Kernporenkomplex besteht aus Nukleoporinen	5
1.2.3.	Der Transport durch die Kernporen wird durch Transportfaktoren vermittelt	8
1.2.4.	Transportsubstrate werden an ihren Transportsignalen erkannt	10
1.2.5.	Kernimport	12
1.2.6.	Kernexport	12
1.2.7.	Energie beim Transport durch die Kernporen	20
1.2.8.	Export von CD83 mRNA	22
1.2.8.1.	Dendritische Zellen und der CD83 Oberflächenrezeptor	22
1.2.8.2.	Der eukaryotische Initiationsfaktor 5A (eIF5A) ist an der Reifung dendritischer Zellen beteiligt	22
1.2.8.3.	Das Shuttelprotein HuR, ein Mitglied der ELAV-Familie, bindet an CD83 mRNA und beeinflusst die CD83-Oberflächenexpression	25
1.2.9.	Transkription und Export sind miteinander gekoppelt	27
1.3.	Die Transkription	28
1.3.1.	Die RNA-Polymerase I-abhängige Transkription im Nukleolus	28
1.3.2.	Die RNA-Polymerase II-abhängige Transkription	30
1.3.3.	Die RNA-Polymerase III-abhängige Transkription	31
1.3.3.1.	Der Transkriptionsfaktor IIIA (TFIIIA)	32
1.3.4.	Aktin und Myosin	34
1.3.4.1.	Kernaktin	34
1.3.4.2.	Kernmyosin	36
1.3.4.3.	Aktin und Myosin wirken bei der Transkription	38
1.4.	<i>Xenopus laevis</i>	41
1.4.1.	Besonderheiten der Oozyten von <i>Xenopus laevis</i>	42

1.5.	Zielsetzung der Arbeit	46
2.	MATERIAL	49
2.1.	Biologisches Material	49
2.1.1.	Tiere	49
2.1.2.	Zelllinien	49
2.1.3.	Bakterienstämme	49
2.1.4.	Antikörper	50
2.2.	Molekularbiologisches Material	52
2.2.1.	Plasmidvektoren	52
2.2.2.	Oligonukleotide	57
2.2.3.	RNA	59
2.2.4.	Proteine	59
2.2.5.	Enzyme	59
2.2.6.	Kits	60
2.2.7.	Marker	60
2.3.	Chemikalien	61
2.4.	Material für die Zellkultur	61
2.5.	Verbrauchsmaterialien	61
2.6.	Geräte	62
2.7.	Computerprogramme und Internet-Seiten	63
2.8.	Datenbank-Eintragsnummern	64
3.	METHODEN	65
3.1.	Flüssigkultur von Bakterien	65
3.2.	Anlegen von Glycerinkulturen	65
3.3.	Plasmidisolation	65
3.4.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	66
3.5.	Fällung der DNA mit Natriumacetat und Ethanol	67
3.6.	DNA-Gelelektrophorese	67
3.7.	DNA-Sequenzierung	68
3.8.	RNA-Extraktion	69
3.9.	Reverse Transkription	71

3.10.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	71
3.11.	Gelextraktion	74
3.12.	Schneiden der DNA mit Restriktionsendonukleasen	74
3.13.	Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmide	75
3.14.	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	77
3.15.	Transformation	78
3.16.	Transfektion von somatischen Zellen mit Effectene (QIAGEN)	79
3.17.	Herstellung von markierter RNA durch <i>in-vitro</i>-Transkription	79
3.18.1.	RNA-Gelelektrophorese mit Agarosegelen	81
3.18.1.1.	Northern-Blot	81
3.18.2.	RNA-Acrylamid-Gelelektrophorese	83
3.19.	Herstellung rekombinanter Proteine in Bakterien	84
3.19.1.	Aufreinigung von GST-gekoppelten Proteinen	85
3.19.2.	Aufreinigung von His-gekoppelten Proteinen	86
3.19.3.	Bestimmung der Proteinkonzentration	89
3.20.	Eindimensionale Protein-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	90
3.20.1.	Western-Blot	93
3.20.2.	Renaturierung von Proteinen nach denaturierender SDS-Gelelektrophorese	94
3.20.3.	Immunblot	94
3.21.	Herstellung von Antikörpern	97
3.21.1.	Herstellung von monoklonalen Antikörpern	97
3.21.2.	Herstellung polyklonaler Antikörper	99
3.21.2.1.	Affinitätsreinigung	99
3.22.	Overlay-Blot-Assay	101
3.23.	Zellkultur	102
3.24.	Trennung von Zellkern und Zytoplasma somatischer adhärenter Zellen	102
3.25.	Entnahme von <i>Xenopus laevis</i>-Ovar	103
3.25.1.	Manuelle Isolation von Oozytenkompartimenten und Fällung der Proteine	104
3.26.	Isolation von Proteinen mit peqGOLD TriFast (PEQLAB, Erlangen)	105
3.27.	Behandlung von Zellen mit Actinomycin D (AMD)	106
3.28.	Behandlung von Zellen mit Leptomycin B	106
3.29.	Mikroinjektion in <i>Xenopus laevis</i>-Oozyten	106

3.30.	Mikroinjektion in somatische Zellen	108
3.31.	Immunfluoreszenz	109
3.31.1.	Immunlokalisation von Proteinen	109
3.31.1.1.	Immunfluoreszenz in somatischen Zellen	109
3.31.1.2.	Anfertigung von Ovar-Gefrierschnitten	109
3.31.1.3.	Immunfluoreszenz auf Ovar-Gefrierschnitten	110
3.32.	Bromuridintriphosphat-Einbau	114
3.33.	Präparation von Lampenbürstenchromosomen	116
3.34.	Immunfluoreszenz in amplifizierten Nucleolen aus <i>Xenopus</i>-Oozyten	118
3.35.	Fluoreszenzmikroskopie	119
3.36.	Konfokale Laserscan Mikroskopie	119
3.37.	Elektronenmikroskopie	120
4.	ERGEBNISSE	125
4.1.	Export von CD83 mRNA	125
4.1.1.	Das HuR-Response-Element (HRE) ist für den Export von CD83-Transkripten essentiell	125
4.1.2.	HuR, eIF5A und CRM1 sind am Export von CD83 mRNA beteiligt	127
4.1.3.	Am Export von humaner CD83 mRNA beteiligte Faktoren haben Homologe bei <i>Xenopus laevis</i>	128
4.1.4.	Leucinreiche Sequenzen bei HuR, APRIL, PP32 und den <i>Xenopus</i> -Homologen	130
4.1.5.	XAPRIL und XPP32 werden CRM1-vermittelt exportiert	133
4.1.6.	ElrA ist ein Interaktionspartner von eIF5A	135
4.1.7.	Die CD83 mRNA enthält kein putatives eIF5A-Erkennungsmotiv	137
4.2.	Export von oozytentypischem Transkriptionsfaktor IIIA (TFIIIA) in Oozyten von <i>Xenopus laevis</i>	138
4.2.1.	TFIIIA ist an der Kernhülle lokalisiert	138
4.2.2.	TFIIIA wird mithilfe des Exportrezeptors CRM1 exportiert	140
4.2.3.	eIF5A ist am Export von TFIIIA beteiligt	144
4.3.	Funktion von Kernmyosin IC bei Export und Transkription	147
4.3.1.	Identifikation von Kernmyosin IC im Modellorganismus <i>Xenopus laevis</i>	147
4.3.2.	Der Aminoterminus von Kernmyosin IC ist für die Kernlokalisation verantwortlich	152

4.3.3.	Lokalisation des <i>Xenopus laevis</i> -Kernmysins IC in somatischen Zellen und Oozyten	153
4.3.4.	Kernmyosin ist an Exportprozessen beteiligt	164
4.3.5.	Kernmyosin IC ist bei der Transkription beteiligt	166
4.3.5.1.	Kernmyosin ist an der RNA-Polymerase I-abhängigen Transkription im Nukleolus beteiligt	166
4.3.5.2.	Kernmyosin IC ist ein essentieller Faktor bei der RNA-Polymerase II-abhängigen Transkription	180
5.	ANHANG	187
6.	DISKUSSION	197
6.1.	Die HRE-Sekundärstruktur und die Proteine HuR und eIF5A werden für den CRM1-vermittelten Export der CD83 mRNA benötigt	198
6.2.	eIF5A ist am Export von TFIIIA in <i>Xenopus</i>-Oozyten beteiligt	203
6.3.	Kernmyosin IC ist in <i>Xenopus laevis</i> für die Transkription ribosomaler und proteinkodierender Transkripte essentiell und beeinflusst möglicherweise Exportprozesse	204
7.	ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	215
8.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	219
9.	LITERATURVERZEICHNIS	227
10.	DANKSAGUNG	243
11.	LEBENS LAUF	245

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1.	Kerndomänen und ihre Darstellung in der Immunfluoreszenz	2
Abb. 1.2.	Konsensusmodell einer Kernpore	5
Abb. 1.3.	Kernporen einer <i>Xenopus</i> -Oozyte	5
Abb. 1.4.	Lage der Nukleoporinsubkomplexe und bekannte Interaktionen	6
Abb. 1.5.	Modell für die Verflechtung von Spleißen und Export der mRNA in Metazoen	16
Abb. 1.6.	EJC- und Exportfaktor-Rekrutierung	17
Abb. 1.7.	HIV-1 mRNA-Export	19
Abb. 1.8.	Export von zellulärer mRNA und HIV-1-mRNA	20
Abb. 1.9.	Übersicht über die Beteiligung von Ran-GDP und Ran-GTP beim Import und Export	21
Abb 1.10.	Organisation einer rDNA-Transkriptionseinheit	29
Abb. 1.11.	Die Bildung des Polymerase I-Initiationskomplexes	30
Abb. 1.12.	Schematische Darstellung von Aktin und Kernmyosin IC im Polymerase-I-Transkriptionskomplex (nach Grummt, 2006).	40
Abb. 1.13.	Weibliches Exemplar eines <i>Xenopus laevis</i>	42
Abb. 1.14.	Lampenbürstenchromosomen von <i>Xenopus laevis</i>	43
Abb. 1.15.	Amplifizierte Nukleolen von <i>Xenopus laevis</i>	44
Abb. 2.1.	Multiple Klonierungsstelle im pCR 2.1 TOPO-Vektor	52
Abb. 2.2.	Multiple Klonierungsstelle im pGEX-Vektor	53
Abb. 2.3.	Multiple Klonierungsstelle im pcDNA3-Vektor	54
Abb. 2.4.	Multiple Klonierungsstelle im pEGFP-Vektor	55
Abb. 4.1.1.	Das HuR Response Element ist für den Export der CD83 mRNA essentiell	126
Abb. 4.1.2.	Der Export der CD83-HRE-RNA (HRE-Domäne) wird durch ELAV-Antikörper und eIF5A-Antikörper inhibiert	127
Abb. 4.1.3.	Der Export der CD83-HRE-RNA (HRE-Domäne) wird durch Leptomycin B inhibiert	128
Abb. 4.1.4.	Sequenzvergleich von APRIL bei <i>Homo sapiens</i> und <i>Xenopus laevis</i>	129
Abb. 4.1.5.	Sequenzvergleich von PP32 (<i>Homo sapiens</i>) und dem <i>Xenopus</i> -Äquivalent XPP32	129
Abb. 4.1.6.	Lage von leucinreicher, NES-ähnlicher Sequenz und HNS bei HuR und ElrA	132

Abb. 4.1.7.	Dreidimensionales Modell von HuR/ElrA.	132
Abb. 4.1.8.	EGFP-Fusionsproteine von ElrA, XAPRIL und XPP32 sind im Zellkern von XTC-Zellen lokalisiert	133
Abb. 4.1.9.	Der Export von XPP32 ist durch Leptomycin B (LMB) hemmbar	134
Abb. 4.1.10.	XAPRIL interagiert mit CRM1	135
Abb. 4.1.11.	ElrA interagiert mit eIF5A	136
Abb. 4.1.12.	eIF5A interagiert mit CRM1	137
Abb. 4.2.1.	Lokalisation von TFIIIA und Nup62 in <i>Xenopus</i> -Oozyten	139
Abb. 4.2.2.	Der monoklonale TFIIIA-Antikörper erkennt ein 38 kDa großes Protein in der Zytoplasma-, Kern- und Kernhüllenfraktion	139
Abb. 4.2.3.	Lokalisation von TFIIIA an den nukleoplasmatischen Filamenten der Kernporenkomplexe von <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten.	140
Abb. 4.2.4.	Lokalisation von TFIIIA und CRM1 in <i>Xenopus</i> -Oozyten.	141
Abb. 4.2.5.	Lokalisation von TFIIIA und CRM1 an Kernporenkomplexen von <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten	141
Abb. 4.2.6.	Der Export von rekombinantem GST-TFIIIA-NES und endogenem TFIIIA ist durch Leptomycin B hemmbar	143
Abb. 4.2.7.	Das rekombinante TFIIIA-His6 ist exportkompetent	144
Abb. 4.2.8.	Lokalisation von TFIIIA und eIF5A in <i>Xenopus</i> -Oozyten	145
Abb. 4.2.9.	TFIIIA interagiert mit eIF5A	145
Abb. 4.2.10.	Der Export von GST-TFIIIA-NES und endogenem TFIIIA wird durch eIF5A-Antikörper inhibiert	146
Abb. 4.3.1.	Multiples Alignment der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen des Kernmyosin IC-Aminoterminus verschiedener Spezies zeigt die evolutionäre Konservierung	149
Abb. 4.3.2.	Alignment von Myosin IC und Kernmyosin IC bei <i>Xenopus laevis</i>	149
Abb. 4.3.3.	Multiples Alignment von Kernmyosin IC bei Maus, Mensch und <i>Xenopus laevis</i>	150
Abb. 4.3.4.	Schematische Darstellung des Kernmyosin IC und Myosin IC von <i>Xenopus laevis</i>	152
Abb. 4.3.5.	Der Aminoterminus von Kernmyosin IC ist für die nukleäre Lokalisation verantwortlich	153
Abb. 4.3.6.	Immunfluoreszenz mit dem polyklonalen Serum α -NM IC in somatischen humanen Zellen und <i>Xenopus</i> -Zellen	154
Abb. 4.3.7.	Der polyklonale Antikörper α -NM IC erkennt ein 120 kDa großes Protein in der Kern- und Zytoplasmafraktion humaner Zellen	154
Abb. 4.3.8.	Amplifikat von XNMIC-trunc aus der cDNA von XTC-Zellen	155

Abb. 4.3.9.	Monoklonale und polyklonale Antikörper gegen <i>Xenopus laevis</i> -Kernmyosin IC (XNMIC).	156
Abb. 4.3.10.	Lokalisation von <i>Xenopus</i> -Kernmyosin IC auf somatischen XTC-Zellen mit dem monoklonalen Antikörper XNMIC #54	157
Abb. 4.3.11.	Lokalisation von <i>Xenopus</i> -Kernmyosin IC durch den monoklonalen Antikörper XNMIC #54 an der Kernhülle und dem Balbiani-Körper auf Gefrierschnitten von <i>Xenopus</i> -Oozyten	158
Abb. 4.3.12.	Lokalisation von <i>Xenopus</i> -Kernmyosin IC und dem Kernhüllenprotein Nup62 auf somatischen XTC-Zellen	159
Abb. 4.3.13.	Lokalisation von <i>Xenopus</i> -Kernmyosin IC in somatischen XTC-Zellen mit dem polyklonalen Antikörper XNMIC gp30	160
Abb. 4.3.14.	Lokalisation von <i>Xenopus</i> -Kernmyosin IC durch den polyklonalen Antikörper XNMIC gp30 an der Kernhülle und der mitochondrialen Wolke auf Gefrierschnitten von Oozyten	161
Abb. 4.3.15.	Lokalisation von <i>Xenopus</i> -Kernmyosin IC in somatischen XTC-Zellen mit dem monoklonalen Antikörper XNMIC #42	162
Abb. 4.3.16.	Lokalisation von <i>Xenopus</i> -Kernmyosin IC durch den monoklonalen Antikörper XNMIC #42 an der Kernhülle und der mitochondrialen Wolke auf Gefrierschnitten von Oozyten	162
Abb. 4.3.17.	Der polyklonale Kernmyosin-Antikörper XNMIC gp30 erkennt ein 120 kDa großes Protein in der Kern-, Kernhüllen- und Kerninhaltfraktion	163
Abb. 4.3.18.	<i>Xenopus laevis</i> -Kernmyosin IC ist an den nukleoplasmatischen Filamenten der Kernporenkomplexe lokalisiert	164
Abb. 4.3.19.	Der Export von rekombinantem GST-TFIIIA-NES ist durch den Myosinantikörper XNMIC #42, nicht aber durch den Antikörper XNMIC #54 hemmbar	165
Abb. 4.3.20.	Doppelimmunfluoreszenz von <i>Xenopus</i> -Kernmyosin IC und nukleolären Proteinen in somatischen XTC-Zellen	167
Abb. 4.3.21.	Doppelimmunfluoreszenz von <i>Xenopus</i> -Kernmyosin IC und RNA-Polymerase I in Mitosezellen	168
Abb. 4.3.22.	Doppelimmunfluoreszenz von <i>Xenopus</i> -Kernmyosin IC und nukleolären Proteinen in amplifizierten Nukleolen	169
Abb. 4.3.23.	Doppelimmunfluoreszenz von Kernmyosin IC und nukleolären Proteinen in Actinomycin D-behandelten amplifizierten Nukleolen.	170
Abb. 4.3.24.	Die Mikroinjektion von Kernmyosin-IC-Antikörpern führt zu einem massivem Umbau der amplifizierten Nukleolen	172

Abb. 4.3.25.	Die Mikroinjektion von <i>Xenopus</i> -Kernmyosin IC-Antikörpern führt zu einem massivem Umbau der amplifizierten Nukleolen	173
Abb. 4.3.26.	Actinomycin D-Behandlung führt zur Hemmung der Transkription und dadurch zur Segregation der Nukleolen	174
Abb. 4.3.27.	Darstellung des nukleolären Proteins B23 durch indirekte Immunfluoreszenz in somatischen XTC-Zellen	175
Abb. 4.3.28.	Die Mikroinjektion von <i>Xenopus</i> -Kernmyosin IC-Antikörpern führt zu einem massiven Umbau der amplifizierten Nukleolen	176
Abb. 4.3.29.	Die Mikroinjektion von <i>Xenopus</i> -Kernmyosin IC-Antikörpern führt zu einem massivem Umbau nativer amplifizierter Nukleolen	177
Abb. 4.3.30.	Die Mikroinjektion von <i>Xenopus</i> -Kernmyosin IC-Antikörpern führt zu einem massivem Umbau der amplifizierten Nukleolen, wobei aber noch ein BrUTP-Einbau als Ausdruck der Transkription möglich war	179
Abb. 4.3.31.	Mikroinjektion von Kernmyosin IC-Antikörpern führt zur Hemmung der Transkription in somatischen Zellen	180
Abb. 4.3.32.	Kernmyosin IC lokalisiert an den lateralen transkriptionell aktiven Schleifen von Lampenbürstenchromosomen	181
Abb. 4.3.33.	Kernmyosin IC und RNA-Polymerase II zeigen an Lampenbürstenchromosomen eine Lokalisation an den transkriptionell aktiven lateralen Schleifen	182
Abb. 4.3.34.	Kernmyosin IC kolokalisiert mit der Transkription proteinkodierender Gene an den lateralen transkriptionell aktiven Schleifen von Lampenbürstenchromosomen	183
Abb. 4.3.35.	Kernmyosin IC ist nach Transkriptionshemmung nicht mehr am Chromosom nachweisbar	184
Abb. 4.3.36.	Kernmyosin IC-Antikörper führen zur Retraktion der lateralen Schleifen der Lampenbürstenchromosomen und zur Kondensation der DNA	185
Abb. 4.3.37.	Kernmyosin IC-Antikörper führen zur Hemmung der Transkription proteinkodierender Gene	186
Abb. 5.1.	5'- und 3'-untranslatierte Region und kodierende Sequenz von CD83 mit dem HuR-Response-Element	187
Abb. 5.2.	Proteinsequenzvergleich von CRM1/Exportin1/XPO1 bei <i>Homo sapiens</i> , <i>Mus musculus</i> und <i>Xenopus laevis</i>	188
Abb. 5.3.	Sequenzvergleich von Ran/XRan bei <i>Homo sapiens</i> und <i>Xenopus laevis</i>	189
Abb. 5.4.	Sequenzvergleich von RanBP3 bei <i>Homo sapiens</i> und <i>Xenopus laevis</i>	190
Abb. 5.5.	Sequenzvergleich von eIF5A bei <i>Homo sapiens</i> und <i>Xenopus laevis</i>	191

Abb. 5.6.	Sequenzvergleich von β -Aktin bei <i>Homo sapiens</i> und <i>Xenopus laevis</i>	191
Abb. 5.7.	<i>Xenopus laevis</i> -Transkriptionsfaktor IIIA (TFIIIA)	192
Abb. 5.8.	Sequenzvergleich der 5S rDNA vom somatischen und Oozyten-Typ bei <i>Xenopus laevis</i>	192
Abb. 5.9.	Multiples Alignment der Myosin I-Familie des Menschen	193
Abb. 6.1.	Schematische Darstellung eines CD83-HRE-RNA-Exportkomplexes	202

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1.1.	Die Transportfaktoren und ihre Substrate	9
Tab. 1.2.	Beispiele für Import- und Exportsignale und für Shuttelsignale	11
Tab. 1.3.	Einordnung von <i>Xenopus laevis</i> im Tierreich	42
Tab. 2.1.	Primäre Antikörper	50
Tab. 2.2.	Sekundäre Antikörper	51
Tab. 2.3.	Plasmide mit einklonierter DNA	56
Tab. 2.4.	Plasmide mit einklonierter DNA (J. Hauber, A. Prectel, Hamburg)	56
Tab. 2.5.	Insertprimer	57
Tab. 2.6.	Sequenzierprimer	58
Tab. 2.7.	“High”- und “Low- Range”- Marker, BIO-RAD, München	61
Tab. 2.8.	Datenbank-Eintragsnummern. Accession number und GenInfo Identifier	64
Tab. 3.1.	Agarosekonzentration und optimaler Trennbereich	68
Tab. 3.2.	Standard-Sequenzier-PCR	69
Tab. 3.3.	Taq- bzw. Pfu-Polymerase Standard-PCR	73
Tab. 3.4.	Phusion-Polymerase Standard-PCR	74
Tab. 3.5.	Restriktionsendonukleasen	75
Tab. 3.6.	Aufreinigung von His-gekoppelten Proteinen unter nicht denaturierenden Bedingungen	87
Tab. 3.7.	Aufreinigung von His-gekoppelten Proteinen unter denaturierenden Bedingungen	88
Tab. 3.8.	Zusammensetzung des Trenngels für 2 Minigele und 2 große Gele	91
Tab. 3.9.	Zusammensetzung des Sammelgels für 2 Minigele und 2 große Gele	91
Tab. 3.10.	Aufbau eines Western-Blots	93

Tab. 3.11.	Primäre und sekundäre Antikörper für den Immunblot	96
Tab. 3.12.	Waschschritte bei der Affinitätsreinigung	100
Tab. 3.13.	Injektionsdrücke für die Mikroinjektion in somatische Zellen	108
Tab. 3.14.	Primärantikörper für die Immunfluoreszenz in somatischen Zellen	111
Tab. 3.15.	Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz in somatischen Zellen	111
Tab. 3.16.	Primärantikörper für die Immunfluoreszenz auf Oozyten-Gefrierschnitten	113
Tab. 3.17.	Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz auf Oozyten-Gefrierschnitten	114
Tab. 3.18.	Antikörper für den Nachweis von BrUTP in somatischen Zellen	115
Tab. 3.19.	Antikörper für den Nachweis von BrUTP in Oozyten	116
Tab. 3.20.	Primärantikörper für die Immunfluoreszenz auf Lampenbürstenchromosomen	118
Tab. 3.21.	Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz auf Lampenbürstenchromosomen	118
Tab. 3.22.	Primärantikörper für die Immunfluoreszenz in amplifizierten Nukleolen	118
Tab. 3.23.	Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz in amplifizierten Nukleolen	119
Tab. 3.24.	Laser für die konfokale Laserscan Mikroskopie	119
Tab. 3.25.	Primärantikörper für die Elektronenmikroskopie	122
Tab. 3.26.	Sekundärantikörper für die Elektronenmikroskopie	122
Tab 4.1.	Vergleich der Aminosäuresequenzen von humanen Proteinen, die beim Export von CD83 mRNA möglicherweise eine Rolle spielen, mit den Homologen bei <i>Xenopus laevis</i>	130
Tab. 4.2.	Vergleich verschiedener leucinreicher Sequenzen in den humanen Proteinen HuR, APRIL und PP32 und ihren <i>Xenopus</i> -Homologen mit dem Prototyp im HIV-1-Rev-Protein	131
Tab. 4.3.1.	Sequenzvergleich des humanen Myosin IC mit den Mitgliedern der Myosin I-Familie	147
Tab. 4.3.2.	Sequenzvergleich des Kernmyosin IC von Mensch, Maus und glattem Krallenfrosch	152
Tab. 8.1.	Abkürzungen der Aminosäuren	225

1. EINLEITUNG

Im Gegensatz zu Prokaryoten (Eubakterien und Archaeobakterien) besitzen eukaryotische Zellen einen Zellkern. Franz Bauer (1802) war der erste, der dieses Zellorganell beschrieben hat (Dundr und Misteli, 2001). Im Jahre 1825 entdeckte Jan Evangelista Purkinje in Hühneroozyten transparente flüssigkeitsgefüllte Kugeln, welche er *vesicula germinativa* (Keimbläschen, *germinal vesicles*) nannte (Purkinje, 1830). Wenige Jahre später fand Robert Brown ähnliche aber kleinere Vesikel in Pflanzenzellen und gab ihnen den Namen „*nucleus*“ (Kern) (Brown, 1833).

1.1. Der Zellkern

In eukaryotischen Zellen ist die Transkription im Zellkern von der Translation im Zytoplasma räumlich getrennt. Dies ermöglicht die Regulierung der Genexpression sowie der Qualitätskontrolle der Transkripte. Allerdings stellt die Kernhülle für Moleküle eine Barriere dar, die meist nur durch einen energieverbrauchenden Transport überwunden werden kann. Die Entstehung des Zellkerns gibt nach wie vor Rätsel auf und ist Gegenstand kontroverser Diskussionen.

1.1.1. Die Entstehung des Zellkerns

Zur Herkunft des Zellkerns gibt es derzeit drei kontrovers diskutierte Hypothesen (Pennisi, 2004):

Eine Hypothese besagt, der Zellkern sei durch die Symbiose eines Archebakteriums in einem gram-negativen Eubakterium entstanden (Ribeiro und Golding, 1998; Lopez-Garcia und Moreira, 1999). Vergleichende Genom- und Proteinanalysen zeigten eine Mosaikstruktur der Eukaryotengenome. Eukaryotengene, die mit Transkription, Replikation, Zellzyklusfunktionen, Zellkernarchitektur oder Ribosomengenes in Verbindung stehen, sind den Genen von Archebakterien ähnlicher als entsprechende Bakteriengene. Umgekehrt verhielt es sich mit Genen, die in zytoplasmatische Funktionen wie Metabolismus, Stressantwort, Entgiftung und Protein- und Ionentransport involviert sind. Sie sind den bakteriellen Genen ähnlicher (Gupta, 1998; Horiike et al., 2004). Die Kernhülle könnte durch Einstülpungen der Wirtszellmembran entstanden sein, nachdem das Archebakterium seine Zellmembran verloren hat (Gupta, 1998).

Eine andere Hypothese geht davon aus, der Zellkern sei bereits vor der Abspaltung der drei großen Reiche Eukaryoten, Archebakterien und Eubakterien entstanden. Die meisten Prokaryoten hätten den Zellkern jedoch verloren. Tatsächlich existieren Bakterien, die zellkernähnliche Strukturen aufweisen. Bei *Gemmata obscuriglobus*, einem Planctomyceten, wurde ein mit einer Doppelmembran umschlossener Bereich detektiert, welcher RNA und DNA mit RNA- und DNA-prozessierenden Proteinen enthielt. Neben kernporenähnlichen Strukturen in der Doppelmembran konnten erste Hinweise auf Nukleoporingene gefunden werden (Pennisi, 2004; Fuerst, 2005).

Die Hypothese der viralen Eukaryogenese geht von einer Entstehung der Eukaryoten durch drei phylogenetisch nicht verwandte Organismen aus. Ein lysogenes, Pockenvirus-ähnliches DNA-Virus

wurde zum Zellkern in der Archea-Wirtszelle, ein α -Proteobakterium zum Mitochondrium. Infolge der dauerhaften Lysogenie konnte die Komplexität des Virusgenoms durch Aufnahme von Genen des Archebakteriums und des α -Proteobakterium erhöht werden, während das Genom der Wirtszelle und des Mitochondriumvorläufers reduziert wurde. Diese Hypothese wird durch viele Gemeinsamkeiten von bestimmten großen DNA-Viren und den eukaryotischen Zellkernen gestützt. Beide besitzen zum Beispiel ein membranumgrenztes DNA-Genom aus linearen Chromosomen mit Telomeren und bilden mRNAs mit Kappen, die in das Zytoplasma zur Translation ausgeschleust werden (Bell, 2006).

1.1.2. Strukturen des Zellkerns

Der Zellkern ist ein hochdynamisches membranbegrenztes Zellorganell und enthält neben dem Chromatin weitere Kerndomänen wie Nukleoli und eine Fülle von Kernkörperchen, die durch technische Verfeinerungen vor allem der Fluoreszenzmikroskopie zunehmend identifiziert und charakterisiert werden. In der Abbildung 1.1. (Spector, 2001) sind fluoreszenzmikroskopische Darstellungen ausgewählter Zellkernbestandteile gezeigt.

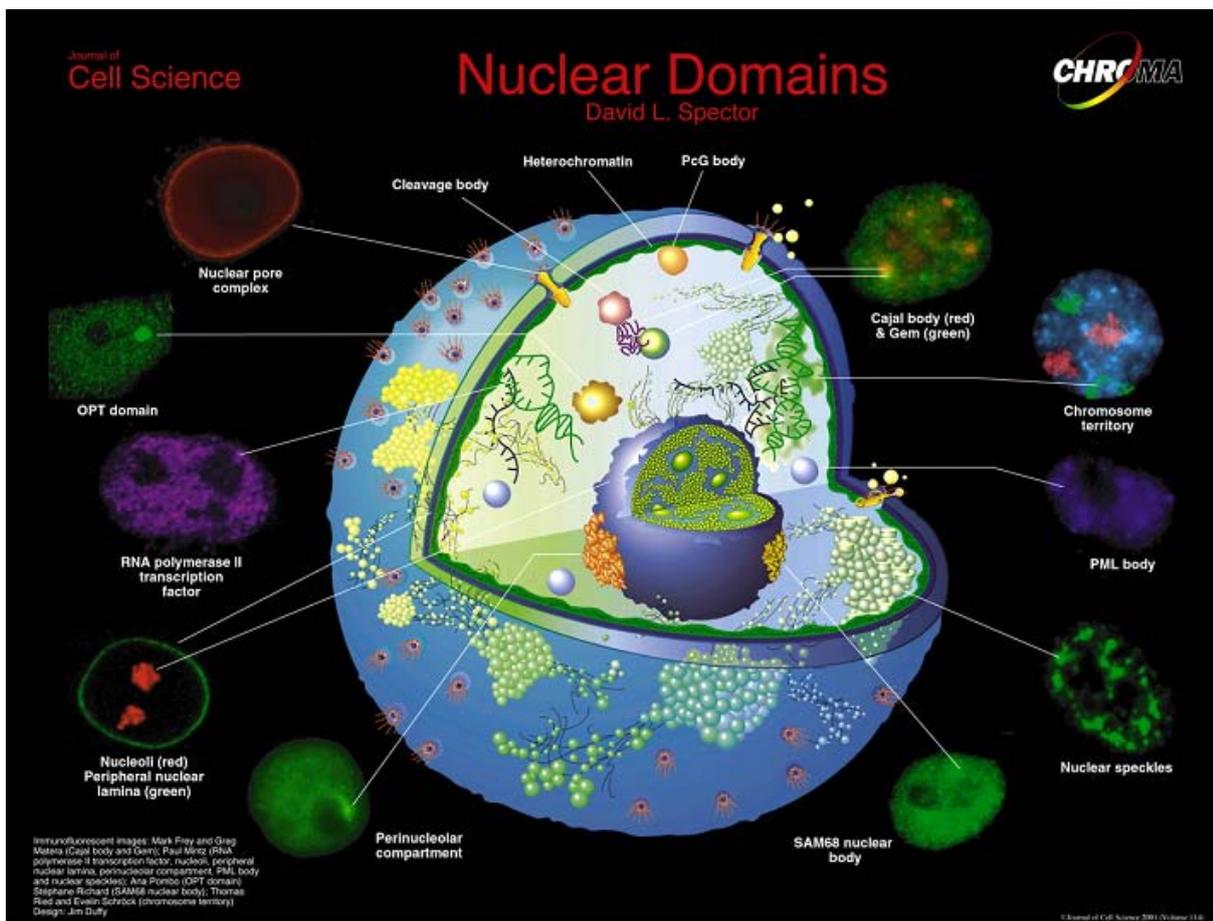


Abb. 1.1.: Kerndomänen und ihre Darstellung in der Immunfluoreszenz (Spector, 2001).

Begrenzt wird der Zellkern von der Kernhülle, einer Doppelmembran aus äußerer und innerer Kernmembran und den Kernporen. Die äußere Kernmembran geht in das endoplasmatische Retikulum über und ist oft mit Ribosomen besetzt. Assoziiert mit der inneren Kernmembran ist die Kernlamina, die aus den Laminen A/C und B besteht. Die Lamine gehören zur Familie der Intermediärfilamente und spielen beispielsweise beim Aufbau der Kernhülle und bei der Organisation des Interphasenchromatins eine Rolle (Krohne et al., 2005). Die Kernporenkomplexe (siehe 1.2.1.), ungefähr 40 Millionen Kernporen in *Xenopus*-Oozyten und wenige Tausend in somatischen Säugerzellen, sind in die Kernhülle eingebettet (Scheer et al., 2005). Sie erlauben einen Stoffaustausch zwischen Kern und Zytoplasma.

Die Chromosomen sind in so genannten Chromosomenterritorien lokalisiert (Cremer et al., 2006). Der Begriff Chromosomenterritorium geht auf Theodor Boveri (1909) zurück. Aktive und inaktive Gene lokalisieren eher an der Oberfläche, nichtkodierende Sequenzen im inneren der Chromosomenterritorien (Kurz et al., 1996, Verschure et al., 1999). Außerdem sind genreiche Chromosomen sowie genreiche Chromosomenabschnitte mehr im Kerninneren, genärmere in der Peripherie zu finden (Boyle et al., 2001; Sadoni, 1999). Hierzu passt der Befund, dass in weiblichen Zellen das transkriptionell inaktive X-Chromosom („Barr-Körperchen“) in der Zellkernperipherie zu finden ist (Barr und Bertram, 1949; Lyon, 1961).

Der Nukleolus (siehe 1.3.1.1.) ist der Ort der rRNA-Synthese, rRNA-Prozessierung und Zusammenbau der Präribosomenuntereinheiten. Er besteht aus dem fibrillären Zentrum (FC), der dichten fibrillären Komponente (DFC) und der granulären Komponente (GC) (Scheer und Hock, 1999). In menschlichen Zellen existieren etwa 150 bis 200 Kopien der rDNA im haploiden Genom (Schwarzacher und Mosgoeller, 2000) an den Nukleolus-Organisator-Regionen (NORs) der akrozentrischen Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22. Neben seiner Aufgabe als Ribosomenfabrik nimmt er Aufgaben bei der Kontrolle des Zellzyklus, der Biogenese von Ribonukleoproteinpartikel, der Regulation von Tumorsuppressor- und Onkogenaktivitäten und der Zellalterung wahr (Pederson und Politz, 2000; Olson und Dundr, 2005).

Die Cajal-Körperchen sind benannt nach ihrem Erstbeschreiber, Santiago Ramón y Cajal (1903), der sie als kleine sphärische Körperchen im Zellkern von Neuronen entdeckte. Ihre Aufgabe ist die Vorbereitung von RNA-Transkriptions- und Prozessierungskomplexen, bevor diese zu den Speckles, Chromosomen und Nukleolen transportiert werden. Neben vielen anderen Faktoren findet man in den Cajal-Körperchen p80-Coilin (Andrade et al., 1991; Wu et al., 1994), RNA-Polymerase I, II und III, TFIIIA (Gall et al., 1999), snRNP- und snoRNP-Komponenten sowie Fibrillarin (Gall, 2000). Außerdem enthalten Cajal-Körperchen, die mit den Telomeren assoziiert sind, während der S-Phase des Zellzykluses die RNA-Komponente hTR und die reverse Transkriptase-Komponente hTERT der Telomerase (Tomlinson et al., 2006; Jady et al., 2006).

In somatischen Zellen finden sich ungefähr 25 bis 50 Speckles, auch Spleißfaktor-Kompartiment

genannt, in oder in der Nähe von Cajal-Körperchen. Sie stellen dynamische Strukturen dar und enthalten Spleißfaktoren für prä-mRNAs. Die zahlreichen B-Snurposomen in Amphibienoozyten entsprechen den Speckles in somatischen Zellen (Spector, 2001; Lamond und Spector, 2003, Gall et al., 2004). B-Snurposomen assoziieren an spezifischen Stellen mit Lampenbürstenchromosomen (Gall et al., 2004)(siehe 1.4.1.1.).

1.2. Transport durch die Kernporen

Die Kernhülle stellt eine wichtige Barriere zwischen Zellkern und Zytoplasma dar, die jedoch über ihre Kernporenkomplexe (NPCs) bidirektional entweder durch Diffusion oder energieabhängige Transportprozesse einen Stoffaustausch ermöglicht.

1.2.1. Aufbau der Kernporenkomplexe (NPCs)

Kernporenkomplexe sind supramolekulare Strukturen, die in die Doppelmembran der Kernhülle eingebettet sind. Sie sind in ihrer Architektur bei Eukaryoten hoch konserviert (Yang et al., 1998), auch wenn sie während der Metazoenevolution an Komplexität gewonnen haben. In Hefezellen findet man kleinere Porenkomplexe von etwa 66 MDa (Rout et al., 2000). Kernporenkomplexe bei Vertebraten haben eine geschätzte molekulare Masse von 125 MDa (Reichelt et al., 1990). Allerdings muss man diese Abschätzung kritisch betrachten, da sie möglicherweise die Masse von Transportfaktoren und Fracht miteinbezieht (Cronshaw et al., 2002).

Das gegenwärtige Konsensusmodell einer Kernpore (Abb. 1.2.) besteht aus einem zentralen Gerüst aus acht Speichen, das zwei koaxiale Ringe aus je acht globulären Untereinheiten verbindet. Vom zytoplasmatischen Ring gehen acht etwa 50 Nanometer lange Filamente aus. Am nukleoplasmatischen Ring hingegen befinden sich acht etwa 75 Nanometer lange Filamente, die in einer Distanz von 30 bis 60 Nanometer eine korbähnliche Struktur ausbilden (Lim et al., 2006a)(Abb. 1.3., Bagley et al., 2000). Der Zentralkanal ist etwa 90 Nanometer lang und besitzt an seiner engsten Stelle einen Durchmesser von 45 bis 50 Nanometer (Fahrenkrog und Aebi, 2003; Stoffler et al., 2003). Im Zentralkanal findet sich oft ein Partikel, das gerade transportiert wird (Fahrenkrog und Aebi, 2003).

Kleine Moleküle wie Wasser und Ionen passieren den Kernporenkomplex durch freie Diffusion. Der rezeptorvermittelte aktive Transport in beide Richtungen erlaubt dagegen das Durchtreten selbst großer Transportkomplexe durch die Kernpore. Pro Sekunde finden an jeder Kernpore etwa tausend Translokationen statt, die Verweildauer eines Transportkomplexes in der Kernpore beträgt durchschnittlich 10 Millisekunden (Yang et al., 2004). Daneben spielen der Kernporenkomplex und seine Proteine eine Rolle beispielsweise bei der Regulation der Genexpression, der Chromatinorganisation, der Chromosomenanordnung und der Apoptose (Fahrenkrog et al., 2004; Fahrenkrog, 2006). Der Kernporenkomplex selbst ist eine dynamische Struktur, die sensibel auf die Umgebungsbedingungen und auf chemische Effektoren reagiert. So können zum Beispiel durch

Glukokortikoide eine Erweiterung der Pore bis hin zur Ausbildung einer Riesepore mit einem Durchmesser von 300 Nanometern verursachen (Kastrup et al., 2006).

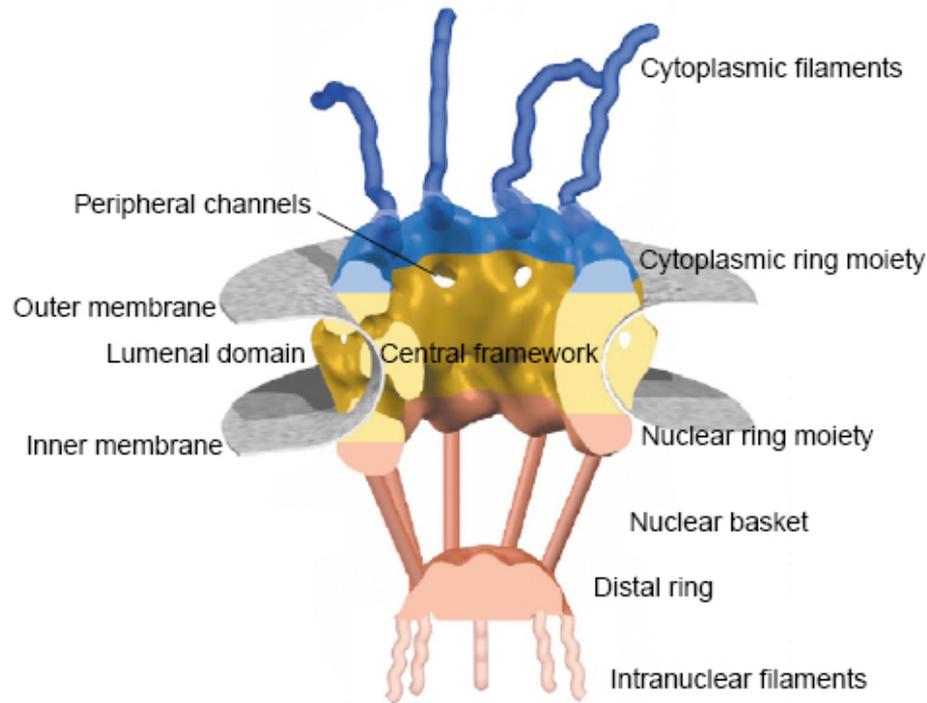


Abb. 1.2.: Konsensmodell einer Kernpore (Fahrenkrog et al., 2004).

Das Modell wurde von D. Stoffler mithilfe eines Programms entworfen, das von D. Stoffler und M. Sanner (The Scripps Research Institute, La Jolla, California, USA) entwickelt wurde.

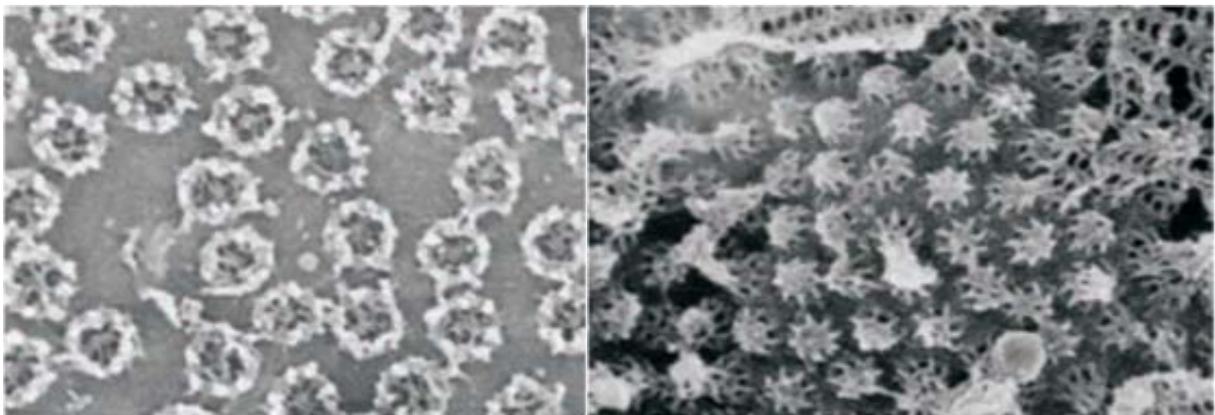


Abb. 1.3.: Kernporen einer *Xenopus*-Oozyte vom Zytoplasma aus (links) und vom Kern aus (rechts) fotografiert (Bagley et al., 2000).

1.2.2. Der Kernporenkomplex besteht aus Nukleoporinen

Der Kernporenkomplex besteht aus etwa 30 verschiedenen Kernporenproteinen, den Nukleoporinen. Wegen der Achtfach-Radiärsymmetrie der Kernporenkomplexe liegen sie in einem Vielfachen von acht vor (Rout et al., 2000; Cronshaw et al., 2002). In Kernporenkomplexen der Hefe sind die meisten Nukleoporine symmetrisch auf der zyttoplasmatischen und nukleoplasmatischen Hälfte verteilt, während bei Vertebraten einige Nukleoporine asymmetrisch lokalisieren (Griffis, 2003). Bestimmte

Nukleoporine sind innerhalb des Kernporenkomplexes mobil, manche Nukleoporine sind auch an Lokalisationen außerhalb der Kernporenkomplexe zu finden (Fahrenkrog und Aebi, 2003). Für die Nukleoporine Nup50, Nup98, Nup153, Nup214/CAN und Rae1 wurde bereits eine Shuttelaktivität festgestellt (Nakielny et al., 1999; Griffis et al., 2002; Fahrenkrog und Aebi, 2003; Griffis et al., 2004). Die Kernporenkomplexe beinhalten auch integrale Membranproteine, die Porenmembranproteine (POMs). Bei Vertebraten gibt es zwei Proteine mit Transmembrandomänen, das Protein POM121 und das Protein gp210 (Tran und Wentz, 2006). Die Nukleoporine formen innerhalb des Kernporenkomplexes Subkomplexe (Abb. 1.4., Lim und Fahrenkrog, 2006).

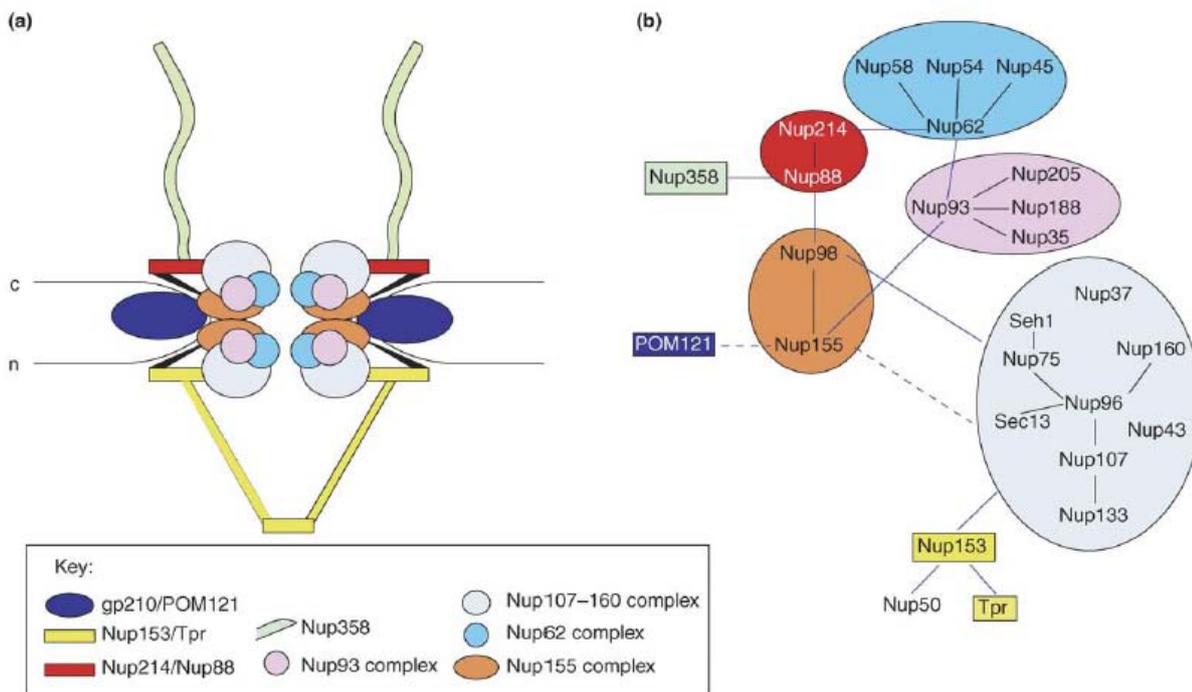


Abb. 1.4.: Lage der Nukleoporin-Subkomplexe (a) und bekannte Interaktionen (b) (Lim und Fahrenkrog, 2006).

In (b) sind mit schwarzen Linien Interaktionen von Nukleoporinen innerhalb der Subkomplexe gezeigt. Blaue Linien stellen die Interaktionen zwischen den Subkomplexen dar, die gestrichelte Linie zeigt Interaktionen, die auf Homologe in Hefe basieren.

Der aus neun verschiedenen Nukleoporinen ohne FG-Wiederholungen bestehende Nup107-160-Komplex (Nup107, Nup160, Nup133, Nup96, Nup75, Nup43, Nup37, Seh1, Sec13) stellt den Kern des zentralen Stützgerüsts dar und ist essentiell für die Ausbildung eines Kernporenkomplexes (Harel et al., 2003; Walther et al., 2003). Er liegt in 16 Kopien vor, jeweils acht Kopien auf beiden Seiten der Mittelebene (Fahrenkrog et al., 2004). Außerdem bietet er an der Kernseite des Kernporenkomplexes Bindungsstellen für das hochdynamische Korbprotein Nup153, das wiederum das Nukleoporin Tpr an den Korb verankert (Hase und Cordes 2003). Weitere Komplexe mit symmetrisch verteilten Nukleoporinen sind der Nup155-Komplex (Nup155, Nup98, Nup170), der Nup93-Komplex (Nup93, Nup205, Nup188, Nup35) und der Nup62-Komplex (Nup62, Nup58,

Nup54, Nup45) (Lim und Fahrenkrog, 2006). An der zytoplasmatischen Seite der Kernporen lokalisieren der Komplex aus Nup214/CAN und Nup88 und das Nukleoporin Nup358/RanBP2 (Tran und Wente 2006). Das Ran-GTPase-aktivierende Protein Ran-GAP bindet durch eine kovalente Modifizierung mit einem kleinen ubiquitinartigen Peptid, dem SUMO-1 („*Small Ubiquitin-Related Modifier*“), an Nup358/RanBP2 (Mahajan et al., 1997).

Zu Beginn der Mitose, am Übergang von der Prophase zur Prometaphase, dissoziieren die Kernporenkomplexe, und die Nukleoporine liegen einzeln oder in Subkomplexen gebunden vor. Nukleoporine des Nup107-160-Komplexes assoziieren mit den Kinetochoren während der Zellteilung. Nup358/RanBP2 bindet mit RanGAP an Kinetochoren und spezifischen Stellen der mitotischen Spindel. Im Gegenzug dazu finden sich die Spindel-Checkpoint-Proteine Mad1 und Mad2 in der Interphase am Kernporenkomplex. Am Ende der Mitose wird der Kernporenkomplex durch sequenzielle Zusammenlagerung der Nukleoporine wieder aufgebaut. Zuerst werden POM121, Nup153, Nup358/RanBP2 und die Nukleoporine des Nup107-160 Subkomplexes rekrutiert, dann der Nup62-Komplex, gefolgt von Nup214/CAN und Nup88, und schließlich Tpr und gp210 (Hetzer et al., 2005).

β -Faltblätter, α -Helices und Coiled-Coil-Domänen sind Hauptfaltungen in Nukleoporinen (Lim und Fahrenkrog, 2006). Etwa ein Drittel der Nukleoporine (Nup358/RanBP2, Nup214/CAN, Nup153, POM121, Nup98, Nup62, Nup58, Nup54, Nup50, Nup45, NLPI) (Cronshaw et al., 2002) besitzen Domänen mit FG (Phenylalanin-Glycin)-, GLFG (Glycin-Leucin-Phenylalanin-Glycin)-, oder FxFG (Phenylalanin-Aminosäure mit kleiner oder polarer Seitenkette-Phenylalanin-Glycin)-Wiederholungen, die die Interaktion von Nukleoporinen mit den löslichen Transportfaktoren vermitteln (Fahrenkrog und Aebi, 2003). GLFG-Nukleoporine kommen auf beiden Seiten des Kernporenkomplexes vor, manche FG-Nukleoporine sind ausschließlich auf der Zytoplasmaseite, und manche FxFG-Nukleoporine nur auf der Kernseite des Porenkomplexes zu finden (Bayliss et al., 2002). Es wurde gezeigt, dass Nukleoporine mit FG-Wiederholungen der zytoplasmatischen Filamente (Nup358/RanBP2 und Nup214/CAN) und der nukleären Korbstruktur (Nup153 und Nup98) *in vitro* lösliche Transportfaktoren binden können (Powers et al., 1997).

Nup153 ist mit der aminoterminalen Domäne am nukleoplasmatischen Ring und mit der zentralen Zinkfingerdomäne am distalen Ring der nukleären Korbstruktur der Kernpore verankert. Die carboxyterminale, etwa 40 FG-Wiederholungen enthaltende Domäne besitzt im Kernporenkomplex jedoch eine große Beweglichkeit. Sie kann sowohl entlang des Korbbereiches, und sogar in der zytoplasmatischen Peripherie der zentralen Pore gefunden werden (Fahrenkrog et al., 2002). Nup153 ist sowohl an Export- als auch Importprozessen beteiligt und interagiert mit Transportkomplexen (Lim et al., 2006a). Ein ähnliches Verhalten wurde für das Nup214/CAN beschrieben (Paulilo et al., 2005). Nup98, ein mobiles Nukleoporin mit GLFG-Wiederholungen (Powers et al., 1997), ist auf beiden Seiten des Kernporenkomplexes lokalisiert (Griffis et al., 2003). Daneben findet man Nup98,

vermittelt durch die GLFG-Domäne, in intranukleären Körpern, den so genannten GLFG-Kernkörpern (Griffis et al., 2002).

Sowohl Nup153 als auch Nup98 spielen eine Rolle beim Export von verschiedenen RNA-Klassen exklusive der tRNA (Powers et al., 1997; Ullman et al., 1999). Interessanterweise ließ sich durch die Hemmung der RNA-Polymerase I- und II-abhängigen Transkription der dynamische Austausch von Nup153 und Nup98 im Kernporenkomplex vermindern. Zwar ist unklar, wie die Transkription mit Nup153 und Nup98 verknüpft ist. Denkbar ist jedoch, dass sich die Nukleoporine im Rahmen des RNA-Exportes von der Pore entfernen, entweder weil sie mit dem RNP-Komplex assoziieren oder weil sie durch einen Porenumbau den Durchtritt des RNP-Partikels ermöglichen (Griffis et al., 2004).

Eine andere Subfamilie von Nukleoporinen zeichnet sich durch WD (Tryptophan-Asparaginsäure)-Wiederholungen aus (ALADIN, p42, p37, RAE1, Seh1) (Cronshaw et al., 2002). WD-Wiederholungen sollen die Zusammenlagerung von großen Multiproteinkomplexen vermitteln (Smith et al., 1999). Eine mögliche Funktion im Kernporenkomplex wäre die Ausbildung von Subkomplexen oder von Transportkomplexen.

Weitere Motive in Nukleoporinen sind coiled-coil Domänen (Tpr, Nup214, Nup93, Nup88, Nup62, Nup58, Nup54, Nup45, Nup43), Zinkfinger (Nup358/RanBP2, Nup153, NLPI) oder Leucinzipper-Motive (Nup358/RanBP2, Tpr, Nup214, Nup205). Die Nukleoporine Nup358/RanBP2 und Nup50 weisen eine Ran-Bindungsdomäne auf (Cronshaw et al., 2002).

1.2.3. Der Transport durch die Kernporen wird durch Transportfaktoren vermittelt

Aktiver Transport durch die Kernporen kommt durch die Bindung von Transportfaktoren an ihr Substrat und die darauf folgenden transienten Interaktionen des Transportfaktors mit Nukleoporinen zustande. Transportfaktoren lassen sich in Importine und Exportine unterteilen und gehören größtenteils zur evolutionär konservierten Importin- β -Familie. Der riesigen Vielfalt an verschiedenen Transportsubstraten steht eine nur geringe Bandbreite an Transportfaktoren gegenüber. Dieses Problem ist aber durch verschiedene Klassen an Transportsignalen gelöst, die als Kernlokalisierungssignale („*Nuclear Localization Signal*“, NLS) und Kernexportsignale („*Nuclear Export Signal*“, NES) subsumiert werden können. Die Transportfaktoren erkennen diese Signale und binden daran.

Eine wichtige regulatorische Rolle spielt hierbei die GTPase Ran (siehe 1.2.7.). Ran liegt im Zellkern bevorzugt als Ran-GTP, im Zytoplasma jedoch als Ran-GDP vor. Importine binden im Zytoplasma an das Kernlokalisierungssignal des zu transportierenden Substrates. Durch Importin-Nukleoporin-Interaktionen gelangt der Importkomplex in den Zellkern. Dort bindet Ran-GTP an das Importin, was zu einer Dissoziation des Substrates vom Importin führt. Das Importin wird nun zurück in das Zytoplasma gebracht. Exportine hingegen binden im Zellkern an Kernexportsignale der zu exportierenden Substrate und an Ran-GTP. Durch Interaktion des Exportins mit den Nukleoporinen

kommt es zum Transport in das Zytoplasma. Nach der Ran-GTP-Hydrolyse zu Ran-GDP dissoziiert der Exportkomplex (Pemberton und Paschal, 2005).

Transportfaktoren der Importin- β -Familie bestehen aus etwa 18 bis 20 tandemartigen Sequenzwiederholungen, den so genannten HEAT-Wiederholungen (HEAT: Huntingtin, Elongationsfaktor 3, PR65/A-Untereinheit der Proteinphosphatase 2A, Lipidkinase TOR). Jede HEAT-Wiederholung setzt sich aus zwei antiparallelen α -Helices zusammen, die mit einem flexiblen Zwischenstück verbunden sind. Insgesamt bilden die HEAT-Wiederholungen zwei Bögen. Die Flexibilität dieser Strukturen ermöglicht die Bindung der Transportfaktoren an unterschiedliche Bindungspartner (Conti et al., 2006). Der Exportfaktor TAP, der den Export von mRNA vermittelt, gehört ebenso wie der Kerntransportfaktor 2 (NTF2) für den Import von Ran-GDP nicht der Importin- β -Familie an. Eine Übersicht über die humanen Transportfaktoren ist in Tabelle 1.1. dargestellt.

Transportfaktor		Substrat
Import	Karyopherin- β 1/Importin- β	Substrate mit lysinreichen NLSs via Importin- α ; UsnRNPs via Snurportin; Replikationsprotein A via RIP α ; Proteine mit argininreichen NLSs
	Karyopherin- β 2/Transportin 1	hnRNPA1, Histone, TAP, ribosomale Proteine
	Transportin SR	SR-Proteine
	Transportin 2	HuR
	Importin 4, 5, 9	Histone, ribosomale Proteine
	Importin 7	HIV RTC, H1, Glukokortikoidrezeptor, ribosomale Proteine
	Importin 8	SRP 19
	Importin 11	UbcM2, rpL12
	NTF2	Ran-GDP
Export	CRM1/Exportin1	Substrate mit leucinreichen NESs, Snurportin
	Exportin-t	tRNA
	CAS	Karyopherin- α /Importin- α
	Exportin 4	eIF5A
	Exportin 5	prä-microRNA, tRNA, eEF1A
	Exportin 6	Profilin, Aktin
	Exportin 7	p50Rho-GAP, 14-3-38
	TAP	mRNA
Import/Export	Importin 13	Import: Rbm8, Ubc9, Pax6; Export: eIF1A
unbekannt	RanBP6, 16, 17	

Tab. 1.1.: Transportfaktoren und ihre Substrate (Nakielny und Dreyfuss, 1999; Bohnsack et al., 2002; Mosammaparast und Pemberton, 2004; Pemberton und Paschal, 2005).

Transportfaktoren binden mit hydrophoben Aminosäuren an ihrer Oberfläche an den Phenylalaninring der FG-Wiederholungen in Nukleoporinen (siehe 1.1.2.). TAP (Braun et al., 2002), Exportin-t (Kuersten et al., 2002), Importin- β (Bednenko et al., 2003) und der Kerntransportfaktor 2 (NTF2) (Morrison et al., 2003) besitzen zwei, MTR2 (Senay et al., 2003) drei Bindungsdomänen für FG-Wiederholungen. Domänen mit FG-Wiederholungen sind im nativen Zustand ungefaltet, das heißt, sie besitzen keine definierte Sekundärstruktur (Denning et al., 2003). Durch die hohe Flexibilität und Mobilität sollen ungefaltete Proteine schnell mit mehreren Bindungspartnern gleichzeitig assoziieren und dissoziieren, was gut in das Bild einer effizienten Passage von Komplexen aus Transportfaktor und Substrat passt (Fahrenkrog et al., 2004). Zur Art der Transportbarriere existieren verschiedene Modelle. So wurde der Begriff der virtuellen Schranke gebildet. Makromoleküle bewegen sich durch Diffusion. Ist die Möglichkeit der Bewegung in viele Richtungen gegeben, ist die Entropie hoch. Je größer ein Molekül ist, umso weniger wahrscheinlich ist das Durchtreten des Kernporenkomplexes, da hier die Entropie sehr stark vermindert ist. Die FG-Nukleoporine tragen zu dieser entropischen Barriere mit bei, da sie den für die Diffusion benötigten Platz einengen (Rout et al., 2003). Für das Modell der Polymerbürsten („*Polymer Brush*“- Barriere sollen bereits wenige FG-Nukleoporine ausreichen. Die flexiblen FG-Domänen bilden dabei eine bürstenartige Transportbarriere, wobei Transportkomplexe durch Interaktion mit den FG-Nukleoporinen eingefangen werden (Lim et al., 2006b). Dies passt zur Beobachtung, dass bei Reduktion von FG-Nukleoporinen und der Erzeugung eines minimalen Kernporenkomplexes die Permeabilität nicht nachlässt (Strawn et al., 2004). Dagegen geht das Siebmodell von einer stabilen, dreidimensionalen Interaktion von FG-Nukleoporinen aus, die in einer gelartigen Eigenschaft mündet. Die Maschen können nur von kleinen Molekülen durch Diffusion durchdrungen werden. Größere Moleküle benötigen einen Transportfaktor, der durch die Interaktion mit FG-Nukleoporinen das Maschenwerk aufbricht (Frey et al., 2006).

1.2.4. Transportsubstrate werden an ihren Transportsignalen erkannt

Transportsubstrate werden von der Transportmaschinerie anhand ihrer Transportsignale, der Kernlokalisierungssignale (NLSs) und Kernexportssignale (NESs) erkannt.

Die Kernlokalisierungssignale werden entweder direkt von einem Importfaktor erkannt oder durch Adapterproteine, die ihrerseits an den Importfaktor binden. Die Importin- β -Adapterproteine Importin- α , Snurportin bzw. RIP α erkennen klassische NLSs, U snRNPs bzw. das Replikationsprotein A (Nakielny und Dreyfuss, 1999). Klassische NLSs bestehen aus einer kurzen Folge basischer Aminosäuren [(K/R)₄₋₆], wie sie zuerst im Simian virus 40 (SV40) *large*-T Antigen gefunden wurden (Kalderon et al., 1984). Sie können auch zweigeteilt als [(K/R)₂-X₁₀₋₁₂-(K/R)₃] vorliegen. Ein Beispiel hierfür ist das NLS im Nukleoplasmin, das sich aus zwei kurzen lysinreichen Sequenzen mit zehn dazwischen liegenden separierenden Aminosäuren zusammensetzt (Robbins et al., 1991). Diese

klassischen NLSs enthalten als basische Aminosäuren eher Lysin als Arginin und werden von Importin- α erkannt. Daneben gibt es auch argininreiche NLSs, die direkt von Importin- β gebunden werden, wie zum Beispiel im HIV-1-Rev, sowie andere nicht klassische Kernlokalisierungssignale, deren Charakterisierung noch aussteht.

Das bestcharakterisierte Exportsignal ist das hydrophobe leucinreiche NES, wie es bei HIV-1-Rev oder dem Proteinkinaseinhibitor (PKI) zu finden ist (Fischer et al., 1995; Wen et al., 1995). Leucinreiche NES werden vom Exportfaktor CRM1 („*Chromosome Maintenance Region Protein*“ 1) erkannt (Fornerod et al., 1997).

Schließlich existieren Sequenzen, die sowohl NLS als auch NES beinhalten, wie die M9-Sequenz des hnRNP A1 (Michael et al., 1995). Diese Sequenzen werden nukleozytoplasmatische Shuttelsignale (NSS) genannt (Michael, 2000). Einige Beispiele für Import- und Exportsignale sowie für Shuttelsequenzen sind in Tabelle 1.2. aufgelistet.

Import	Protein	Kernlokalisierungssignal (NLS)
	Klassische NLSs	lysinreich, werden von Importin- α erkannt
	SV-40 large-T Antigen	PKKKRKV (einteiliges NLS) (Kalderon et al., 1984)
	Nukleoplasmin	KRPAATKKAQAKKKK (zweigeteiltes NLS) (Robbins et al., 1991)
	argininreiche NLSs	werden von Importin- β erkannt
	HIV-1 Rev	RQARRNRRRRWR (Truant und Cullen, 1999)
Export	Protein	Kernexportsignal (NES)
	leucinreiche NESs	Konsensus: L-x(2,3)-[LIVFM]-x(2,3)-L-x-[LI] (Bogerd et al., 1996)
	Rev (HIV-1)	73-LPPLERLTL-83 (Fischer et al., 1995)
	PKI (Ratte)	37-LALKLAGLDI-46 (Wen et al., 1995)
	Aktin	171-LPHAIMRLDLA-181 (Cullen, 1998)
	TFIIIA (<i>Xenopus</i>)	326-SLVLDKLTl-336 (Fridell et al., 1996)
bidirektional	Protein	bidirektionale Shuttelsequenz: NLS und NES
	hnRNP A1	M9 (Michael et al., 1995): 268-NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY-306
	hnRNP K	KNS (Michael et al., 1997): 338-GFSADETWDSAITWSPSEWQMAY-361
	HuR	HNS (Fan und Steitz, 1998a): 205-RRFGGPVHHQAQRFSPMGVDHMSGLSGVNVP-237

Tab. 1.2.: Beispiele für Import- und Exportsignale und Shuttelsignale.

1.2.5. Kernimport

Klassische Kernlokalisierungssignale werden von Importin- α erkannt. Importin- α besitzt eine spezielle Bindungstasche für das Kernlokalisierungssignal. Zehn Armadillo-Wiederholungen, in denen jeweils 40 Aminosäuren in drei Helices angeordnet sind, formen eine taschenartige Superhelix (Conti et al., 1998; Kobe, 1999). Importin- α fungiert als Adapterprotein zwischen Importsubstrat und Importin- β , an dessen Carboxyterminus es bindet. Argininreiche nichtklassische Kernlokalisierungssignale werden direkt von Importin- β erkannt.

Während des Transportes durch den Kernporenkomplex interagiert Importin- β mit den FG-haltigen Nukleoporinen, allerdings nur in Abwesenheit von Ran-GTP (Bayliss et al., 2000). Das Nukleoporin Nup50 kann gleichzeitig an Importin- α und Importin- β binden und so die Affinität von Importin- α zu Importin- β erhöhen (Fahrenkrog et al., 2004). Neuere Studien mit Depletion von Nup358/RanBP2 als Bestandteil der zytoplasmatischen Filamenten und Nup214/CAN haben gezeigt, dass hierdurch der Import nur geringfügig beeinträchtigt wird (Hutten und Kehlenbach, 2006). Nup153, das an der nucleoplasmatischen Seite des Kernporenkomplexes zu finden ist, wird von Importin- β stärker als die anderen Nukleoporine gebunden. Im Zellkern angekommen, bindet Ran-GTP an den Aminoterminus von Importin- β , was durch Konformationsänderung zum Ablösen von Importin- α führt. Importin- β inhibiert die intrinsische GTPase-Aktivität von Ran (Görllich et al., 1996) und verhindert die GTPase-Aktivierung durch das Ran-GTPase-aktivierende Protein 1 (RanGAP1) (Floer und Blobel, 1996). Importin- β wird mit Ran-GTP, Importin- α mit dem Exportfaktor CAS („*Cellular Apoptosis Susceptibility*“) in das Zytoplasma zurücktransportiert. Daneben gibt es noch eine Reihe anderer Importwege, die Importfaktoren mit den entsprechenden Substraten sind in Tabelle 1.1. zu sehen.

1.2.6. Kernexport

Proteine mit leucinreichen Kernexportsignalen, darunter viele Shuttelproteine, werden Ran-abhängig über den Exportfaktor CRM1 exportiert. Da RNA immer an Proteine gebunden exportiert wird, werden auch ribosomale RNAs, U snRNAs und bestimmte zelluläre RNAs über diesen Exportweg transportiert (Cullen, 2003).

CRM1 bindet neben dem Exportsubstrat auch Ran-GTP. Die Bindung von Ran oder von Exportsubstrat an CRM1 soll zu einer Konformationsänderung führen, die die Ausbildung eines stabilen Komplexes aus CRM1, Ran und Exportsubstrat fördert (Petosa et al., 2004). Außerdem soll das Kernprotein RanBP3 die Interaktion zwischen CRM1 und dem RanGTP bzw. dem Exportsubstrat stabilisieren und den CRM1-vermittelten Proteinexport fördern (Englmeier et al., 2003). RanBP3 formt mit CRM1 einen Komplex, der eine höhere Affinität zu Ran und einem Exportsubstrat hat als CRM1 alleine (Lindsay et al., 2001). Des Weiteren kann CRM1 nur in Anwesenheit von Ran-GTP an den p62-Komplex und an Nup214/CAN binden. Nup214/CAN an der zytoplasmatischen Seite des Kernporenkomplexes scheint als Endpunkt für den Export mit CRM1 entscheidend zu sein (Hutten,

2006). Nup358/RanBP2, Bestandteil der zytoplasmatischen Filamente, ist mit Ran-GAP assoziiert und kann *in vitro* CRM1 binden. Es könnte eine wichtige Rolle zum Beispiel bei der Dissoziation des Exportkomplexes oder als Auffangpunkt für freies CRM1 darstellen.

Daneben gibt es weitere Exportwege, die unter Beteiligung von Exportfaktoren der Importin- β -Familie und Ran-GTP stattfinden (siehe Tabelle 1.1.), eine Ausnahme hiervon stellt der Export des Großteils der zellulären mRNA dar. Er verläuft mit den Faktoren TAP/NXT1.

1.2.6.1. Export von rRNA

Die 28S, 18S und 5,8S rRNA wird von der RNA-Polymerase I im Nukleolus synthetisiert, die 5S rRNA von der RNA-Polymerase III im Nukleoplasma. Die 28S, 5,8S und 5S rRNA wird in die 60S Untereinheit, die 18S rRNA in die 40S Untereinheit eingebaut. Die Untereinheiten werden anschließend separat über den Exportfaktor CRM1 unter Beteiligung von Ran-GTP in das Zytoplasma transportiert. Das Shuttleprotein NMD3 („*Nonsense Mediated Decay*“) wird zur 60S-Untereinheit rekrutiert, wenn diese reif für den Export ist. NMD3 besitzt carboxyterminal ein basisches NLS und ein leucinreiches NES, und stellt den Adapter zwischen der großen Ribosomenuntereinheit und CRM1 dar (Johnson et al., 2002). Das Adapterprotein, das das Signal für den Export der kleinen Untereinheit bereitstellt, ist noch nicht identifiziert. Die Ribosomenuntereinheiten gelangen wahrscheinlich mittels Diffusion zu den Kernporen (Politz et al., 2003). Eventuell wird ein kleiner Teil der kleinen Ribosomenuntereinheiten (etwa 10 Prozent) assoziiert mit Aktin und Kernmyosin aktiv zu den Kernporen transportiert (Cisterna et al., 2006).

In Amphibienoozyten wird die 5S rRNA in das Zytoplasma transportiert und dort gelagert, um mit Beginn der Vitellogenese in den Zellkern importiert und in die 60S Untereinheit eingebaut zu werden (siehe 1.3.3.). Die 5S rRNA bildet zusammen mit dem oozytentypischen Transportfaktor IIIA (TFIIIA) den 7S rRNP-Komplex, der aufgrund des leucinreichen Exportsignals von TFIIIA (Fridell, 1996) wahrscheinlich mittels CRM1 in das Zytoplasma transportiert wird.

1.2.6.2. Export von U snRNA

Die snRNPs (kleine nukleäre Ribonukleoprotein-Komplexe) U1, U2, U4/6 und U5 spielen eine kritische Rolle beim Spleißen der prä-mRNA. In Eukaryoten werden die U snRNA-Komponenten im Zellkern synthetisiert und mit Ausnahme von U6 snRNA in das Zytoplasma transportiert. U1, U2, U4 und U5 snRNA werden von der RNA-Polymerase II transkribiert und kotranskriptionell mit einer m⁷G-Kappe versehen, die als Exportsignal fungiert. Die m⁷G-Kappe wird vom Kappenbindungskomplex („*Cap binding complex*“, CBC) erkannt, der aus den Proteinen CBP 20 und CBP 80 besteht (Izaurrealde et al., 1995). Da weder CBP 20 noch CBP 80 über ein leucinreiches Kernexportsignal verfügen, fungiert das Protein PHAX (phosphorylierter Adapter für den RNA-Export) als Adapter. CRM1, Ran-GTP und PHAX binden an den U snRNA-gebundenen CBC (Ohno et al., 2000). Nach

dem Transport durch den Kernporenkomplex zerfällt der Transportkomplex infolge der Hydrolyse der Ran-GTP-Komponente und der Dephosphorylierung von PHAX. PHAX wird in den Zellkern importiert und steht nach der Phosphorylierung wieder als Adapter zur Verfügung. Die snRNAs U1, U2, U4 und U5 besitzen eine Sm-Bindungsstelle. Sie binden im Zytoplasma die so genannten Sm-Proteine (B, B', D1, D2, D3, E, F, G) und für jedes U snRNP spezifische Proteine. Nach der Zusammenlagerung der Sm-Domäne wird die m⁷G Kappe zur m₃G-Kappe hypermethyliert. Die reifen U snRNPs werden anschließend mit dem Adapterprotein Snurportin und Importin-β in den Kern importiert. U6 snRNA wird von der RNA-Polymerase III transkribiert, besitzt keine m⁷G-Kappe sondern eine γ-Methylphosphat-Kappe und keine Sm-Bindungsstelle. U6 wird nicht in das Zytoplasma transportiert (Fischer et al., 1993).

1.2.6.3. Export von tRNA

Die prä-tRNA wird durch die RNA-Polymerase III synthetisiert und im Zellkern posttranskriptionell stark modifiziert. Alle tRNAs werden am 5'-Ende durch die RNase P bearbeitet. Am 3'-Ende werden die Uracilreste durch die CCA-Sequenz ersetzt, die bei allen reifen tRNAs zu finden ist. Außerdem werden viele Basen modifiziert. Einige tRNAs besitzen in der Antikodonschleife ein Intron, das durch Spleißen entfernt werden muss (Cullen, 2003). Der tRNA-Exportmechanismus selektioniert daher vermutlich für reife tRNAs. Neben einer korrekten Prozessierung der 5'-und 3'-Enden spielt hier möglicherweise die Aminoazylierung, die nur an reifen tRNAs stattfindet, eine Rolle (Lund und Dahlberg, 1998; Sarkar et al., 1999). Die tRNA kann über zwei verschiedene Exportwege aus dem Kern transportiert werden. Exportin-t bindet in Anwesenheit von Ran-GTP direkt und spezifisch an reife tRNA (Arts et al., 1998; Kutay et al., 1998). Außerdem bindet Exportin-t spezifische Nukleoporene und shuttelt zwischen Kern und Zytoplasma. Daneben wird tRNA, wie der Translationselongationsfaktor 1A (eEF1A), auch mit Exportin 5 exportiert. Hierbei bindet eEF1A indirekt über die tRNA an Exportin 5 (Bohnsack et al., 2002).

1.2.6.4. Export zellulärer mRNAs

Die Mehrzahl der zellulären mRNAs wird Ran-unabhängig durch das Heterodimer aus TAP und NXT1 exportiert und nicht mit Transportfaktoren der Importin-β-Familie (Clouse et al., 2002). Im Hefesystem entspricht TAP dem Mex67p, der Kofaktor NXT1 oder p15 funktionell dem Mtr2p (Katahira, 1999). TAP (Tip-assoziiertes Protein) wird auch NXF1 („*Nuclear Export Factor 1*“) genannt und gehört wie NXF2 und NXF3 zur NXF-Familie, und nicht zur Importin-β-Familie. TAP wird ubiquitär in allen Zellen und Geweben exprimiert, während die Expression von NXF2 und NXF3 gewebespezifisch ist. TAP, NXF2 und NXF3 können mit NXT1/p15 Heterodimere bilden (Yang, 2001). Durch die Bildung eines Heterodimers aus TAP und dem kleinen Kofaktor NXT1/p15 wird die

Nukleoporinbindung und das nukleozytoplasmatische Shutteln von TAP deutlich gesteigert (Wiegand et al., 2002).

TAP besteht aus einer aminoterminalen leucinreichen Region (LRR), einer zentralen Domäne, welche eine dem Importrezeptor NTF2 ähnliche Sequenz zeigt, und einer carboxyterminalen Domäne mit einer ubiquitinassozierten Faltung (UBA). Die UBA-Domäne ist wichtig für die Interaktion mit den Nukleoporinen, und daher für den nukleozytoplasmatischen Export. Die zentrale Domäne vermittelt die Interaktion mit dem Kofaktor NXT1/p15. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass die NXT1-Bindungsdomäne auch an Nukleopore binden kann (Cullen, 2003).

Identifiziert wurde TAP als zellulärer Exportfaktor beim Export der *Mason-Pfizer-Monkey-Virus* (MPMV)-RNA (Grüter et al., 1998), die nicht mithilfe von CRM1 exportiert wird. Einfache Retroviren wie MPMV kodieren für ein so genanntes konstitutives Transportelement (CTE) (Bray et al., 1994). TAP bindet mit seiner LRR-Region an diese CTE-RNA (Liker et al., 2000). Durch einen Exzess von CTE konnte selektiv der Export zellulärer mRNAs geblockt werden, was auf einen gemeinsamen Transportweg hindeutete (Pasquinelli et al., 1997).

mRNAs haben außer einer 5'-m⁷G-Kappe und einem 3'-poly(A)-Schwanz keine offensichtliche gemeinsame RNA-Sequenz oder RNA-Struktur. Dennoch scheint in injizierten Oozyten keine dieser beiden Modifikationen kritisch für den mRNA-Export zu sein (Jarmolowski, 1994). In Injektionsexperimenten bei *Xenopus*-Oozyten wurden mRNAs, die gespleißt werden mussten, effizienter exportiert als die jeweiligen intronlosen mRNAs (Luo und Reed, 1999). Dies deutet auf eine Verflechtung von Spleißprozessen und Transport hin. Allerdings scheint Spleißen per se ebenfalls nicht essentiell für den Export zu sein (Cullen 2003).

Die carboxyterminale Domäne (CTD) der größten Untereinheit der RNA-Polymerase II stellt eine Plattform für diverse Transkriptions- und mRNA-prozessierende Faktoren dar. Proteine, die an der posttranskriptionellen Prozessierung, dem Export, der subzellulären Lokalisation, Translation und der Stabilität mitwirken, binden bereits an die entstehende prä-mRNA. Aber die Proteinzusammensetzung dieser mRNP-Komplexe ist einem laufenden Wandel unterworfen. Ist die prä-mRNA mit einer monomethylierten Kappe versehen, bindet der kappenbindende Komplex (CBC) an die prä-mRNA und die carboxyterminale Domäne (CTD) der größten Untereinheit der RNA-Polymerase II. Dieser kappenbindende Komplex ist für das Spleißen, Entkappen und die Translation sowie für den mRNA-Abbau im Kern erforderlich (Proudfoot, 2002; Aguilera, 2005).

Der evolutionär konservierte Transkriptions-Export-Komplex (TREX) stellt eine Schlüsselfigur im mRNA-Export dar. Er besteht aus zwei Hauptkomponenten, dem stabilen THO-Komplex und den mRNA-Export-Proteinen UAP56 und Aly/Ref. Bei Säugetieren rekrutiert THO die putative ATPase/RNA-Helikase UAP56 und das Ref (RNA-Export Faktor)-Protein Aly/Ref während des späten Spleißstadiums zur mRNA (Reed und Chang, 2005). Das Shuttelprotein Aly ist Teil des so genannten Exon-Verbindungskomplexes („*Exon Junction Complex*“, EJC), der Proteine enthält, die

beim Spleißen, dem Export und dem *Nonsense*-vermittelten mRNA-Abbau beteiligt sind (Sommer und Nehrass, 2005). Durch RNA-Interferenz-Experimente in *Drosophila*-Zellen konnte gezeigt werden, dass TAP, NXT1 und UAP56 essentiell für den mRNA-Export sind, die bekannten Komponenten des Exon-Verbindungs-Komplexes, inklusive Aly, jedoch nicht (Gatfield und Izarralde, 2002). In Mikroinjektionsexperimenten mit *Xenopus*-Oozyten hingegen aktivierte Aly den mRNA-Export und interagiert *in vitro* direkt mit TAP (Zhou et al., 2000; Rodrigues et al., 2001). Mit Antikörpern gegen Aly konnte der Export sowohl gespleißter als auch intronloser mRNAs inhibiert werden (Rodrigues et al., 2001). Daneben können auch Proteine der SR (Serin-Arginin-reichen)-Proteinfamilie mit TAP interagieren. SR-Proteine sind Spleißfaktoren, die an Exonsequenzen der prä-mRNA binden und Spleißosomen zu den flankierenden 5'- und 3'-Spleißstellen rekrutieren. Nach dem Spleißen bleiben die SR-Proteine an der RNA gebunden (Huang und Steitz, 2001; Huang et al., 2003; Reed und Chang, 2005). In Abbildung 1.5. ist ein Modell für die Verflechtung von Spleißen und Export der mRNA, in Abbildung 1.6. ein Schema für die Rekrutierung von Exportfaktoren und Faktoren des EJC-Komplexes zur mRNA zu sehen.

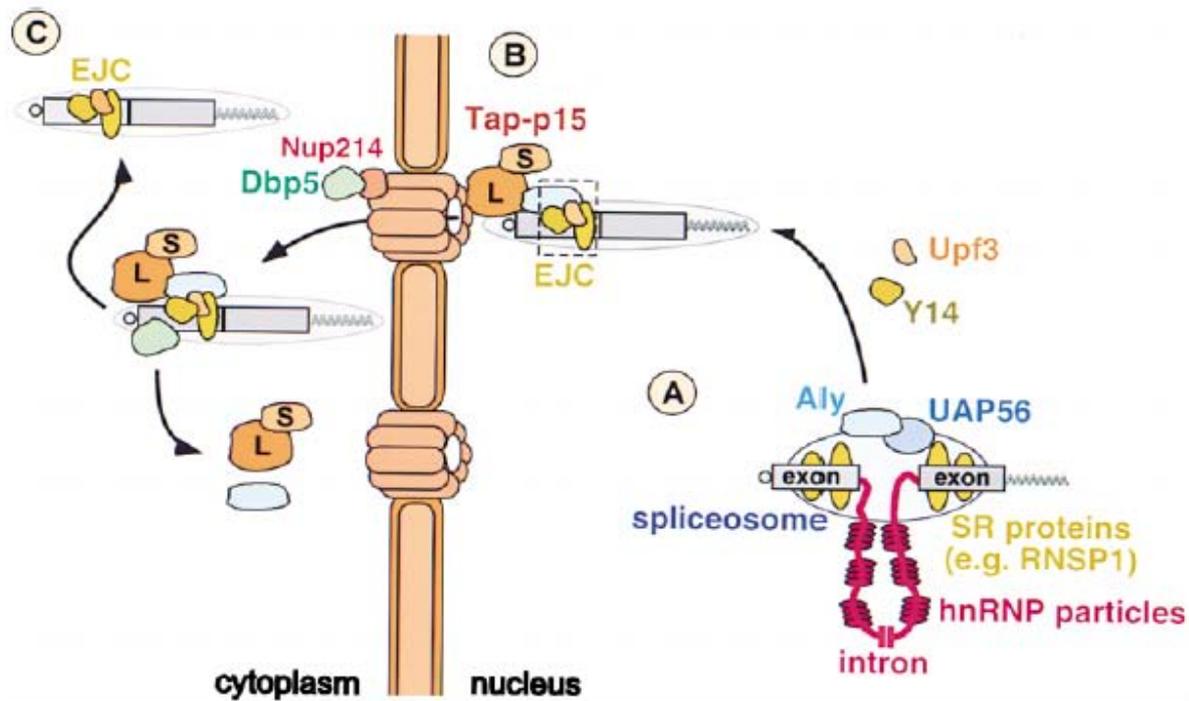


Abb. 1.5.: Modell für die Verflechtung von Spleißen und Export der mRNA in Metazoen (Reed und Hurt, 2002).

A: UAP56 und Aly assoziieren mit dem Spleißosom, SR-Proteine mit den Exons. B: Das mRNP wird mit Heterodimeren aus Tap und p15 exportiert. Aly ist das verbindende Protein zwischen dem Exon-Verbindungskomplex (EJC) und Tap-p15. C: Die Exportfaktoren dissoziieren vom mRNP nach dem Export in das Zytoplasma.

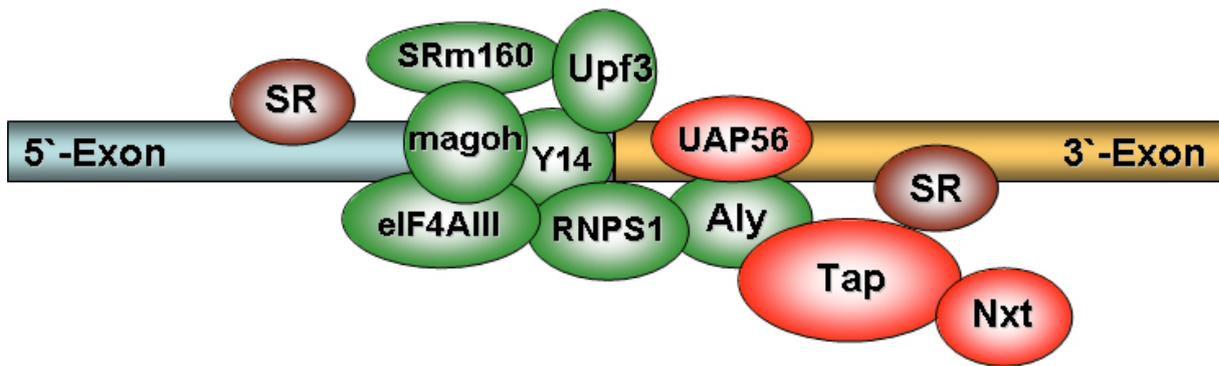


Abb. 1.6.: EJC- und Exportfaktor-Rekrutierung (nach Sanford und Caceres, 2004).

Ein großer Unterschied zwischen dem Export, der durch einen Exportfaktor der Importin- β -Familie vermittelt wird und dem mRNP-Transport stellt die Größe der Transportkomplexe dar (Cole und Scarcelli, 2006). Transportkomplexe mit einem Exportfaktor aus der Importin- β -Familie scheinen durch den Kernporenkanal zufällig durch Diffusion zu wandern, wobei sie mit den FG-Nukleoporinen viele aufeinander folgende Kontakte eingehen. Der limitierende Faktor soll hierbei das Entkommen der Transportkomplexe aus dem Kanal sein (Yang et al., 2004). Während die mRNPs sich zwar innerhalb des Zellkerns zwischen dem Chromatin durch Diffusion fortbewegen, bis sie innerhalb von Sekunden Kernporenkomponenten kontaktieren (Politz et al., 1999; Politz et al., 2006), ist eine Passage durch die Kernporen mittels Diffusion aufgrund ihrer Konfiguration und Größe schwer vorstellbar. Eine Entfaltung der Struktur ist notwendig, wenn sie durch den Kernporenkomplex passen sollen (Cole und Scarcelli, 2006). Unter den größten mRNPs finden sich beispielsweise die Balbianiring-mRNPs von *Chironomus tentans*, die etwa doppelt so groß wie der Durchmesser eines Kernporenkomplexes sind. Diese mRNPs gehen mit ihrem 5'-Ende zuerst durch den Kernporenkomplex, kontaktieren die Korbstruktur, treten anschließend durch den Zentralkanal hindurch und werden von Ribosomen gebunden, wenn sie aus dem Kernporenkomplex austreten (Daneholt, 2001).

Das in Eukaryoten hochkonservierte Shuttelprotein Dbp5 (DEAD-Box-Protein 5) gehört zur Familie der DEAD (D-E-A-D: Asp-Glu-Ala-Asp)-Box-Proteine, die mit Energie aus der ATP-Hydrolyse doppelsträngige RNA entwinden und gebundene Proteine von der RNA entfernen können (Tseng et al., 1998; Rocak et al., 2004; Fairman et al., 2004). Dbp5 wird durch Nup214/CAN zu den zytoplasmatischen Filamenten der Kernporenkomplexe rekrutiert (Hodge et al., 1999; Schmitt et al., 1999). Die ATPase-Aktivität von Dbp5 wird *in vitro* durch Gle1 und dem Kofaktor Inositolpolyphosphat (InsP₆) stimuliert (Weirich et al., 2006; Alcázar-Román et al., 2006). Das Shuttelprotein Gle1 ist ein für den mRNA-Export essentieller Faktor, der ebenfalls an den zytoplasmatischen Filamente der Kernporenkomplexe lokalisiert ist (Strahm et al., 1999; Kendirgi et al., 2003). Dbp5 wird bereits ab der frühen Transkription am 5'-Ende der Balbianiring-mRNP gefunden und bleibt dort bis zum Transport in das Zytoplasma (Zhao et al., 2002). Wird Dbp5 an

zytoplasmatische Nukleoporine gebunden, könnte es als molekularer Motor dienen und die RNA in das Zytoplasma ziehen, während es multiple Proteinmoleküle entfernt (Cole und Scarcelli, 2006).

Die Mehrzahl der zellulären mRNAs wird zwar über den TAP-vermittelten Exportweg in das Zytoplasma befördert, bestimmte zelluläre mRNAs werden jedoch CRM1-vermittelt exportiert. Unter Beteiligung des Shuttelproteins HuR (siehe 1.2.8.3.) ist dies für die *c-fos*-mRNA gezeigt worden (Brennan et al., 2000). Anhaltspunkte gibt es auch für einen CRM1-vermittelten Export von Interferon- α 1-mRNA (Kimura et al., 2004). Das Shuttelprotein NXF3 besitzt, anders als TAP, ein leucinreiches Exportsignal, das direkt mit CRM1 interagieren kann (Yang et al., 2001). Obwohl noch keine spezielle mRNA gefunden wurde, die NXF3 als Exportfaktor benötigt, kann NXF3 *in vivo* an mRNA binden und diese exportieren. Möglicherweise stellt NXF3 einen gewebespezifischen Exportfaktor für den Transport von mRNA über CRM1 dar.

1.2.6.5. Export von HIV-1 mRNA

Charakteristisch für Retroviren ist die Fähigkeit, ihr RNA-Genom in DNA umzuschreiben. Ein Vertreter der Retrovirusfamilie ist das humane Immundefizienzvirus (HIV). In einem Viruspartikel sind zwei RNA-Genome verpackt. Das Genom ist etwa 9 kb groß. HIV kann nicht-teilende Makrophagen und T-Zellen infizieren. Nach Bindung an CD4-Rezeptoren kommt es zur Virus-Zellmembran-Fusion, wodurch das Virus-Core in die Wirtszelle eindringt. Der Präintegrationskomplex formiert sich und wird in den Zellkern transportiert, woran mehrere Virusproteine wie Integrase, MA, Vpr und eine durch die reverse Transkription entstehende dreisträngige DNA-Zwischenform entscheidend beteiligt sind (Sherman und Greene, 2002). Die Virus-DNA wird in das Wirtsgenom eingebaut und als Provirus bezeichnet. Die DNA kodiert für vier Gag („*Group Specific Antigen*“)-Proteine [MA (Matrix), CA (Kapsid), NC (Nukleokapsid), p6], zwei Env („*Envelope*“)-Proteine [SU („*Surface*“ oder gp120, TM („*Transmembrane*“ oder gp41)], drei Pol („*Polymerase*“)-Proteine [PR (Protease), RT (reverse Transkriptase), IN (Integrase)] und sechs zusätzliche Proteine (Vif, Vpr, Nef, Tat, Rev, Vpu) (Frankel und Young, 1998).

Nach Transkription der Virus-DNA durch die zelluläre RNA-Polymerase II wird die RNA doppelt gespleißt und wie die zelluläre mRNA mit TAP/NXT1 in das Zytoplasma befördert. Diese komplett gespleißten, 2 kb großen mRNAs kodieren für die so genannten frühen viralen Proteine Tat, Nef und Rev (Cullen, 1998). Rev besitzt ein argininreiches Kernlokalisationsignal und wird mit Importin- β in den Zellkern gebracht. Dort bindet es mit dem argininreichen RNA-Bindungsmotiv, das zugleich als Kernlokalisationsignal fungiert, an das Rev-Response-Element (RRE, Nukleotide 7362-7596), welches in der nicht gespleißten 9 kb großen sowie in der einmal gespleißten 4 kb großen mRNA enthalten ist, in der komplett gespleißten mRNA jedoch fehlt (Malim et al., 1990). Die 4 kb und 9 kb großen mRNAs kodieren für die so genannten späten Virusproteine, außerdem stellt die ungespleißte 9 kb RNA das Genom neuer Viren dar. Das RRE liegt im *env*-Gen (Malim et al., 1989) und formt eine

Stem-Loop-Struktur (Malim et al., 1990). Zunächst bindet ein Rev-Molekül an das RRE, wodurch die Anlagerung weiterer Rev-Moleküle gefördert wird (Malim und Cullen, 1991). Rev besitzt ein leucinreiches Kernexportsignal (Fischer et al., 1995), das als Prototyp für den Export mithilfe des Exportfaktors CRM1 gilt. Ran-GTP (Askjaer et al., 1998), der zelluläre Kofaktor eIF5A (eukaryotischer Initiationsfaktor 5A)(siehe 1.2.8.2.) und Aktin sind ebenfalls beim Export beteiligt (Hofmann et al., 2001). Neben eIF5A wurde hRIP/Rab (humanes nukleoporinähnliches Rev-interagierendes Protein/Rev-Aktivierungsdomäne-bindendes Protein) als zellulärer Kofaktor für den Export der HIV-RNA beschrieben (Bogerd et al., 1995). Eine schematische Darstellung des HIV-1 mRNA-Exportes ist in Abb. 1.7. zu sehen (Cullen, 1998).

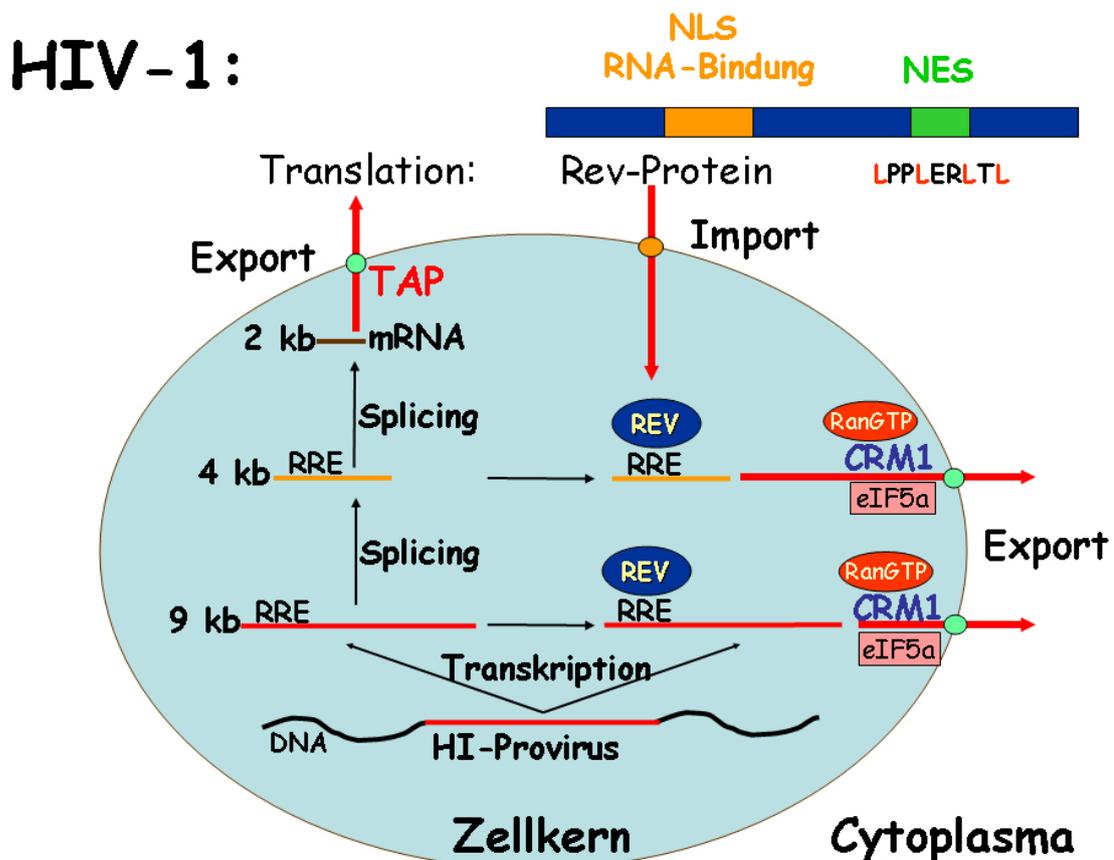


Abb. 1.7.: HIV-1 mRNA-Export (modifiziert nach Cullen, 1998).

Außerdem wurde ein zelluläres Protein der DEAD (D-E-A-D: Asp-Glu-Ala-Asp)-Box-Familie, DDX3 (DEAD-Box-Protein 3), identifiziert, das *in vivo* sowohl mit CRM1 als auch mit Rev interagieren kann. DDX3 ist ein nukleozytoplasmatisches Shuttelprotein, das auch an der zytoplasmatischen Seite des Kernporenkomplexes lokalisiert ist. DEAD-Box-Helikasen benötigen Energie, die aus der Hydrolyse von ATP frei wird, um RNA-Strukturen aufzuwinden und um Proteine von RNA abzulösen. Da es beim Rev-vermittelten HIV-mRNA-Export, nicht aber beim zellulären Proteinexport eine Rolle zu spielen scheint, könnte es an der Umformung von mRNA-Exportkomplexen beteiligt

sein. Ob und in welcher Weise DDX3 auch beim zellulären CRM1-vermittelten RNA-Export mitwirkt, muss noch geklärt werden (Yedavalli et al., 2004, Cullen, 2005). In Abb. 1.8. ist der Export von zellulärer mRNA und HIV-1 mRNA gegenübergestellt (Cullen, 2005).

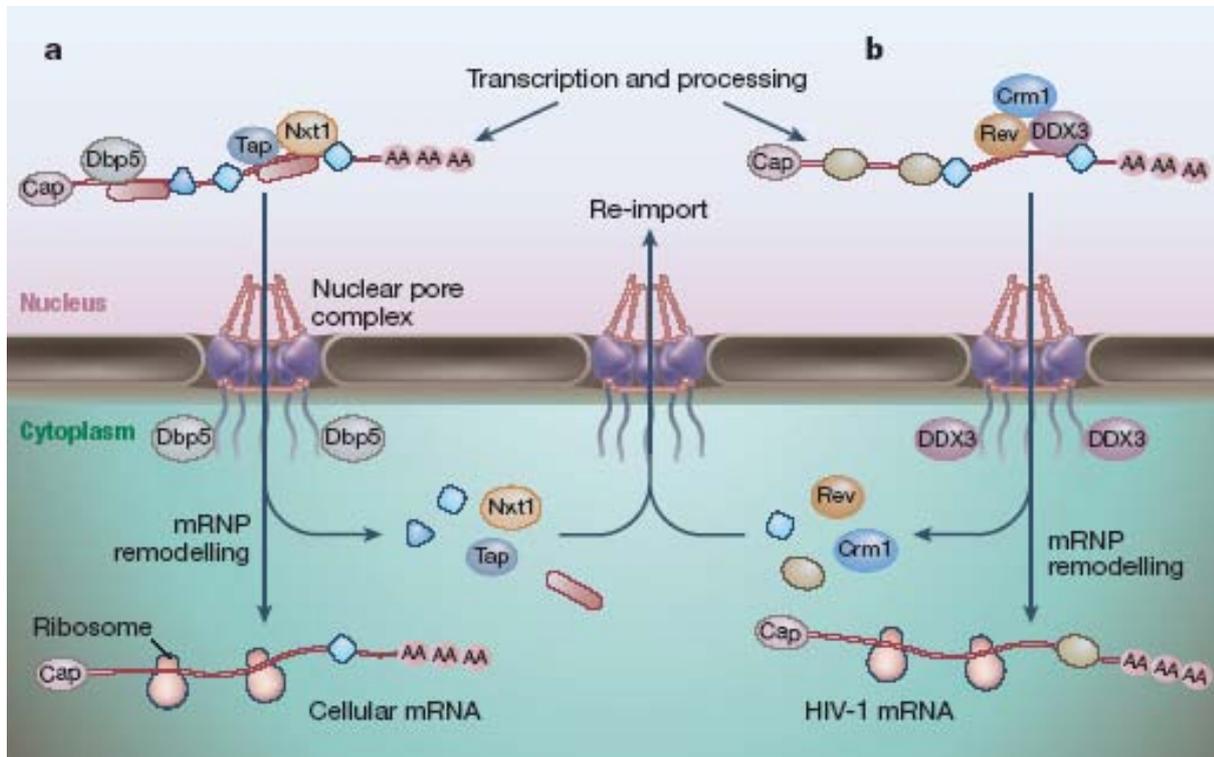


Abb. 1.8.: Export von zellulärer mRNA und HIV-1 mRNA (Cullen, 2005).

In a ist ein exportkompetentes zelluläres Transkript mit Tap, NXT1 und der RNA-Helikase Dbp5 gezeigt. Während des Transportes durch die Kernpore kommt es zum Umbau des mRNP durch das am mRNP und/oder am Kernporenkomplex gebundene Dbp5, wobei eine Reihe von Faktoren vom mRNP entlassen werden und in den Zellkern importiert werden. In b ist die HIV-1 mRNA mit den Faktoren Rev, CRM1 und der Helikase DDX3 gezeigt.

1.2.7. Energie beim Transport durch die Kernporen

Die Ras-verwandte GTPase Ran spielt beim nukleozytoplasmatischen Transport eine entscheidende Rolle. Ran liegt im Zellkern bevorzugt als Ran-GTP und im Zytoplasma als Ran-GDP vor. Diese Asymmetrie führt zu einem Gradienten, der den Transport über die Kernporen durch die Zusammenlagerung und Dissoziation der Transportkomplexe steuert (Joseph, 2006).

Im Zellkern führt die Bindung von Ran-GTP an einen Importkomplex zur Dissoziation der Importine von ihrem Transportsubstrat. Importin- β wird nun mit Ran-GTP in das Zytoplasma zurücktransportiert. Ran-GTP bindet ebenfalls im Zellkern in Anwesenheit eines Exportsubstrates mit hoher Affinität an den Exportfaktor (Weis, 2003). Nach dem Export in das Zytoplasma wird Ran-GTP durch GTP-Hydrolyse in Ran-GDP überführt. Ran hat eine geringe intrinsische GTP-Hydrolyse- und Nukleotidaustauschaktivität. Diese Reaktionen können enzymatisch katalysiert werden (Quimby und Dasso, 2003). Das zytoplasmatische Ran-Bindungsprotein 1 (RanBP1) bindet mit seiner Ran-

Bindungsdomäne an Ran-GTP und steigert so die Hydrolyse durch das Ran-GTPase-aktivierende zytoplasmatische Protein Ran-GAP um ein Vielfaches (Bischoff et al., 1995). Infolge der Hydrolyse kommt es zur Dissoziation der Exportkomplexe. Ran-GDP wird mit dem Kerntransportfaktor 2 (NTF2) in den Zellkern gebracht. Das Homodimer NTF2 bindet mit einer hydrophoben Tasche an Ran-GDP und an Phenylalanine von Nukleoporinen mit XFXFG-Wiederholungen, wie Nup62 (Allen et al., 2000). Im Zellkern wird Ran-GDP mithilfe des Ran-Nukleotid-Austauschfaktors RanGEF/RCC1 („*Regulator of Chromosome Condensation 1*“) in die GTP-gebundene Form überführt. RanGEF/RCC1 ist über die Histone H2A und H2B an Chromatin gebunden, was zu einer Verstärkung der Nukleotidaustauschaktivität um das Doppelte führt (Nemergut et al., 2001). Eine Übersicht über den Ran-Zyklus ist in Abbildung 1.9. zu sehen.

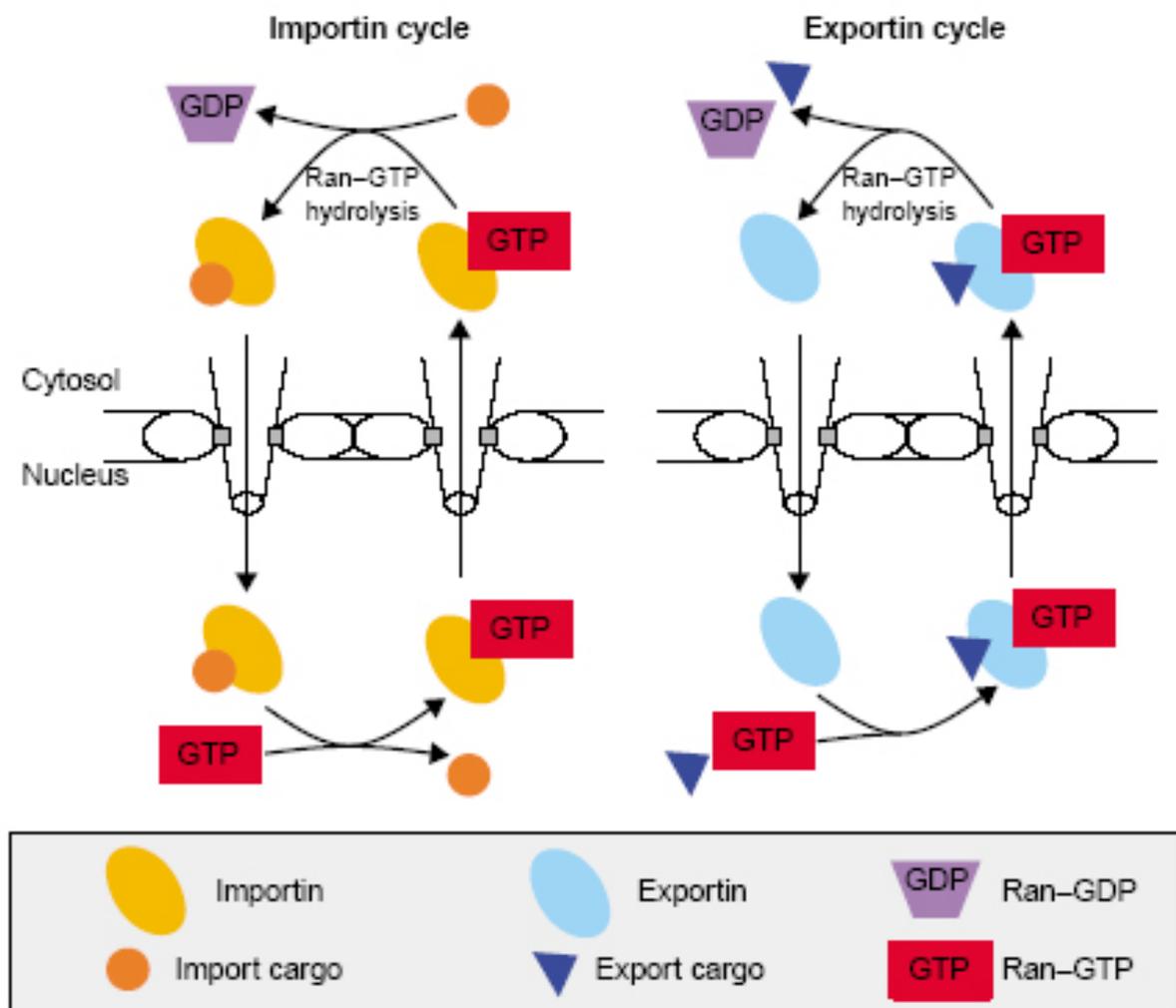


Abb. 1.9.: Übersicht über die Beteiligung von Ran-GDP und Ran-GTP beim Import und Export (Quimby und Dasso, 2003).

1.2.8. Export von CD83 mRNA

1.2.8.1. Dendritische Zellen und der CD83 Oberflächenrezeptor

Dendritische Zellen (DCs) sind die stärksten antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems. Sie sensibilisieren Helfer- und Killer-T-Lymphozyten und agieren dabei als natürliches Adjuvans bei der T-Zell-vermittelten Immunität. Intrazelluläre Antigene werden in Peptide zerlegt und über MHCs („*Major Histocompatibility Complexes*“) der Klasse I präsentiert. Diese werden von zytotoxischen T-Zellen erkannt, welche eine so gekennzeichnete Zelle töten können. Extrazelluläre Antigene werden endozytotisch aufgenommen, prozessiert und über MHCs der Klasse II präsentiert. Diese werden von T-Helferzellen erkannt (Banchereau und Steinman, 1998). CD83 („*Cluster of Diversity*“ 83), ein etwa 45 kDa großes Glykoprotein der Immunglobulinsuperfamilie, ist ein Oberflächenrezeptor auf reifen dendritischen Zellen, in einem geringen Ausmaß wird CD83 auch auf der Oberfläche aktivierter Lymphozyten exprimiert (Zhou et al., 1992; Zhou und Tedder, 1995). Da CD83 auf unreifen dendritischen Zellen nicht zu finden ist, stellt es den besten Marker für reife dendritische Zellen dar (Zhou und Tedder, 1996). Unreife DCs nehmen in peripheren Geweben Antigene auf, besitzen aber noch keine voll ausgebildete Fähigkeit, T-Zellen zu stimulieren. Nach entsprechenden Anreizen in Form von Antigenen oder Zytokinen kommt es auf dem Weg zu den T-Zell-haltigen Zonen der peripheren Lymphknoten zur Reifung (Dieu et al., 1998). Bei dendritischen Zellen spielt CD83 eine wichtige Rolle bei der T-Zell-vermittelten Immunität (Lechmann et al., 2001). Im Serum gesunder Personen findet man geringe Mengen lösliches CD83 (Hock et al., 2001). Bei Patienten mit bestimmten hämatologischen Neoplasien wie chronisch lymphatischer Leukämie und Mantelzelllymphomen oder rheumatischer Arthritis kommt es zu erhöhten Serumspiegeln (Hock et al., 2004; Hock et al., 2006). Lösliches CD83 ist in der Lage, die DC-vermittelte T-Zell-Aktivierung zu inhibieren (Lechmann et al., 2001).

1.2.8.2. Der eukaryotische Initiationsfaktor 5A (eIF5A) ist an der Reifung dendritischer Zellen beteiligt

1.2.8.2.1. Der eukaryotische Initiationsfaktor 5A (eIF5A)

Der eukaryotische Initiationsfaktor 5A (eIF5A) (Smit-McBride et al., 1989a) ist ubiquitär in Eukaryoten exprimiert (Gordon et al., 1987). Er ist auch in Archebakterien zu finden (Bartig et al., 1992). eIF5A ist das einzige bislang bekannte Protein mit der Aminosäure Hypusin (N-(4-amino-2-hydroxybutyl)-L-Lysin) (Park et al., 1982). Diese Modifikation entsteht als posttranslationelle Modifikation durch zwei Enzymreaktionen an der Aminosäure Lysin an Position 50. Zuerst katalysiert die Desoxyhypusinsynthase den Transfer einer 4-Aminobutylgruppe von Spermidin auf die ϵ -Aminogruppe von Lysin. Anschließend erfolgt die Hydroxylierung durch die

Desoxyhypusinhidrolase (Xu und Chen, 2001). In Eubakterien existiert ebenfalls ein dem eIF5A sehr ähnliches Protein, das allerdings nicht hypusinmodifiziert ist (Kyrpides und Woese, 1998). Eine Rolle von eIF5A bei der Translationsinitiation wurde zunächst angenommen, weil eIF5A aus der ribosomengebundenen Fraktion isoliert werden und in einem *in-vitro*-Experiment die Synthese von Methionyl-Puromycin stimulieren konnte (Benne et al., 1978; Park 1989; Smit-McBride et al., 1989b). Allerdings konnte eine direkte Korrelation zwischen eIF5A und der generellen Proteinsynthese nicht bestätigt werden, denn die Proteinsynthese kam trotz eIF5A-Funktionsverlust nicht zum Erliegen (Kang und Hershey, 1994).

eIF5A ist essentiell für das Überleben der Zelle und für die Zellproliferation, dennoch ist die physiologische Funktion von eIF5A weitgehend unklar (Xu et al., 2004). Hinweise erhofft man sich aus der Charakterisierung von Bindungspartnern. eIF5A besitzt mit den basischen Aminosäuren um das Hypusin und einer dem RNA-Bindungsmotiv des prokaryotischen Kälteschockproteins CspA ähnlichen Domäne eine zweigeteilte RNA-Bindungsstelle (Kim et al., 1998, Peat et al., 1998). Außerdem findet sich carboxyterminal eine leucinreiche Domäne für Proteininteraktionen (Liu et al., 1997). *In vitro* kann eIF5A an das Rev-Response-Element (RRE) von HIV-1, U6 RNA (Liu et al., 1997) sowie weiteren RNA-Sequenzen mit den Konsensusmotiven UAACCA und AAAUGU binden (Xu und Chen, 2001; Xu et al., 2004). Daneben sind bereits Interaktionen mit der Desoxyhypusinsynthase (Lee et al., 1999), der Transglutaminase II (Singh et al., 1998), Syntenin (Li et al., 2004), L5 (Schatz et al., 1998), HIV-1-Rev (Ruhl et al., 1993), CRM1 (Rosorius et al., 1999), Exportin 4 (Lipowsky et al., 2000), Aktin und den Nukleoporinen Nup214/CAN, Nup153, Nup98 und Nup62 (Hofmann et al., 2001) beschrieben. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eIF5A hypusinabhängig und unter Beteiligung von RNA 80S-Ribosomen und assoziierte Proteine binden kann (Jao und Chen, 2006; Zanelli et al., 2006).

1.2.8.2.2. eIF5A und Kernexport

In somatischen Säugerzellen und in *Xenopus*-Oozyten befindet sich eIF5A sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma. Bemerkenswert ist aber die Anreicherung an der nukleoplasmatischen Seite der Kernhülle, insbesondere an den nukleären Filamenten der Kernporenkomplexe (Rosorius et al., 1999). Wichtige Hinweise auf die Beteiligung von eIF5A bei Transportprozessen resultieren auch aus Bindungsstudien. So wurde eIF5A als zellulärer Bindungspartner der HIV-1-Rev-trans-Aktivierungsdomäne (Ruhl et al., 1993) und des Exportfaktors CRM1 (Rosorius et al., 1999) identifiziert. eIF5A ist essentiell für die Anreicherung von Rev im Zytoplasma (Ruhl et al., 1993). eIF5A-Antikörper (Schatz et al., 1998; Elfgang et al., 1999) und eIF5A-Mutanten (Bevec et al., 1996; Elfgang et al., 1999) sind in der Lage, den Export von Rev und somit die HIV-1-Replikation zu blockieren. Der Export von eIF5A in das Zytoplasma benötigt Energie und ist durch den CRM1-Inhibitor Leptomycin B hemmbar (Rosorius et al., 1999). Allerdings scheint eIF5A nicht generell

beim CRM1-vermittelten Export von Proteinen mit leucinreichen Exportsignal beteiligt zu sein. Der Export des Proteinkinaseinhibitors (PKI) verläuft zwar mithilfe seines leucinreichen Exportsignals über den CRM1-Exportfaktor, wird aber durch eIF5A-Antikörper oder -Mutanten nicht beeinflusst (Elfgang et al., 1999).

In Vertebraten wurde ein Exportfaktor aus der Importin- β -Familie identifiziert, Exportin 4, an den eIF5A tausendmal stärker binden soll als an CRM1 (Lipowsky et al., 2000). Im Gegensatz zur Interaktion mit CRM1 soll hierfür jedoch die Hypusinylierung essentiell sein. Allerdings ist noch unklar, ob eIF5A mit weiteren Exportsubstraten oder alleine über Exportin 4 befördert wird, und welche Aufgabe das über Exportin 4 transportierte eIF5A im Zytoplasma wahrnimmt.

1.2.8.2.3. eIF5A in dendritischen Zellen

Die Expression von eIF5A ist während der Reifung dendritischer Zellen stark erhöht und spiegelt die Expression des CD83-Oberflächenrezeptors wider. Durch die Behandlung von dendritischen Zellen mit dem Hypusininhibitor GC7 (N¹-guanyl-1,7-diaminoheptan) wurden CD83-Transkripte im Zellkern angereichert und so die Oberflächenexpression von CD83 unterbunden. Hieraus wurde geschlossen, dass die Hypusinmodifikation und somit eIF5A erforderlich für die nukleozytoplasmatische Translokation und die Oberflächenexpression von CD83 sein könnte (Kruse et al., 2000).

1.2.8.2.4. Therapeutische Möglichkeiten für den Einsatz von Hypusininhibitoren

Die Entwicklung von Hypusininhibitoren könnten neue antivirale Therapiemöglichkeiten eröffnen. Ein neuer Desoxyhypusin-Hemmer (CNI-1493) wurde bereits viel versprechend an peripheren Blutmonozyten von HIV-1 infizierten Patienten getestet. Die Virusreplikation konnte deutlich gesenkt werden, wobei in Zellkulturen kein offensichtlicher Viabilitätsnachteil zu Tage getreten ist (Hauber et al., 2005). Hypusininhibitoren könnten auch für die Therapie BCR-ABL-positiver Leukämien interessant werden. Durch eine Philadelphia-Translokation t(9;22)(q34;q11) wird ein BCR/ABL-Fusionsgen mit der Expression eines Onkogens mit Tyrosinkinaseaktivität generiert. Der selektive Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib (STI571, Glivec (Novartis)) kann die Tyrosinkinaseaktivität durch Blockade der ATP-Bindungsstelle der Tyrosinkinase hemmen. Durch differentielle Proteinexpressionsanalysen in einer BCR-ABL-positiven Zelllinie mit und ohne Imatinibbehandlung konnte eine verminderte Expression von eIF5A nach Gabe des Tyrosinkinaseinhibitors beobachtet werden. Des Weiteren führten Hypusininhibitoren (Ciclopirox, CPX; N¹-guanyl-1,7-diaminoheptan, GC7) zu einem selektiven antiproliferativen Effekt in BCR-ABL-positiven Zellen. Der Effekt konnte durch die Kombination mit Imatinib gesteigert werden. Ein großes Problem bei der Therapie mit Imatinib stellt die Entwicklung von Resistenzen dar. Hypusininhibitoren wirkten in Zellkulturversuchen jedoch auch in Imatinib-resistenten Zellen antiproliferativ (Balabanov et al., 2007).

1.2.8.3. Das Shuttelprotein HuR, ein Mitglied der ELAV-Familie, bindet an CD83 mRNA und beeinflusst die CD83-Oberflächenexpression

1.2.8.3.1. HuR stabilisiert Transkripte mit AU-reichen Sequenzelementen

HuR gehört zu einer Familie RNA-bindender Proteine, die mit dem ELAV Protein („*Embryonic Lethal Abnormal Vision*“) in *Drosophila melanogaster* verwandt ist. Die Proteine der ELAV-Familie sind in Vertebraten hoch konserviert (Good, 1995). Beim Menschen sind vier Vertreter dieser ELAV-Familie bekannt. HuR, auch HuA genannt, wird in allen Geweben exprimiert (Ma et al., 1996), während HuC und HuD (Szabo et al., 1991) neuronenspezifisch sind, und HuB (auch Hel-N1 genannt) sowohl in Neuronen als auch in Geschlechtsorganen exprimiert wird (Levine et al., 1993; Antic et al., 1997). Bei *Xenopus laevis* konnten ebenfalls vier *elav*-ähnliche Gene identifiziert werden. Eine Expression von ElrA („*ELAV-related-Protein A*“) wurde in allen Geweben detektiert, während ElrC und ElrD nur im Gehirn und ElrB sowohl im Gehirn als auch in den Geschlechtsorganen nachgewiesen werden konnten (Good, 1995). Alle Hu-Proteine und ihre *Xenopus*-Äquivalente besitzen drei klassische RNA-Erkennungs-Motive („*RNA Recognition Motif*“, RRM) (Brennan und Steitz, 2001; Good 1995).

Eine wichtige posttranskriptionelle Regulation der Genexpression stellt die Stabilität der mRNA dar (Wickens et al., 1997). Die Transkripte vieler so genannter *Early Response Gene* (ERGs), die für Zytokine, Lymphokine und Protoonkogene kodieren, sind im Gegensatz zu Transkripten von Haushaltsgenen sehr instabil. Sie beinhalten nämlich in der 3' untranslatierten Region (3'-UTR) *cis*-aktive Sequenzelemente, die so genannten AU-reichen Elemente (ARE) (Caput et al., 1986; Shaw und Kamen, 1986). AU-reiche Elemente können je nach ihrer Sequenz und ihrer Abbaucharakteristik in drei Klassen eingeteilt werden (Chen und Shyu, 1995; Brennan und Steitz, 2001). Klasse I ARE findet man hauptsächlich in Transkripten von Protoonkogenen wie zum Beispiel *c-fos*. Sie bestehen aus ein bis drei Kopien von AUUUA-Pentameren, eingebettet in uracilreiche Regionen. Klasse II ARE kommen meist in mRNAs von Zytokinen vor, wie zum Beispiel bei Transkripten des Granulozyten-Monozyten-koloniestimulierenden Faktors (GM-CSF). Sie besitzen mindestens zwei überlappende Kopien der Nonamersequenz UUAUUUA(U/A)(U/A) (Lagnado et al., 1994), ebenfalls eingebettet in uracilreiche Regionen. Bei Klasse III ARE, wie zum Beispiel bei Transkripten von *c-jun*, fehlt das typische AUUUA-Motiv. Dort existieren aber uracilreiche Sequenzen. Bei ARE der Klasse I und III erscheinen im Gegensatz zu ARE der Klasse II intermediäre Degradationsprodukte mit poly-A-Schwänzen.

HuR bindet an AU-reiche Elemente aller drei ARE-Klassen (Myer et al., 1997; Brennan und Steitz, 2001) und führt zur Stabilisierung der Transkripte (Fan und Steitz 1998b; Peng et al., 1998). Es stellt somit einen Gegenspieler zu den destabilisierend wirkenden Proteinen hnRNP D („*Heterogenous Nuclear Ribonucleoprotein*“ D, auch AUF1 genannt) (Loflin et al., 1999) sowie KSRP (Chen et al.,

2001; Gherzi et al., 2004) und Tristetraprolin (TTP)(Lai et al., 1999; Lai et al., 2000) dar. Wichtig für die Bindung von HUR an AREs sind seine RNA-Erkennungsmotive 1 und 2 (RRM 1 und 2), während HuR gleichzeitig mit dem dritten RNA-Erkennungsmotiv (RRM 3) an den polyadenylierten Schwanz der mRNAs bindet (Ma et al., 1997).

1.2.8.3.2. HuR ist ein Shuttelprotein

HuR ist vorzugsweise im Zellkern lokalisiert (Fan und Steitz, 1998b), shuttelt aber zwischen Zellkern und Zytoplasma mithilfe einer HuR-nukleozytoplasmatischen-Shuttelsequenz (HNS), die in der Scharnierregion zwischen dem zweiten und dritten RNA-Erkennungsmotiv liegt (Fan und Steitz, 1998a). Der basische Sequenzbereich (205-RRFGGPVHHQAQRFRF-220) besitzt mit den Argininen (kursiv gekennzeichnet) Ähnlichkeiten zu einem klassischen zweigeteilten Kernlokalisierungssignal, das aus zwei Clustern der basischen Aminosäuren Arginin und Lysin mit einem Spacer von zehn Aminosäuren besteht. Deletionsexperimente haben gezeigt, dass das erste Arginin-Cluster der HNS für den Import in den Zellkern essentiell ist. Im Gegensatz zu den klassischen NLSs ist die Kernlokalisationsaktivität der HNS jedoch abhängig von der transkriptionellen Aktivität der Polymerase II (Peng et al., 1998; Fan und Steitz, 1998a). Die HNS ähnelt in ihrem Verhalten den Shuttelsequenzen M9 von hnRNP A1 (Michael et al., 1995) und der Shutteldomäne von hnRNP K (Michael et al., 1997), welche ebenfalls nach Transkriptionshemmung im Zytoplasma anreichern. Die Shuttelsequenz HNS enthält ein bislang unbekanntes Kernexportsignal (Fan und Steitz, 1998a).

Es sind vier Bindungspartner für HuR identifiziert worden, Set α , Set β , PP32 und APRIL („*Acidic Protein Rich In Leucine*“). Alle vier dieser Proteine besitzen einen langen sauren Carboxyterminus, der mit der Scharnierregion und der RRM3 des HuR interagiert. Set α und Set β sind möglicherweise Spleißvarianten (Brennan et al., 2000). Sie binden an Histon/DNA-Komplexe und formen die Chromatinstruktur *in vitro* um (Okuwaki und Nagata, 1998). Bei einer Variante einer akuten undifferenzierten Leukämie ist das Gen für Set mit dem Gen für Nup214/CAN durch eine Translokation fusioniert (von Lindern et al., 1992). Set α , Set β und PP32 sind als Phosphatase 2A-Inhibitoren beschrieben (Li et al., 1996; Saito et al., 1999). PP32 und APRIL zeigten eine nukleäre Lokalisation. Sie besitzen mehrere leucinreiche HIV-1-Rev-NES-ähnliche Sequenzen und zeigen ähnlich wie HuR Shuttelaktivität. Der Export von PP32 und APRIL, nicht aber von HuR, konnte durch den CRM1-Inhibitor Leptomycin B (LMB) gehemmt werden. Es wurde allerdings gezeigt, dass HuR in Abwesenheit von LMB nur mit zytoplasmatischer polyadenylierter RNA vernetzt werden konnte, während in Anwesenheit von LMB RNA im Zellkern und im Zytoplasma an HuR gebunden war. (Brennan et al., 2000). Nach Hitzeschock war der Kernexport von HuR ebenfalls Leptomycin-sensibel (Gallouzi et al., 2001). Dies legt die Vermutung nahe, dass mindestens zwei Exportwege für HuR existieren. Einerseits CRM1-unabhängig mithilfe der Shuttelsequenz HNS, andererseits CRM1-abhängig unter Beteiligung von Bindungspartnern mit leucinreichen Exportsignalen.

Hitzeschockprotein 70 (Hsp70)-Transkripte besitzen ein ARE der Klasse III, das nach Hitzeschock mit HuR interagiert. Erste Hinweise deuteten auf einen CRM1-abhängigen Export von Hsp70 mRNA nach Hitzeschock, weshalb dem HuR eine Rolle als Exportadapter beim Export dieser Transkripte, vermutlich mit APRIL und PP32 zugeschrieben wurde (Gallouzi et al., 2001). Ein CRM1-abhängiger Hsp70 mRNA-Export ließ sich jedoch nicht bestätigen (Gallouzi et al., 2001, Retraction in part, 2003).

1.2.8.3.3. HuR bindet an die CD83 mRNA und beeinflusst die CD83-Oberflächenexpression

CD83-Transkripte besitzen kein erkennbares ARE in der 3'-UTR. Dennoch konnte innerhalb der kodierenden Sequenz ein neues *cis*-aktives RNA-Element (Nukleotide 466-615) gefunden werden, welches mit HuR interagiert. Dieses HuR-*Response*-Element (HRE) oder *cis*-aktive posttranskriptionelle regulatorische Element (PRE) formt eine *Stem-Loop*-Struktur aus. Die Bindung von HuR an CD83-Transkripte beeinflusst jedoch nicht deren Stabilität. Durch *Knockdown* von HuR mit Interferenz-RNA konnte die *de-novo*-Synthese von CD83 und somit die CD83-Oberflächenexpression verhindert werden. Die CD83-Transkripte wurden im Zellkern angereichert. Eine Anreicherung von CD83 mRNA im Zellkern resultierte ebenfalls nach einer Blockade des CRM1-vermittelten Exportweges. Vermutlich fungiert HuR auch im Falle der CD83-Transkripte als Exportadapter, welcher möglicherweise bereits kotranskriptionell rekrutiert wird (Prechtel et al., 2006).

1.2.9. Transkription und Export sind miteinander gekoppelt

In Hefezellen konnte die interessante Beobachtung gemacht werden, dass besonders aktive Gene in die Zellkernperipherie lokalisieren und mit Transportfaktoren der Importin- β -Familie und Nukleoporinen assoziieren (Casolari et al., 2004). Im Allgemeinen spielt die Zellkernperipherie jedoch eine Rolle beim „Gene Silencing“. Dennoch sind Transkription, Prozessierung der RNA und ihr Transport zur Translationsmaschinerie miteinander verflochten (siehe 1.2.6.4.). Die Proteinzusammensetzung an der RNA passt sich dabei den jeweiligen Gegebenheiten an. Verläuft die Maturation der Transkripte nicht regelrecht, wird die RNA letztendlich im Zellkern retiniert (Reed, 2003). Manche Proteine, wie das Dbp5 (siehe 1.2.6.4.) binden bereits kotranskriptionell an die RNA und begleiten die RNA bis in das Zytoplasma. Bestimmte Proteine sind an mehreren Prozessen beteiligt. Beispielsweise spielt Kernaktin sowohl bei der Transkription aller drei RNA-Polymerasen, als auch beim Export verschiedener RNA-Klassen eine Rolle. Im Folgenden soll die Transkription verschiedener RNA-Klassen sowie der Einfluss von Aktin und Myosin bei der Transkription erläutert werden.

1.3. Die Transkription

1.3.1. Die RNA-Polymerase I-abhängige Transkription im Nukleolus

1.3.1.1. Der Nukleolus ist der Ort der RNA-Polymerase I-abhängigen Transkription

In menschlichen somatischen Zellen sind etwa 300-400 rRNA-Gene in zehn Nukleolus-Organisator-Regionen (NORs) an den akrozentrischen Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22 zu finden. In der späten Telophase bilden sich um diese rDNA Nukleolen aus, die während der Interphase persistieren und sich auflösen, wenn die Zelle in die Mitose eintritt (Lam et al., 2005). Manche Bestandteile des RNA-Polymerase I-Transkriptionssapparates bleiben während der Mitose an den NORs gebunden. Die Struktur des Nukleolus ist weitgehend von seiner Aufgabe als Ribosomenfabrik bestimmt, da die Herstellung der Ribosomenuntereinheiten ein vektorieller Prozess ist (Olson und Dundr, 2005). Menschliche Nukleolen weisen eine typische Aufteilung in drei Kompartimente auf. Diese Dreiteilung soll sich erst spät in der Evolution bei den Amnioten aus einer Zweiteilung entwickelt haben (Thiry und Lafontaine, 2005). Dennoch konnte bei amplifizierten Nukleolen von *Xenopus*-Oozyten ebenfalls eine Dreiteilung gesehen werden (Mais und Scheer, 2001). Eine blasse Struktur bildet das fibrilläre Zentrum (FC). Es enthält die RNA-Polymerase I, DNA-Topoisomerase I und den Transkriptionsfaktor UBF („*Upstream Binding Factor*“) (Scheer und Weisenberger, 1994). Das fibrilläre Zentrum ist partiell oder komplett umgeben von einer Schicht mit dichtem fibrösem Material, der sogenannten dichten fibrillären Komponente (DFC). Hier ist neben Transkriptionsfaktoren auch das Protein Fibrillarin zu finden, welches in die Prozessierung und Modifikation von prä-rRNA und bei der Zusammenlagerung von rRNA mit ribosomalen Proteinen eine Rolle spielt (Tollervey et al., 1993). FC und DFC sind eingebettet in die granuläre Komponente (GC), die angereichert ist mit ribosomalen Proteinen und Faktoren für den Zusammenbau der Ribosomenuntereinheiten (Huang, 2002). Nukleolen können von einer Schicht kondensiertem Chromatin, dem perinukleolärem Chromatin, umgeben sein, das manchmal weit in den Nukleolus hineinreicht (Thiry und Lafontaine, 2005).

Bis heute ist der Ort der rDNA-Transkription Gegenstand kontroverser Diskussionen. Die Meinungen gehen zwischen der Lokalisation der Transkription im FC, an der Grenze von FC und DFC und im DFC auseinander (Huang, 2002; Thiry und Lafontaine, 2005).

Mit den so genannten Miller-Spreitungen (Miller und Beatty, 1969) kann die rRNA, die gerade an transkriptionell aktiven rDNA-Templates synthetisiert wird, als christbaumartige Struktur dargestellt werden. Zehn bis 14 Nanometer große Partikel, die RNA-Polymerase I enthalten, liegen dicht aufeinander folgend an der rDNA. Von ihnen gehen die entstehenden rRNA-Transkripte aus, die an ihrem 5'-Ende ein 25 Nanometer großes Endknäuel aus prä-rRNA-Prozessierungskomplexen tragen (Scheer und Weisenberger, 1994).

Für die Ribosomenbiosynthese im Nukleolus sind Transkriptionsprodukte der RNA-Polymerasen I, II und III erforderlich. Die RNA-Polymerase I transkribiert die 28S, 18S und 5,8S rRNA im Nukleolus, die RNA-Polymerase III die 5S rRNA und verschiedene kleine RNAs außerhalb des Nukleolus. Die RNA-Polymerase II stellt die Transkripte für die Translation ribosomaler Proteine her. Eukaryotische 80S Ribosomen setzen sich aus der großen 60S (28S, 5,8S und 5S rRNA) und der kleinen 40S (18S rRNA) Untereinheit zusammen. Beide Untereinheiten zusammen beinhalten ungefähr 80 ribosomale Proteine.

1.3.1.2. Die RNA-Polymerase I-abhängige Transkription

Die 28S, 18S und 5,8S rDNA ist als Transkriptionseinheit organisiert. Die Transkriptionseinheiten sind durch intergenische Spacer voneinander getrennt. Die rDNA-Transkriptionseinheit besitzt neben der Information für den 18S-5,8S-28S-rRNA-Präkursor Sequenzelemente für die Regulierung der prä-rRNA-Transkription wie Promoter, Enhancer, Spacer Promoter, Replikationsstart und Transkriptionsterminatoren (Grummt, 2003). Die Organisation einer rDNA-Transkriptionseinheit ist in Abb. 1.10. zu sehen.



Abb. 1.10.: Organisation einer rDNA-Transkriptionseinheit

IGS: intergenischer Spacer; ENH: Enhancer; SP: Spacer; SPT: Spacer Promoter; UCE: „Upstream Core Element“; Core: Core Promoter; 5'ETS: 5' externer transkribierter Spacer; ITS 1 und 2: interner transkribierter Spacer; Term: Transkriptionsterminator. Modifiziert nach Raška, 2003; Copenhaver et al., 1994.

Der Promoter besteht aus einem „Start Site Proximal Core Promoter“ (CP) und einem „Upstream Control Element“ (UCE). Die Bildung des Präinitiationskomplexes erfordert die Bindung des Upstream-Bindungsfaktor (UBF) und des TIF-IB/Selektivitätsfaktor 1-Proteinkomplexes (SL1; in der Maus TIF-IB (Transkriptionsinitiationsfaktor IB) genannt) an den Promoter. Die Tandem-HMG-Boxen erlauben einem einzigen Dimer von UBF die DNA so zu verbiegen, dass der „Core Promoter“ und das „Upstream Control Element“ in unmittelbare Nachbarschaft gebracht werden (Abb. 1.11.)(A; Bazett-Jones et al., 1994; Moss und Stefanovsky, 2002). Der TIF-IB/SL1-Komplex besteht aus TATA-bindendem Protein (TBP) und drei RNA-Polymerase I-spezifischen TBP-assoziierten Faktoren TAF₁48, TAF₁68/63 und TAF₁95/110, die den Promoter erkennen (Comai et al., 1992, Eberhard et al., 1993, Heix et al., 1997). Die Rekrutierung des RNA-Polymerase I-Holoenzymkomplexes an den rDNA-Promoter kommt durch die Interaktion von UBF mit PAF53 (polymeraseassoziiierter Faktor 53), einer der 14 Untereinheiten der RNA-Polymerase I, und der Interaktion von TIF-IB/SL1 mit TIF-IA zustande (Seither et al., 1997). TIF-IA ist das Säugerhomolog zum Hefeprotein Rrn3p, einem regulatorischen Faktor, der mit initiationskompetenten Untereinheiten der RNA-Polymerase I assoziiert (Bodem et al., 2000). Wichtig für die Bindung von TIF-IA an die RNA-Polymerase I und

somit für die Transkriptionsaktivierung ist die Phosphorylierung von TIF-IA am Serin 649 durch die ribosomale S6-Kinase (Zhao, 2003).

Der RNA-Polymerase I-Holoenzymkomplex beinhaltet Faktoren, die für die Transkriptionsinitiation, die Reifung der rRNA, die Chromatinmodifikation oder der DNA-Reparatur eine Rolle spielen. Ein Bestandteil dieses Multienzymkomplexes ist der TFIIF-Proteinkomplex, der essentiell bei der Transkription von proteinkodierenden Genen und der DNA-Reparatur ist (Grummt, 2003).

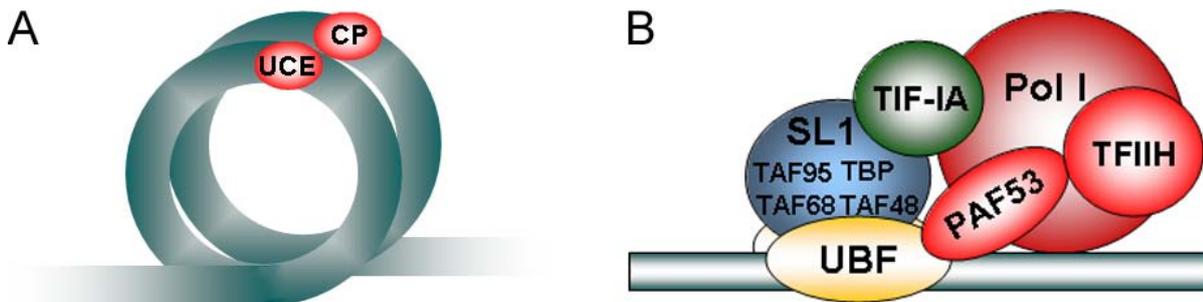


Abb. 1.11.: Die Bildung des Polymerase I-Initiationskomplexes.

UBF verbiegt die DNA so, dass der „Core Promoter“ (CP) und das „Upstream Control Element“ (UCE) in unmittelbare Nachbarschaft gebracht werden (A; nach Moss und Stefanovsky, 2002). In B ist der Polymerase I-Initiationskomplex zu sehen (Moss und Stevanovski, 2002; Grummt, 2003).

1.3.2. Die RNA-Polymerase II-abhängige Transkription

Die Eukaryoten-DNA ist in so genannten Nukleosomen organisiert. Je zwei Histone H2A, H2B, H3 und H4 bilden ein Oktamer, um das die DNA in eindreiviertel Windungen gewickelt ist, was 146 Basenpaaren entspricht (Wolffe, 1992). Diese Organisation resultiert in der Unterdrückung der Transkription. Nach der Entfernung der Histonoktamere von der TATA-Box und der Startstelle aktiver Gene (Boeger et al., 2004) kann sich der RNA-Polymerase II-Transkriptionsinitiationskomplex an nackten DNA-Molekülen aufbauen (Boeger et al., 2005).

Die RNA-Polymerase II-Transkriptionsmaschinerie besteht aus den drei Komponenten Polymerase, generelle Transkriptionsfaktoren und Mediator-Komplex. Die aus zwölf Untereinheiten bestehende RNA-Polymerase II kann die RNA synthetisieren und besitzt außerdem eine Fehlerkorrekturfunktion. Sie stellt die Plattform für die Anlagerung anderer Komponenten dar. Die fünf generellen Transkriptionsfaktoren TFIIB, D, E, F und H erkennen den Promoter und entwinden die Promoter-DNA. Der aus 20 Untereinheiten bestehende Mediator-Komplex (Kornberg, 2005; Roeder, 2005) übermittelt regulatorische Informationen von aktivierenden und unterdrückenden Proteinen an die RNA-Polymerase II. Der Mediator-Komplex selbst kann nicht an spezifischen DNA-Sequenzen binden, er interagiert direkt mit der RNA-Polymerase II. Die eukaryotische Transkription kann prinzipiell in fünf Schritte eingeteilt werden: Ausbildung des Präinitiationskomplexes, Transkriptionsinitiation, Vorbereitung zur Ablösung vom Promoter, Ablösung vom Promoter und Transkriptverlängerung

(Kugel und Goodrich, 2002).

Für die Ausbildung des Präinitiationskomplexes (PIC) wird ein DNA-Template, die RNA-Polymerase II, die fünf generellen Transkriptionsfaktoren und der Mediator-Komplex benötigt. TFIID besteht aus einem TATA-bindenden Protein (TBP) und ungefähr zehn TBP-assoziierten Faktoren (TAFs). Nach der Bindung des TBP an die TATA-Box wird TFIIB an den DNA-TBP-Komplex angelagert. TFIIB kann auch an das basale Repressorelement (BRE) binden, eine Sequenz, die in manchen Promoterregionen unmittelbar *upstream* der TATA-Box zu finden ist und die basale Transkription unterdrückt. Durch die Bindung von unphosphorylierter RNA-Polymerase II und TFIIF wird der Komplex aus DNA-TBP und TFIIB stabilisiert. TFIIF besteht aus zwei großen (TFII α /RAP74) und zwei kleinen (TFII β /RAP30) Untereinheiten, die mit der Template-DNA interagieren. Dann werden TFIIE und anschließend TFIIH zum Präinitiationskomplex rekrutiert. TFIIE besteht ebenfalls aus zwei großen (TFIIIE α) und zwei kleinen (TFIIIE β) Untereinheiten und formt Promoterkontakte aus. TFIIH besteht aus neun Untereinheiten, und besitzt drei katalytische Zentren, zwei ATP-abhängige DNA-Helikasen und eine Cyklin-abhängige Proteinkinase. Neben seiner Rolle bei der Transkription wirkt TFIIH auch bei der DNA-Reparatur.

Die größte Untereinheit der RNA-Polymerase II besitzt eine carboxyterminale Domäne (CTD) mit der Heptapeptidwiederholung [Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser]. Die CTD spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation der Transkriptionsinitiation und der Koordination der kotranskriptionellen mRNA-Prozessierung, die durch CTD-Kinasen moduliert wird. Eine CTD-Phosphatase recycelt die phosphorylierte Polymerase (Woychik und Hampsey, 2002).

Nach der Bildung des Präinitiationskomplexes werden die ersten drei Nukleotide des Transkriptes produziert. Dann formt sich ein stabiler Komplex, der eine RNA mit einer Länge von vier Nukleotiden enthält und die Promoterablösung vorbereitet. Diese stabilen Komplexe vollziehen die Ablösung vom Promoter während der Knüpfung der vierten bis vierzehnten Phosphodiesterbindung (Kugel und Goodrich, 2002).

1.3.3. Die RNA-Polymerase III-abhängige Transkription

Die RNA-Polymerase III ist die größte der RNA-Polymerasen und besitzt 17 Untereinheiten (Schramm und Hernandez, 2002). Sie produziert kurze nichttranslatierte RNAs wie 5S rRNA, tRNA, 7SL RNA (eine essentielle Komponente des Signalerkennungspartikels), 7SK RNA (reguliert die RNA-Polymerase II-Transkription), MRP, U6 und H1 RNA-Moleküle (posttranskriptionelle Prozessierung der rRNA, mRNA bzw. tRNA). Die RNA-Polymerase III transkribiert ebenfalls die SINE-Gene (White, 2005).

Die interne Kontrollregion der 5S DNA besteht aus drei Promoterelementen, der Box A, Box C und einem dazwischen liegenden Element (Christensen et al., 1991). Der Transkriptionsfaktor IIIA (TFIIIA) bindet mit den Zinkfinger-motiven an die interne Kontrollregion (siehe 1.3.3.1.) und bildet

zusammen mit den Transkriptionsfaktoren TFIIIB und TFIIIC einen stabilen Transkriptionsinitiationskomplex, der von der RNA-Polymerase III erkannt wird (Wolffe und Brown, 1988). Neu synthetisierte 5S rRNA interagiert kurzfristig mit dem Protein La, das in der Termination von RNA-Polymerase III-Transkripten eine Rolle spielt (Gottlieb und Steitz, 1989). Anschließend bildet die 5S rRNA mit dem ribosomalen Protein L5 den 5S RNP-Komplex, der im Nukleolus in die 60S-Ribosomenuntereinheit eingebaut wird (Steitz et al., 1988).

In Amphibienoozyten weist die 5S DNA Besonderheiten auf. *Xenopus*-Oozyten enthalten drei Arten von 5S rRNA-Genen, nämlich zwei Klassen von 5S rRNA-Genen vom Oozyten-Typ (20.000 „*major oocyte*“ und 1300 „*trace oocyte*“ 5S rRNA-Gene pro haploidem Genom) und eine Klasse von 5S rRNA-Genen vom somatischen Typ (400 „*somatic*“ 5S rRNA-Gene pro haploidem Genom). Die oozytentypischen Gene unterscheiden sich von den somatischen Genen in sechs Nukleotiden und den Spacern. Oozytentypische 5S rRNA-Gene sind hauptsächlich während der Oogenese aktiv, während somatische 5S rRNA-Gene sowohl während der Oogenese, der Embryogenese und in somatischen Zellen transkribiert werden (Wolffe und Brown, 1988).

In prävitellogenen Oozyten wird die oozytentypische 5S rRNA als Bestandteil der 7S oder 42S Ribonukleoproteinkomplexe (7S RNPs, 42S RNPs) im Zytoplasma gelagert. Die 7S RNPs bestehen aus je einem Molekül 5S rRNA und TFIIIA (Joho et al., 1990). Die 42S RNPs setzen sich aus der 5S rRNA, den Proteinen p43 und p50, sowie tRNAs im molekularen Verhältnis von 1:1:2:3 zusammen und liegen in unreifen Oozyten als Tetramer vor (Picard et al., 1980). Das Protein p43 besitzt wie sein Verwandter TFIIIA neun Zinkfinger, bindet im Gegensatz zu TFIIIA aber nur an die 5S rRNA, nicht an die 5S rDNA (Joho et al., 1990). Das Protein p50 dagegen interagiert mit den tRNA-Molekülen und ist mit dem Elongationsfaktor 1 α verwandt (Mattaj et al., 1987). Mit Beginn der Vitellogenese wird TFIIIA zunehmend vom ribosomalen Protein L5 aus den 7S RNPs verdrängt. Der 5S RNP-Komplex aus 5S rRNA und L5 wird in den Zellkern importiert und in den amplifizierten Nukleolen in die 60S Ribosomenuntereinheit eingebaut (Allison et al., 1991). Wie TFIIIA bindet L5 an die 5S rRNA. Während die TFIIIA-Bindung an 5S rRNA hochspezifisch ist und bereits durch den Austausch eines einzigen Nukleotids gestört werden kann, toleriert L5 jedoch gewisse strukturelle Veränderungen der 5S rRNA (Guddat et al., 1990). Der Anteil der 42S RNPs nimmt ebenfalls mit Beginn der Vitellogenese drastisch ab (Dixon und Ford, 1982a,b).

Die Gene für die tRNAs beinhalten ebenfalls interne Promotoren, die vom großen DNA-bindenden Transkriptionsfaktor TFIIIC erkannt werden. TFIIIC rekrutiert TFIIIB zum Promoter. Die RNA-Polymerase III wird von TFIIIC über die Startseite der Transkription platziert (White, 2004).

1.3.3.1. Der Transkriptionsfaktor IIIA (TFIIIA)

Der Transkriptionsfaktor IIIA (TFIIIA) gehört strukturell zur großen Superfamilie der Genregulationsproteine (Berg und Shi, 1996). Er besteht aus einer carboxyterminalen

Schwanzdomäne und neun Cys₂His₂-Zinkfingerdomänen (Miller et al., 1985), deren Zink für die Proteinfunktion essentiell ist (Hanas et al., 1983). Bei Mammaliern und Amphibien sind strukturelle und funktionelle Bereiche konserviert, der *Xenopus*-TFIIIA kann funktionell humanen TFIIIA ersetzen und umgekehrt (Moorefield und Roeder, 1994; Hanas et al., 2002).

In Säugern wird vermutlich nur eine Form von TFIIIA synthetisiert (Hanas et al., 2002). Bei *Xenopus laevis* existiert TFIIIA jedoch in zwei Isoformen: eine Isoform wird in somatischen Zellen exprimiert, eine um 22 Aminosäuren am Aminoterminus kürzere Form in Oozyten (Kim et al., 1990; Ogilvie und Hanas 1997). Die oozytentypische Form von TFIIIA wird in der frühen Oogenese in hohen Mengen hergestellt, die Konzentration sinkt aber bis zum Ende der Oogenese stark ab (Shastry et al., 1984).

TFIIIA nimmt in den Oozyten zwei Funktionen wahr. Einerseits ist TFIIIA notwendig für die RNA-Polymerase III-abhängige 5S rRNA-Transkription. Es bindet an die interne Kontrollregion der 5S rDNA (Engelke et al., 1980), welche für die Transkriptionsinitiation wichtig ist (Sakonju et al., 1980). Die interne Kontrollregion besteht aus drei Promoterelementen, der Box A, Box C und einem dazwischen liegenden Element (Christensen et al., 1991). Die drei aminoterminalen Zinkfinger von TFIIIA binden stark das Promoterelement Box C, während die Zinkfinger sieben bis neun mit der Box A, und die Zinkfinger vier bis sechs mit dem dazwischen liegenden Promoterelement interagieren (Lee et al., 2006). Zusammen mit den Transkriptionsfaktoren TFIIIB und TFIIIC formt TFIIIA einen stabilen Transkriptionsinitiationskomplex, der von der RNA-Polymerase III erkannt wird (Wolffe und Brown, 1988). Während der frühen *Xenopus*-Oogenese aktiviert TFIIIA so die Transkription großer Mengen 5S rRNA, bevor andere ribosomale Komponenten verfügbar sind.

Andererseits bindet der oozytentypische TFIIIA an die oozytentypischen 5S rRNA-Transkripte und formt den 7S RNP-Komplex (Honda und Roeder, 1980; Pelham und Brown, 1980; Allison et al., 1995). Die 5S rRNA wird durch ihre charakteristische Sekundärstruktur von TFIIIA erkannt. Obwohl TFIIIA über die gesamte Zinkfingerregion Kontakte zur 5S rRNA ausbildet, sind vor allem die zentralen Zinkfinger vier bis sechs für die Bindung entscheidend (Theunissen et al., 1998). Da TFIIIA in der carboxyterminalen Schwanzdomäne ein Exportsignal besitzt, welches funktionell das Exportsignal von HIV-1-Rev ersetzen kann (Fridell et al., 1996), gelangt der 7S RNP-Komplex vermutlich unter Beteiligung des Exportfaktor CRM1 und Ran-GTP in das Zytoplasma. Die 7S RNP-Partikel werden im Zytoplasma gelagert, weil Kernimportsignale durch die Bindung von TFIIIA an die 5S rRNA maskiert sind (Rudt und Pieler, 1996; Wischnewski et al., 2004). Wenn die Synthese der anderen ribosomalen Komponenten mit Beginn der Vitellogenese in den Oozyten stark ansteigt, wird neben der synthetisierten 5S rRNA vom somatischen Typ auch die im Zytoplasma gespeicherte 5S rRNA vom Oozytentyp für die Ribosomenbiogenese im Nukleolus benötigt. Da nun die Konzentration von L5 rapide ansteigt, wird TFIIIA durch L5 ersetzt. Es bildet sich der 5S RNP-Komplex aus L5 und 5S RNA, der durch die Interaktion mindestens eines der drei Kernlokalisierungssignale von L5 mit der Kernimportmaschinerie in den Kern transportiert wird (Rudt und Pieler, 2001)(siehe auch 1.3.3).

1.3.4. Aktin und Myosin

Aktin und Myosin wurden 1861 von Willy Kühne als Aktomyosin entdeckt. 1939 wurde die ATPase-Aktivität von Myosin durch Vladimir Engelhardt und Militza Lyubimova gefunden. Aktin selbst konnte 1941-1942 von Bruno Straub, Ilona Banga und Albert Szent-Gyorgyi aus Skelettmuskelextrakt isoliert werden (Pederson und Aebi, 2003; Pederson und Aebi, 2005). Erst gegen Ende der 1960er Jahre wurde auch in anderen Zellen so genanntes nichtmuskuläres Aktin und Myosin gefunden (Hatano und Oosawa, 1966; Adelman und Tayler, 1969; Ishikawa et al., 1969).

1.3.4.1. Kernaktin

Aktin ist eines der häufigsten Proteine der Zelle. In höheren Eukaryoten existieren drei Aktin-Isoformen. Das α -Aktin ist muskelspezifisch, während β -Aktin und γ -Aktin in allen Zelltypen exprimiert werden und auch im Zellkern vorkommen. Obwohl Aktin und Myosin in isolierten Zellkernen nachgewiesen werden konnten, glaubte man zunächst eher an eine zytoplasmatische Kontamination (Comings und Harris, 1976; Pederson und Aebi, 2003). Dann wurde allerdings die Anwesenheit von Aktin in Zellkernen von *Xenopus*-Oozyten demonstriert, wobei eine zytoplasmatische Kontamination durch die rasche Handisolation einzelner sauberer Zellkerne nahezu ausgeschlossen werden konnte. Allerdings stand dem nun gegenüber, dass es sich bei Oozyten um spezielle Zellen handele. Aktin wurde in Oozyten sowohl in frei diffusibler globulärer Form sowie als filamentärer Bestandteil des so genannten nukleoplasmatischen Gels gefunden. Unter bestimmten Isolationsbedingungen formt Aktin im Zellkern nämlich ein Gel, das auch Chromosomen, Nukleolen und andere Kernstrukturen enthält (Clark und Merriam, 1977; Clark und Rosenbaum, 1979). An Molchoozyten wurden diese Beobachtungen bestätigt (Gounon und Kasenti, 1981).

Das globuläre Polypeptid Aktin ist 42 kDa groß und besitzt eine ATP-Bindungsstelle in Form einer Furche. ATP-gebundene Aktinmonomere können als globuläre Form (G-Aktin) oder zu Filamenten verknüpft (F-Aktin) vorliegen (Bettinger et al., 2004). Weitere wichtige Merkmale von Aktin sind die Bindung an Myosin und DNase (Grummt, 2006). Phalloidin bindet spezifisch an Aktinfilamente ab einer Filamentgröße von sieben Monomeren (Visegrady et al., 2005). Mit fluoreszenzgekoppeltem Phalloidin konnten in somatischen Zellen nur Strukturen des Zytoplasmas angefärbt werden, was zunächst ebenfalls gegen die Existenz von nukleärem Aktin sprach. Allerdings konnte durch die Applikation von Phalloidin in Amphibienoozyten eine Verfestigung des Kerninhaltes erreicht werden (Gounon und Karsenti, 1981; Scheer et al., 1984). Mit dem monoklonalen Aktinantikörper 2G2 gelang jedoch bei der Fixierung somatischer Zellen mit Formaldehyd die Aktindarstellung in einem punktuellen Färbemuster im Zellkern (Gonsior et al., 1999). Dies deutete darauf hin, dass 2G2 ein Aktinepitop erkennt, welches im F-Aktin verdeckt ist. Ein anderer monoklonaler Antikörper, 1C7 (Schoenenberger et al., 2005) gegen Dimere („Lower Dimer“, LD)(Millonig et al., 1988) erkennt unpolymerisiertes Aktin im Zytoplasma und nukleäres Aktin, allerdings mit einem anderen

Fluoreszenzmuster als bei der Verwendung von 2G2-Antikörpern. Vermutlich bildet Aktin im Zellkern von somatischen Zellen keine langen filamentären Strukturen wie im Zytoplasma, sondern liegt als Monomer vor oder formt Dimere und andere hochdynamische atypische Polymere (McDonald et al., 2006), die von Phalloidin nicht gebunden werden.

Die Aktinfilamente im Zytoplasma werden mit zusätzlichen Proteinen in Strukturen organisiert, die die typischen zytoplasmatischen Aufgaben von Aktin wahrnehmen. Aktin ist im Zytoplasma zum Beispiel wichtig für den intrazellulären Transport, der Zellmobilität, der Zelladhäsion und der Zytokinese (Pederson und Aebi, 2003). Zunächst wurde eine Beteiligung von Aktin außerhalb dieser typischen zytoplasmatischen Aufgaben bei nukleären Prozessen gemeinhin abgelehnt, obwohl bereits richtungweisende Ergebnisse präsentiert wurden. So konnte zum Beispiel nach Injektion von Aktinantikörpern in *Pleurodeles*-Oozyten die Transkription von Lampenbürstenchromosomen unterdrückt (Scheer et al., 1984) und in *Xenopus*-Oozyten die Chromosomenkondensation verhindert werden (Rungger et al., 1979).

Neben Aktin wurde seither eine Vielzahl von aktinverwandten Proteinen aus der evolutionär hoch konservierten und alten Aktinfamilie identifiziert (Goodson und Hawse, 2002). Mittlerweile ist eine Beteiligung von β -Aktin in Chromatin-umformenden Komplexen, bei RNA-Polymerase I-, II- und III-abhängiger Transkription (siehe 1.3.4.3.) und beim nukleozytoplasmatischen Transport von RNA und Proteinen akzeptiert. So berichtete eine Arbeitsgruppe, dass filamentäres Kernaktin eine tragende Rolle beim Rev-CRM1 vermittelten Export intronhaltiger HIV-1 *gag* mRNA spielen soll (Kimura et al., 2000). Allerdings lokalisiert Kernaktin, vermutlich in einer Form aus kurzen Polymeren an Kernhüllen von *Xenopus laevis*-Oozyten an der nukleoplasmatischen Seite der Kernporenkomplexe und den nukleären Filamenten. Darüber hinaus interagiert es mit dem Exportkofaktor eIF5A (siehe 1.2.8.2.) und dem Nukleoporin Nup62, und ist als Kofaktor sowohl an CRM1- als auch an TAP-vermittelten Exportprozessen beteiligt (Hofmann et al., 2001). Des Weiteren bindet Aktin an das hrp36, dem *Chironomus tentans*-Homolog des heterogenen nukleären Ribonukleoprotein hnRNP A1 in Säugern, und begleitet so die Balbianiring-mRNA von ihrem Transkriptionsort in das Zytoplasma (Percipalle et al., 2001).

Aktin selbst shuttelt zwischen Zytoplasma und Zellkern. Dabei gelangt es entweder durch passive Diffusion (Bohnsack et al., 2006) oder unter bestimmten Bedingungen mit dem aktinbindenden Protein Cofilin, das ein Kernlokalisierungssignal enthält, aktiv in den Zellkern (Pendleton et al., 2003). Exportiert wird es mit dem Exportfaktor Exportin 6 und Profilin als Kofaktor (Stüven et al., 2003). Aktin selbst weist ein leucinreiches Kernlokalisierungssignal auf, aber es wird kontrovers diskutiert, ob Aktin tatsächlich CRM1-vermittelt exportiert werden kann (Wada et al., 1998; Stüven et al., 2003).

Bei Stress oder Hitzeschock kommt es zur Anreicherung von Aktin im Zellkern. Möglicherweise ist nichtfilamentäres Aktin bei der Ausbildung eines Kernskeletts beteiligt, das sich nach Hitzeschock ausdehnt und dadurch einen höheren Bedarf an Aktin besitzt (Wasser und Chia, 2000). In der Tat gibt

es Hinweise auf ein Kernskelett durch filamentäres Aktin in Oozyten. So exprimieren *Xenopus*-Oozyten im Gegensatz zu Eiern oder somatischen Zellen kein Exportin 6, was zu einer Anreicherung von Aktin im Zellkern führen soll. Dieses Aktin soll im Zellkern an der Ausbildung eines stabilisierenden dreidimensionalen Netzwerks beteiligt sein, das aufgrund der enormen Größe des Zellkerns erforderlich ist. Im Gegensatz zu somatischen Zellkernen nimmt das Chromatin in Oozytenkernen einen nur geringen Raum ein, während mRNAs, Ribosomen und andere später bei der Entwicklung gebrauchte Proteine angereichert werden (Bohnsack et al., 2006). Als weitere denkbare Funktion eines solchen weit reichenden Netzwerkes, welches verschiedene Kernbestandteile und Kernporenkomplexe verbindet, wurde die Wirkung als Diffusionsleitwerk vorgeschlagen (Kiseleva et al., 2004).

Weil Aktin im Zytoplasma nahezu immer mit Myosin assoziiert ist, lieferte der fehlende Nachweis von Myosin im Zellkern ebenfalls ein Argument gegen das nukleäre Vorkommen von Aktin. Mit Verzögerung wurde jedoch auch die Kernlokalisierung von Myosin, vor allem von Myosin I realisiert (Nowak et al., 1997; Pestic-Dragovich et al., 2000), und die Aufklärung der Funktion, vor allem bei Transkriptionsprozessen, vorangetrieben.

1.3.4.2. Kernmyosin

Die Myosinfamilie umfasst mittlerweile 18 Myosinklassen, basierend auf der Sequenz ihrer katalytischen Domänen (Berg et al., 2001). Zunächst war nur das konventionelle Myosin vom Typ II bekannt. Die konventionellen doppelköpfigen Myosine formen eine bipolare Filamentstruktur und ermöglichen ein Entlanggleiten von Aktinfilamenten in Muskelzellen. Das erste unkonventionelle Myosin wurde in der Amöbe *Acanthamoeba castellanii* entdeckt (Pollard und Korn, 1973). Da dieses Myosin nur einen Kopf besaß und keine Filamente formte, wurde es Myosin I genannt. Myosine der Klasse I existieren beim Menschen in 7 Isoformen, Myosin A, B, C, D, E, F und G. Das Myosin IC (früher Myosin I β genannt; Gillespie et al., 2001) war das erste unkonventionelle Säugermyosin, das aus Rindernebennieren isoliert wurde (Barylko et al., 1992; Reizes et al., 1994). Es zeigt einen charakteristischen Aufbau der so genannten schweren Myosinkette. Im aminoterminalen Myosinkopf befinden sich ATP- und aktinbindende katalytische Domänen. Die anschließende Halsregion besteht aus drei IQ (Isoleucin-Glutamin)-Motiven mit der Konsensussequenz IQ-XXX-RG-XXX-R, die reich an hydrophoben und positiv geladenen Aminosäuren sind (Bähler und Rhoads, 2002). Diese Region stellt die Bindungsstelle für die leichten Ketten dar, im Falle von Myosin I sind dies Calmoduline. Die schwere Kette von Myosin IC kann bis zu drei leichte Ketten binden. Der carboxyterminale Myosinschwanz ist bei den unkonventionellen Myosinen sehr variabel und wohl mit der Funktion verknüpft. Der Myosin IC-Schwanz ist reich an basischen Aminosäuren, enthält aber kein bislang bekanntes Bindungsmotiv. Ein Rezeptor für Myosin IC konnte ebenfalls bislang nicht identifiziert werden (Barylko et al., 2005). Aber es gibt Hinweise darauf, dass Myosin IC mit den

nichtkatalytischen Domänen durch elektrostatische Wechselwirkungen an negativ geladene Phospholipide binden kann. Dies wurde sowohl für die Schwanzdomäne (Doberstein und Pollard, 1992; Reizes et al., 1994) als auch für die Halsdomäne beschrieben, sofern sie nicht mit Calmodulin besetzt war (Hirono et al., 2004).

Myosin IC konnte in einer Vielzahl von Säugergeweben nachgewiesen werden und lokalisiert bevorzugt in der Zellperipherie, an der Plasmamembran sowie in der Führungspartie wandernder Zellen. Besonders erwähnenswert ist die Lokalisation an der Spitze wachsender Neuriten (Wagner et al., 1992). Myosin IC zeigt nicht die typische Filamentstruktur wie Aktinfilamente, sondern ein eher punktuelltes Muster. In der Zellperipherie findet sich eine Kolo-kalisation mit Aktin. Auffallend war auch die Beobachtung, dass sich Myosin IC in teilenden Zellen nicht in der Teilungsfurche anreichert (Ruppert et al., 1995).

Eine spezielle Funktion übt Myosin IC beim Glucosetransport aus. Insulin stimuliert die Glukoseaufnahme in Muskelzellen und Adipozyten. Dabei soll Insulin auf zwei verschiedene Wege die Translokation des Glucosetransporters 4 (GLUT4) von intrazellulären Membranen zur Zelloberfläche bewirken. Einerseits wird über den Aktinregulator N-WASP eine Polymerisation von kortikalem Aktin ausgelöst (Jiang et al., 2002). Andererseits soll auch Phosphatidylinositol-3-Kinase eine Umformung von Aktinfilamenten bewirken, mit denen GLUT4-Vesikel assoziieren (Khayat et al., 2000). An Aktinfilamente gebundenes Myosin IC ist in die Exozytose der GLUT4-Vesikel involviert, nachdem diese vermutlich mit Kinesin entlang der Aktinfilamente zur Zellperipherie transportiert wurden (Bose et al., 2004; Barylko et al., 2005).

Außerdem ist Myosin IC bei der Translokation von Ionenkanälen und damit assoziierter Transduktionskomplexe beteiligt, die in den Membranen der Stereozilien von Haarzellen im Innenohr sitzen. Diese Komplexe befinden sich nahe der Spitze der Stereozilien und sind mit benachbarten Stereozilien durch flexible Linkerproteine verbunden. Andererseits sind die Ionenkanäle in eine Struktur eingebettet, an die ungefähr 100 bis 200 Moleküle von Myosin IC gebunden sind. Diese Myosin IC-Moleküle verbinden somit die Transduktionskomplexe mit Aktinfilamentbündel in den Stereozilien. Nach Stimulierung werden die Stereozilien gebogen und die Linkerproteine gestreckt, was zur Öffnung der Ionenkanäle führt. Die Myosinmoleküle gleiten in Richtung Aktinfilamentspitzen am Stereozilium entlang nach unten und ziehen dabei die Transduktionskomplexe mit sich. Die Folge ist eine Entspannung der Linkerproteine und somit der Verschluss der Ionenkanäle. Diese so genannte Adaptation dient zur Verhinderung einer verlängerten Antwort auf einen Reiz. Nach Beendigung des Reizes nehmen die Stereozilien wieder ihre aufrechte Position ein und die Myosinmoleküle wandern unter ATP-Verbrauch in Richtung Stereozilienspitzen, wodurch der Transduktionskomplex wieder in die Ausgangsstellung gezogen wird (Gillespie und Cyr, 2004; Barylko et al., 2005).

Bereits seit den 1970er Jahren gab es Anhaltspunkte für eine Existenz von Myosin im Zellkern

(Hauser et al., 1975; Douvas et al., 1975; Milankov und De Boni, 1993). Eine frühe Beobachtung des Kernmyosins wurde zum Beispiel in *Pleurodeles*-Oozyten beschrieben. Hier wurden nach Phalloidingabe Aktinbündel im Nukleoplasma beobachtet, die mit nicht näher charakterisierten Partikeln beladen waren. Während Aktinantikörper die Bündel und die Partikel anfärbten, konnten mit einem Myosinantikörper hauptsächlich die Partikel dargestellt werden (Gounon und Karsenti, 1981). Schließlich wurden überzeugende Beweise für die Anwesenheit von Kernmyosin aus der Myosin I-Familie in Säugerzellen geliefert (Nowak et al., 1997). Das Myosin IC-Gen der Maus liegt auf Chromosom 11 und besteht aus 13 Exons sowie zwei zusätzlichen, *upstream* des Exon 1 gelegenen Exons (Exon -2 und Exon -1). Exon 1 beinhaltet die Translationsstartstelle für das zytoplasmatische Myosin IC. Das Exon -2 findet sich in der 5'-untranslatierten Region der Maus-Myosin IC-cDNA. Als Spleißvariante stellt bei Kernmyosin IC jedoch das Exon -1 eine zusätzliche Translationsstartstelle *upstream* des Startkodons für das zytoplasmatische Myosin IC bereit. Die dadurch resultierenden zusätzlichen 16 Aminosäuren am Aminoterminus werden teilweise von Exon -1 (Aminosäure eins bis sechs) und von Exon 1 (Aminosäure sieben bis 16) kodiert. Diese 16 Aminosäuren scheinen das Protein in den Zellkern zu dirigieren (Pestic-Dragovich et al., 2000). Außer in den späten Phasen der Spermatogenese wurde in allen Geweben Kernmyosin IC detektiert. Auffallend war eine hohe Expression in Lungengewebe, was auf eine möglicherweise gewebespezifische Funktion hinweist. Datenbankenanalysen ergaben ein Fehlen von Kernmyosin bei *Drosophila*, *C. elegans* und dem Urchordaten *Ciona intestinalis*. Im Gegensatz dazu scheint es bei Vertebraten weit verbreitet, was auf eine Generierung des Kernmyosins während der Vertebratenevolution hinweist (Kahle et al., 2007).

1.3.4.3. Aktin und Myosin wirken bei der Transkription

Bereits 1969 wurde vermutet, dass Kernaktin in die Transkription involviert ist (Lane, 1969). Mehrere Labore berichteten über Interaktionen von Aktin mit der RNA-Polymerase II (Jockusch et al., 1974; Smith et al., 1979; Egly et al., 1984). 1984 wurde die essentielle Beteiligung von Aktin bei der RNA-Polymerase II-abhängigen Transkription demonstriert. Die Mikroinjektion von Aktinantikörpern und bestimmten Aktin-bindenden Proteinen in *Pleurodeles*-Oozyten verursachte eine Retraktion der lateralen transkriptionsaktiven Schleifen und eine drastische Verkürzung der Achsen von Lampenbürstenchromosomen. Die RNA-Polymerase I und III-abhängige Transkription war davon allerdings nicht betroffen. Darüber hinaus konnte nach Transkriptionshemmung die Ausbildung eines massiven Aktinnetzwerkes um die Lampenbürstenchromosomen beobachtet werden (Scheer et al., 1984).

Auch Kernmyosin IC ist in die RNA-Polymerase II-abhängige Transkription involviert. Kernmyosin kolokalisiert in somatischen Zellen mit der RNA-Polymerase II und lässt sich gemeinsam mit der großen Untereinheit der RNA-Polymerase II aufreinigen (Pestic-Dragovich et al., 2000; Hofmann et

al., 2006b). Durch Aktivierung von Lymphozyten nach einer Hungerphase kommt es zur Umverteilung von Kernmyosin vom Heterochromatin zu transkriptionell aktiven Bereichen (Kysela et al., 2005). In menschlichen Zellen ließ sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die RNA-Polymerase II-abhängige Transkription mit Kernmyosinantikörper inhibieren (Hofmann et al., 2006b). Aktin und Myosin scheinen aber unterschiedliche Aufgaben bei der Transkription wahrzunehmen. Im Gegensatz zu Myosin scheint Aktin bei der Bildung des Präinitiationskomplexes notwendig zu sein (Hofmann et al., 2004; Hofmann et al., 2006b). Myosin hingegen aktiviert den Präinitiationskomplex, da die Transkription der initialen Nukleotide durch Kernmyosinantikörper gehemmt werden konnte (Hofmann et al., 2006b).

Wie bereits in 1.1.2. erwähnt, liegen genreiche Chromosomenabschnitte oder aktive Chromosomenbereiche im Kerninneren, während genarme und inaktive Chromosomenabschnitte in der Peripherie zu finden sind. Der aktive Transport von Chromosomenabschnitten in das Kerninnere im Rahmen der Transkriptionsaktivierung geschieht durch eine Wechselwirkung zwischen Aktin und Myosin, und zwar unabhängig von deren Beteiligung bei der Transkription. Versuche mit verschiedenen Aktinmutanten haben gezeigt, dass hierbei nicht Aktinmonomere, sondern Filamente beteiligt sind (Chuang et al., 2006). Inaktive Chromosomenabschnitte sind mit Histonen besetzt, was die Interaktion von Kernmyosin mit der DNA verhindern könnte. Nach Genaktivierung könnte die DNA für die Myosinschwanzdomäne zugänglich und die Chromosomenregion entlang von Aktinschienen in das Kerninnere bewegt werden (Hofmann et al., 2006a).

Bei der RNA-Polymerase III-abhängigen Transkription scheint β -Aktin ebenfalls beteiligt zu sein. Es bindet an die größte RNA-Polymerase III-Untereinheit und ist *in vivo* an Promotersequenzen von aktiv transkribierten U6-Genen lokalisiert. Außerdem war β -Aktin in einem *in-vitro*-Experimenten eine für die Transkription essentielle Komponente (Hu et al., 2004; Philimonenko et al., 2004).

Erste Hinweise gibt es ebenfalls auf eine Beteiligung von Kernmyosin IC bei der RNA-Polymerase III-abhängigen Transkription. Kernmyosin wurde an 5S rRNA- und 7SL-Genen, jedoch nicht an tRNA-Genen gefunden (Grummt, 2006).

Gut charakterisiert ist der Einfluss von Aktin und Kernmyosin bei der RNA-Polymerase I-abhängigen Transkription ribosomaler Gene im Nukleolus.

Aktin ist bei der rDNA-Transkription in einer polymeren Form beteiligt. Phalloidin und Jasplakinolide zum Beispiel, welche die Ausbildung von Aktinfilamenten fördern, konnten die RNA-Polymerase I-abhängige Transkription nicht hemmen. Im Gegensatz dazu zeigten Cytochalasin D und Latrunculin B, welche mit der Aktinpolymerisierung interferieren, einen starken inhibitorischen Effekt auf die prä-rRNA-Synthese (Ye et al., 2008).

Während Aktin an die RNA-Polymerase I unabhängig von deren Funktionszustand assoziiert ist, liegt Kernmyosin IC an den Transkriptionsinitiationsfaktor TIF-IA gebunden vor und interagiert nur mit der transkriptionsaktiven Polymerase (Philimonenko et al., 2004). TIF-IA interagiert sowohl mit der

RNA-Polymerase I und dem TATA-bindenden Faktor TIF-IB/SL1, was für die Ausbildung des Transkriptionsinitiationskomplexes am rDNA Promoter erforderlich ist. TIF-IA dissoziiert aus dem Polymerasekomplex während der frühen Elongation. Mit Antikörpern gegen Aktin und Kernmyosin konnte die Transkription *in vitro* sowohl bei der Verwendung von DNA als auch von Chromatin inhibiert werden. Aktin und Kernmyosin IC sind daher unabhängig von Chromatinumformung oder Verankerung der Transkriptionsmaschinerie an der Transkription beteiligt. Sie scheinen dabei allerdings erst in einem auf die Transkriptionsinitiation folgenden Schritt essentiell zu sein, denn die Transkription der ersten drei Nukleotide konnte weder durch eine Aktin- oder Myosindepletion beeinflusst werden (Philimonenko et al., 2004; Percipalle et al., 2006). Aufgrund der nicht nachweisbaren Beteiligung von Myosin bei der Transkriptionsinitiation ist die Bedeutung der Assoziation von Myosin mit TIF-IA weiterhin unklar.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Assoziation von Aktin und Kernmyosin mit der rDNA und dem Polymerase I-Apparat die Motorfunktion von Kernmyosin IC benötigt. Kernmyosinmutanten mit einer Defizienz in der ATPase-Aktivität oder Aktinbindung waren nicht in der Lage, mit der Polymerase I zu interagieren und ihre Assoziation mit der rDNA war stark beeinträchtigt. Experimente mit motordefizienten Kernmyosin IC-Mutanten haben dabei ergeben, dass die Motoraktivität von Kernmyosin nicht für die Rekrutierung der Polymerase I zum rDNA-Promotor, sondern bei der Transkriptionselongation eine Rolle spielen soll (Ye et al., 2008).

Die Basis für die Transkriptionselongation stellen ATP-abhängige chromatinumwandelnde Komplexe dar, die das Chromatin und die Nukleosomen modifizieren. Aktin und aktinverwandte Proteine sind in vielen solchen Komplexen enthalten. Kernmyosin IC wurde als Bestandteil von B-WICH identifiziert, eine hochmolekulare Komponente des chromatinumformenden Komplexes WICH („WSTF-ISWI-Chromatin Remodeling Complex“). Der Komplex B-WICH, der mit der RNA-Polymerase I interagieren kann, sitzt entlang des gesamten ribosomalen Gens und aktiviert die Postinitiationsphasen der Transkription. Kernmyosin verankert möglicherweise durch eine Interaktion mit dem an die Polymerase gebundenen Aktin den Komplex B-WICH an die ribosomalen Gene (Percipalle et al., 2006). In Abb. 1.12. ist Aktin und Kernmyosin IC im Polymerase I-Transkriptionskomplex dargestellt.

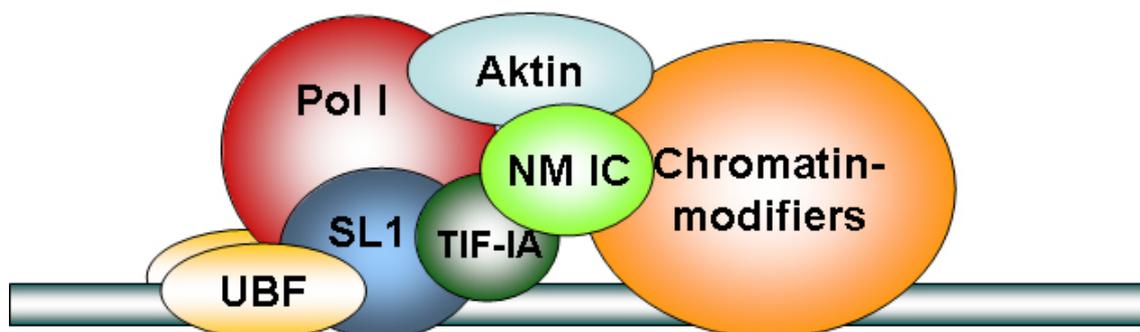


Abb. 1.12.: Schematische Darstellung von Aktin und Kernmyosin IC im Polymerase I-Transkriptionskomplex (nach Grummt, 2006).

Aktin und Myosin üben möglicherweise sowohl strukturelle und eine katalytische Funktionen bei der Transkription aus.

In Chromatinimmunpräzipitationsexperimenten mit bestimmten Kernmyosinantikörpern konnte sowohl Kernmyosin am Promoter als auch in der kodierenden rDNA-Sequenz präzipitiert werden, während andere Antikörper nur in der Lage waren, am Promoter gebundenes Kernmyosin IC zu präzipitieren (Philimonenko et al., 2004; Percipalle et al., 2006; Ye et al., 2008). Hieraus wurde der Schluss gezogen, Kernmyosin liege im Initiationskomplex in einer anderen Konformation vor als im Elongationskomplex. Möglicherweise triggert die Interaktion von Kernmyosin mit Aktin eine Konformationsänderung, die den Übergang des Polymerase I-Komplexes von der Initiationsphase in die Elongationsphase fördert (Ye et al., 2008).

Die Polymerase besitzt bereits selbst eine Motorfunktion. Während ihrer Arbeit pausiert sie oder wandert im Rahmen ihrer Fehlerkorrekturfunktion sogar rückwärts. In einer Modellvorstellung wurde Aktin und Myosin die Funktion eines Aktin-Myosin-Hilfsmotors zugeschrieben, welcher zum Beispiel als Starthilfe nach einer Transkriptionspause zum Einsatz kommt. Um Kraft zu generieren, könnte sich laut dieser Modellvorstellung Myosin mit seiner Schwanzdomäne am negativ geladenen DNA-Rückgrat verankern und mit seiner Kopfdomäne an Aktin binden (Lanerolle et al., 2005). Diese Modellvorstellung konnte jedoch bislang noch nicht bestätigt werden. Experimente mit der Überexpression einer Kernmyosinmutante ohne Schwanzdomäne und nachfolgende Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) mit Polymerase I-Antikörpern RPA116 erbrachten zwar reduzierte Level von Polymerase I sowohl am Promoter als auch in der transkribierten Region. Die Interaktion dieser Kernmyosinmutante mit der Polymerase I selbst schien jedoch nicht beeinträchtigt. Allerdings konnte auch dargestellt werden, dass die Kernmyosinmutante ohne Schwanzdomäne im Gegensatz zu motordefizienten Kernmyosinmutanten stärker als wildtypisches Kernmyosin an alle rDNA-Regionen gebunden war (Ye et al., 2008).

1.4. *Xenopus laevis*

Xenopus laevis (Abb. 1.13.), der zungen- und zahnlose glatte Krallenfrosch wurde früher für Schwangerschaftstests verwendet, weshalb der Frosch auch als Apothekerfrosch bezeichnet wurde. Das im Urin von Schwangeren enthaltene Choriongonadotropin führte zum Abblanchen weiblicher Tiere oder zur Spermatorrhoe männlicher Tiere. Der Morgenurin einer potentiell schwangeren Frau wurde hierzu in den dorsalen Lymphsack am Froschbein injiziert. Kam es nach 12 bis 24 Stunden zum Abblanchen oder zur Spermatorrhoe, konnte man von einer Schwangerschaft der getesteten Frau ausgehen. In den 1960er Jahren wurde dieser so genannte Hogben-Schwangerschaftstest durch immunologische Verfahren ersetzt (Gurdon und Hopwood, 2000). In Tabelle 1.3. die Einordnung von *Xenopus laevis* im Tierreich zu sehen.



Abb. 1.13.: Weibliches Exemplar eines *Xenopus laevis*.

Reich	Landwirbeltiere (<i>Tetrapoda</i>)
Klasse Unterklasse	Amphibien/Lurche (<i>Amphibia</i>) <i>Lissamphibia</i>
Ordnung Unterordnung	Froschlurche (<i>Anura</i>) <i>Mesobatrachia</i>
Überfamilie Familie Unterfamilie	Zungenlose (<i>Pipoidea</i>) Zungenlose (<i>Pipidae</i>) <i>Dactylethrinae</i>
Gattung	Krallenfrösche (<i>Xenopus</i>)
Art	Glatter Krallenfrosch (<i>Xenopus laevis</i>)

Tab. 1.3.: Einordnung von *Xenopus laevis* (Francois Marie Daudin, 1802) im Tierreich.

1.4.1. Besonderheiten der Oozyten von *Xenopus laevis*

Das Ovar von *Xenopus laevis* enthält insgesamt ungefähr 30 000 Oozyten in sechs Oozytenstadien und kann durch eine Operation am anästhesierten Frosch gewonnen werden. Die Größe der Oozyten reicht von etwa 50 Mikrometer im prävitellogenen Stadium I bis zu 1,2 Millimeter im reifen Stadium VI (Dumont, 1972). Ein wichtiger Faktor für die Größenzunahme während der ungefähr drei Monate dauernden Oogenese ist die Einlagerung von Dotterproteinen. Aufgrund der Dottereinlagerung vergrößert sich während der Vitellogenese das Zytoplasma stärker als der Zellkern. Während der Embryogenese werden die Dotterproteine degradiert und die Aminosäuren für die Proteinsynthese verwendet (Evans und Kay, 1991).

Der Zellkern einer reifen Oozyte misst bis zu 0,4 Millimeter im Durchmesser und hat damit ein etwa 10^5 -fach größeres Volumen als der Zellkern einer somatischen Zelle. Die Oozyten befinden sich in der Prophase der ersten meiotischen Teilung. Sie werden nach Ablauf des Leptotän, Zygotän, Pachytän und frühen Diplotän arretiert (Gall et al., 1991). Neben den haploiden 18 Lampenbürstenchromosomen befinden sich im Zellkern bis zu 1500 amplifizierte Nukleolen mit

extrachromosomaler rDNA, 50 bis 100 Cajal-Körperchen und Tausende von B-Snurposomen (Gall et al., 2004). Während somatische Zellen wenige Tausend Kernporenkomplexe besitzen, sind es bei *Xenopus*-Oozyten etwa 40 Millionen. Die Oozyten lassen sich manuell in die Kompartimente Zytoplasma, Zellkernhülle und Kerninhalt auftrennen (Scheer et al., 2005). Daher bieten sich *Xenopus*-Oozyten insbesondere für Transport- und Transkriptionsstudien an.

1.4.1.1. Lampenbürstenchromosomen

Walter Flemming beschrieb 1882 die Riesenchromosomen im Keimbläschen des mexikanischen Axolotls, *Ambystoma mexicanum*. Wenige Jahre später prägte Rückert (1892) den Begriff „Lampenbürstenchromosomen“ bei der Untersuchung von Zellkernen des Hais *Pritiurus*.

Die 18 Lampenbürstenchromosomen von *Xenopus laevis* bestehen aus Bivalenten zu je zwei Chromatiden, da die DNA-Replikation in der Oozyte bereits stattgefunden hat. Im Vergleich zu Salamandern sind die Lampenbürstenchromosomen bei *Xenopus laevis* kurz und besitzen verhältnismäßig kleine Schleifen („*Loops*“) (Abb. 1.14), welche Regionen mit aktiver Transkription darstellen. In diesen Bereichen sind die Schwesterchromatiden voneinander getrennt und extrem gestreckt. Die Schleifen bestehen aus einer DNA-Achse, an der die RNA-Polymerase II zu finden ist, und einer Matrix aus wachsenden RNA-Transkripten und assoziierten Proteinen. In der Phasenkontrastmikroskopie liefern diese Ribonukleinkomplexe das charakteristische Schleifenbild. Die Verbreiterung der Matrix entlang einer Schleife spiegelt die wachsenden Transkripte entlang der Transkriptionseinheit wider (Gall et al., 2004).

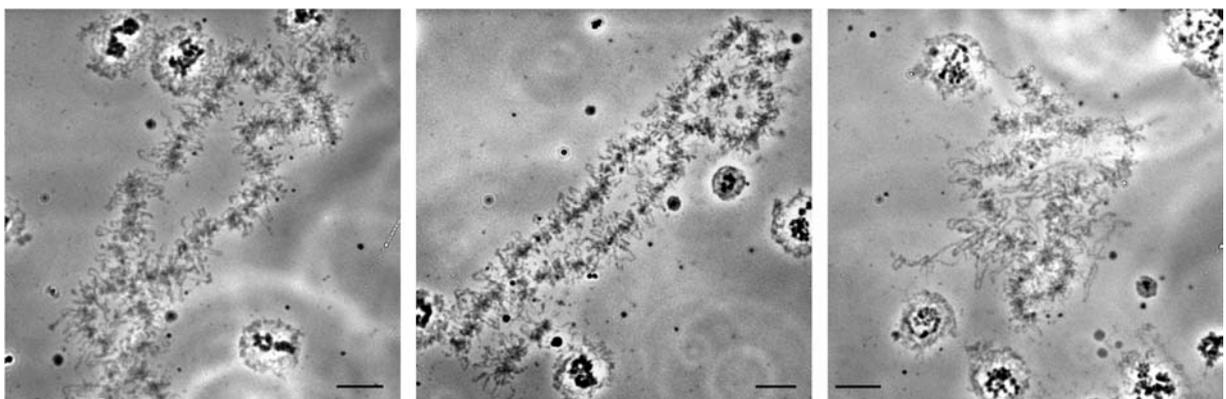


Abb. 1.14.: Lampenbürstenchromosomen von *Xenopus laevis*. Eichstrich 10 μ m.

An etwa 90 spezifischen Stellen an den Lampenbürstenchromosomen findet Transkription durch die RNA-Polymerase III statt. Diese Schleifen sind allerdings in der Phasenkontrastmikroskopie schlecht darstellbar, da die Transkripte nur sehr kurz und die Menge der assoziierten Proteine gering ist (Murphy et al., 2002).

Die Präparationsergebnisse für die *Xenopus*-Lampenbürstenchromosomen sind stark von der hormonellen Situation des Frosches abhängig (Gall et al., 1991). Transkriptionell aktive

Chromosomen sind zwar bereits bei Oozyten des Stadiums I zu finden (Hill und MacGregor, 1980). Für die Präparationen von Lampenbürstenchromosomen sind jedoch die Oozyten im Stadium IV gut geeignet. Der Zellkern erreicht hier bereits seine maximale Größe, die Transkription ist noch im Gange, während die vielfältigen Veränderungen im Zuge der Reifung noch nicht begonnen haben. In den ersten Stunden nach der Oozytenentnahme kontrahieren sich die Chromosomen und ziehen ihre Schleifen ein. Nach etwa 18 Stunden im Oozytenmedium sind die transkriptionell aktiven Schleifen der Lampenbürstenchromosomen aber wieder ausgebildet (Wu und Gall, 1997).

1.4.1.2. Amplifizierte Nukleolen

Da das haploide Genom von *Xenopus laevis* nur eine Nukleolus-Organisator-Region (NOR) besitzt, müssten in der Oozyte vier NORs die Synthese der rRNA bewerkstelligen. Eine schnell wachsende somatische Zelle stellt zehn bis 100 Ribosomen pro Sekunde her, eine *Xenopus*-Oozyte ungefähr 300 000 (Scheer, 1973). Um diesen riesigen Bedarf an Ribosomen für die Embryogenese zu decken, entstehen während des Pachytän zirkuläre Moleküle extrachromosomaler Kopien an rDNA, die als Fokus für die Ausbildung so genannter amplifizierter Nukleolen dienen (Gall et al., 2004). Daher enthalten *Xenopus*-Oozyten 22 bis 35 pg rDNA zusätzlich zu den 12 pg chromosomaler DNA, was etwa 2 Millionen zusätzlicher rRNA-Genen entspricht. Jeder der 1000 bis 1500 amplifizierten Nukleolen enthält etwa zwischen 500 und 11 000 rRNA-Gene (Mais und Scheer, 2001).

Nach Spreitung des Oozytenkerninhaltes können die Nukleolen dargestellt werden (Abb. 1.15.). Lichtmikroskopisch lassen sich ein Kortex und eine Kernregion („Core“) abgrenzen. Im Nukleolus-Kern ist das fibrilläre Zentrum mit der rDNA, der RNA-Polymerase I und dem RNA-Polymerase I-spezifischen Transkriptionsfaktor UBF („Upstream Binding Factor“) sowie die dichte fibrilläre Komponente (DFC) mit dem Markerprotein Fibrillarin lokalisiert. Die Form des Nukleolus-Kerns variiert zwischen kompakten Aggregaten und einem perlenschnurartigen Aussehen, das an eine Halskette erinnert (Wu und Gall, 1997; Mais und Scheer, 2001). Der Kortex stellt die granuläre Komponente (GC) dar (Mais und Scheer, 2001). Hier ist das nukleoläre Proteine B23 zu finden (Kneissel et al., 2001).

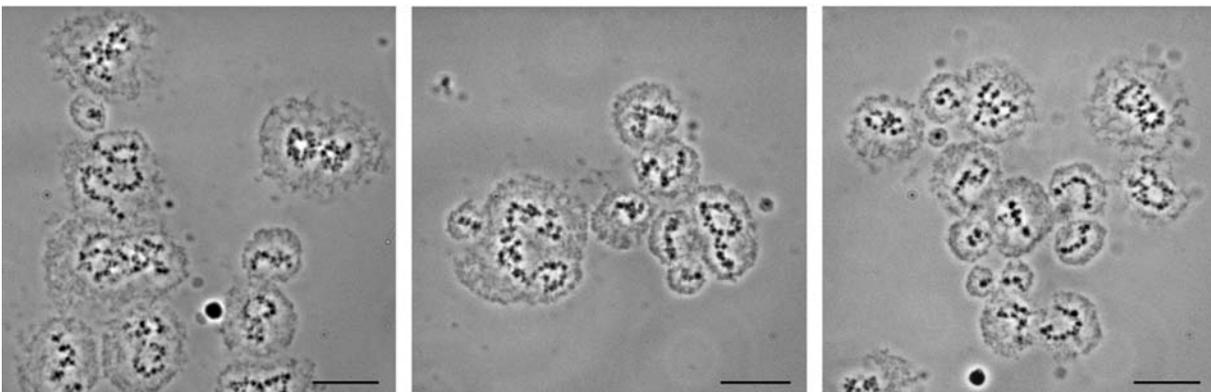


Abb. 1.15.: Amplifizierte Nukleolen von *Xenopus laevis*. Eichstrich 5 µm.

1.4.1.3. Mitochondriale Wolke (Balbiani-Körper)

Die mitochondriale Wolke, auch Balbiani-Körper genannt, ist ein zytoplasmatisches Organell, das in Oogonien und in prävitellogenen *Xenopus*-Oozyten (Stadium I) zu finden ist. Es wurde erstmalig 1845 in Spinnenoozyten entdeckt, später dann in einer Vielzahl von Oozyten von Invertebraten und Vertebraten. Im Gegensatz zu der Maus ist es auch in menschlichen Oozyten vorhanden (Kloc und Etkin, 2005). Lokalisiert ist dieses sphärische Organell in Kernnähe, aber auf der Seite der Oozyte, die später zum vegetativen Pol wird. Bestandteile der mitochondrialen Wolke sind etwa eine halbe Million Mitochondrien, mehrere hundert Keimgranula und einige lokalisierte RNAs, die in den Keimgranula, in deren Peripherie oder außerhalb der Keimgranula zu finden sind.

In reifen *Xenopus*-Oozyten gibt es bestimmte RNAs, die am vegetativen oder animalen Kortex angereichert sind. Viele der am vegetativen Kortex lokalisierten RNAs, zum Beispiel Xcat2-, Xdazl- und Xpat-Transkripte, sind mit den so genannten Keimplasmainseln assoziiert, die bei der Teilung ungleich in wenige Tochterzellen verteilt werden. Aus diesen Zellen werden primordiale Keimzellen (Houston und King, 2000). Vegetative RNAs außerhalb dieser Keimplasmainseln spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Endo- und Mesoderm. In *Xenopus*-Oozyten existieren zwei Wege, um die RNA zum vegetativen Kortex zu bringen. Der so genannte frühe Lokalisierungsweg oder METRO („*Message Transport Organizer*“) für die Keimplasma-RNAs benützt die mitochondriale Wolke als Vehikel. Die Keimplasma-RNAs gelangen ohne aktive Bewegung und ohne Beteiligung von Mikrotubuli durch Diffusion zur mitochondrialen Wolke, wo sie eingefangen werden. Für das Einfangen der RNAs soll ein Netzwerk aus endoplasmatischem Retikulum (ER) verantwortlich sein, das die mitochondriale Wolke durchzieht (Chang et al., 2004). Bislang konnte aber noch kein Protein identifiziert werden, das die Interaktion dieser RNAs mit dem ER vermittelt.

Eine Modellvorstellung besagt, dass sich mit Beginn der Vitellogenese die mitochondriale Wolke ausdehnt und in viele Fragmente zerbricht, die mit der Zeit kleiner werden und zum vegetativen Kortex wandern. Dort werden die Fragmente mit Aktin- und Zytokeratinfilamenten verankert und zu den so genannten Keimplasmainseln (Wilk et al., 2004). Eine neuere Ansicht geht davon aus, dass Keimgranula und lokalisierte RNAs in der mitochondrialen Wolke zunächst randomartig angeordnet sind, dann aber zunehmend an der vegetativen Spitze der mitochondrialen Wolke, der METRO-Region („*Message Transport Organizer*“-Region), aggregieren. Wenn sich mit Beginn der Vitellogenese die mitochondriale Wolke ausdehnt, werden Keimgranula und lokalisierte RNAs zunehmend in Richtung vegetativen Kortex verlagert und schließlich dort verankert. Anschließend zerbricht die mitochondriale Wolke (Wilk et al., 2004).

Der späte Transportweg für die anderen RNAs, wie zum Beispiel Vg1 oder VegT, läuft mit Beteiligung von Mikrotubuli und Kinesinen ab und startet erst, wenn die mitochondriale Wolke bereits den Kortex erreicht hat.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Das ubiquitär exprimierte Protein eIF5A trägt als bislang einziges bekanntes Protein die Aminosäure Hypusin (Park et al., 1982; Gordon et al., 1987). Es spielt eine essentielle Rolle bei der Zellproliferation (Xu et al., 2004) sowie als Kofaktor beim HIV-1-Rev vermittelten RNA-Export (Ruhl et al., 1993). Die Entwicklung von Hypusininhibitoren könnten neue antivirale (Hauber et al., 2005) und antileukämische (Balabanov et al., 2007) Therapiemöglichkeiten eröffnen. Die zelluläre Funktion von eIF5A ist jedoch noch weitgehend unklar. Daher ist die Aufklärung der zellulären Funktion von eIF5A von großer Bedeutung.

1.5.1 Export von CD83 mRNA

Durch die Behandlung dendritischer Zellen mit einem Hypusininhibitor wurde die Oberflächenexpression des Oberflächenrezeptors CD83 in reifen dendritischen Zellen verhindert und die CD83 mRNA im Zellkern angereichert (Kruse et al., 2000; Prechtel et al., 2006). Hieraus wurde vermutet, der CD83 mRNA-Export könnte ebenfalls eIF5A-abhängig ablaufen. Deshalb soll der nukleozytoplasmatische Export von CD83 mRNA mithilfe von *Xenopus laevis*-Oozyten näher untersucht werden. *Xenopus laevis*-Oozyten können durch eine Operation in großer Menge gewonnen werden. Die Oozyten zeichnen sich außerdem durch eine hohe Anzahl an Kernporenkomplexen aus und lassen sich aufgrund ihrer Größe durch Mikroinjektion manipulieren und manuell in Zellkern- und Zytoplasmafraktion trennen. Um die Ergebnisse aus dem Modellsystem *Xenopus*-Oozyte auf humane dendritischen Zellen übertragen zu können, sollen zu allen am Export potentiell beteiligten humanen Faktoren *Xenopus*-Homologe zugeordnet werden.

1.5.2. Export von oozytentypischem Transkriptionsfaktor IIIA (TFIIIA) in Oozyten von *Xenopus laevis*

Als Bindungspartner von eIF5A wurde in *Xenopus*-Oozyten der oozytentypische Transkriptionsfaktor IIIA (TFIIIA) identifiziert (Doktorarbeit W. Hofmann, 2002). TFIIIA ist sowohl bei der RNA-Polymerase III-abhängigen Transkription von 5S rRNA (Engelke et al., 1980, Wolffe und Brown, 1988) als auch an deren nukleozytoplasmatischen Export und der Lagerung im Zytoplasma beteiligt (Wischniewski et al., 2004). Wie das HIV-1-Rev besitzt TFIIIA ein leucinreiches Exportsignal (Fridell et al., 1996). Aufgrund der Parallele zwischen dem HIV-1-Rev vermittelten HIV-1-mRNA-Export und dem TFIIIA-vermittelten 5S rRNA-Export soll der Export von TFIIIA analysiert werden, insbesondere im Hinblick auf eine Beteiligung von eIF5A als Kofaktor.

1.5.3. Funktion von Kernmyosin IC bei Transkription und Kernexport

Als weiterer Interaktionspartner von eIF5A wurde Aktin beschrieben (Hofmann et al., 2001). Kernaktin ist bereits seit längerer Zeit Gegenstand intensiver Forschung. Es ist sowohl an Transkriptions- als auch an nukleozytoplasmatischen Exportprozessen beteiligt (Scheer et al., 1984; Hofmann et al., 2001). Im Gegensatz dazu wurde die Existenz des Aktinpartners Myosin im Kern erst vor kurzem realisiert (Nowak et al., 1997). Weil Amphibienoozyten entscheidende Erkenntnisse zur Aufklärung von Kernaktinfunktionen geliefert haben (Scheer et al., 1984; Hofmann et al., 2001), bietet sich daher das Modellsystem *Xenopus*-Oozyte für die Analyse von Kernmyosinaufgaben an. Neben der besonderen Eignung für Exportstudien stellen *Xenopus*-Oozyten mit ihren amplifizierten Nukleolen und den Lampenbürstenchromosomen auch geeignete Objekte zu Transkriptionsversuchen dar. Nach der Identifizierung des Kernmyosin IC bei *Xenopus laevis* sollen Antikörper gegen dieses Protein hergestellt werden. Anschließend soll eine Beteiligung von Kernmyosin bei Transkriptions- und Exportprozessen geprüft werden.

2. MATERIAL

2.1. Biologisches Material

2.1.1. Tiere

➤ *Xenopus laevis*:

Weibliche afrikanische Krallenfrösche wurden entweder aus einer südafrikanischen Schlangenfarm (Nasco, South African Snake Farm, Fish Hoek, Cape Province, Südafrika) oder aus institutseigener Nachzucht bezogen.

2.1.2. Zelllinien

➤ HeLa-Kulturzellen:

Bei den HeLa-Zellen handelt es sich um eine menschliche Epithelzelllinie, die 1951 aus dem Zervixkarzinom der Patientin Henriette Lack in Baltimore gewonnen wurde. Die Kultur erfolgte in DMEM mit 10 % Prozent FCS, 1 % L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5 % CO₂.

➤ XTC-Zellen:

Die Fibroblasten-Zelllinie XTC („*Xenopus laevis Tissue Culture*“) stammt aus *Xenopus laevis*. Die Kultur erfolgte mit RPMI 1640-Medium mit 20 % FCS, 2 % L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin bei 26°C und 5 % CO₂.

➤ XIKE-A6 Kulturzellen:

XIKE-A6-Zellen stammen aus Nierenepithelgewebe von *Xenopus laevis* („*Xenopus laevis Kidney Epithelium*“, line A6, American Type Culture Collection). Sie wurden in DMEM mit 15 % Aqua bidest, 10 % FCS, 1 % L-Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 26°C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.1.3. Bakterienstämme

➤ *E. coli* TOP10 F One Shot (Invitrogen, Karlsruhe):

Diese Bakterien wurden zur Transformation des pCR 2.1 TOPO-Vektors verwandt.

➤ *E. coli* XL1-blue (Stratagene, Heidelberg):

Diese Bakterien wurden zur Transformation von Plasmiden in Ligationsansätzen verwandt.

➤ *E. coli* BL21CodonPlusTM(DE3)-RIL (Stratagene, Amsterdam):

Dieser Bakterienstamm besitzt eine verminderte Proteaseaktivität und zusätzliche Kopien seltener tRNA-Gene, wodurch eine verbesserte Proteinexpression erreicht werden kann.

➤ *E. coli* M15 (Qiagen, Hilden):

Dieser Bakterienstamm wurde für die Proteinexpression aus pQE-Vektoren entwickelt.

2.1.4. Antikörper

2.1.4.1. Primäre Antikörper

Antikörper	Herstellung	Tier	Bezugsquelle
α -BrdUTP	monoklonal	Maus	Roche, Mannheim
α -BrdUTP	polyklonal	Schaf	Abcam, Cambridge
α -BSA	monoklonal	Maus	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
α -CRM1 Peptid Japan	polyklonal	Kaninchen	J. Hauber, Hamburg (Kudo et al., 1997)
α -Digoxigenin (AP)	polyklonal	Schaf	Roche, Mannheim
α -eIF5A #1a,2a,3a,8,9,11,22	polyklonal	Kaninchen	J. Hauber, Hamburg
α -Emerin	monoklonal	Maus	H. Zentgraf, Heidelberg
α -GST	polyklonal	Kaninchen	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
α -His6	monoklonal	Maus	H. Zentgraf, Heidelberg
α -TFIIIA #17, 37	monoklonal	Maus	H. Zentgraf, Heidelberg
α -Kernmyosin IC #42, 54 (<i>Xenopus laevis</i>) (XNM IC #42, 54)	monoklonal	Maus	H. Zentgraf, Heidelberg
α -Kernmyosin IC gp30 (<i>Xenopus laevis</i>) (XNM IC gp30)	polyklonal	Meerschwein	Seqlab, Göttingen
α -Kernmyosin IC (<i>Homo sapiens</i>) (NM IC)	polyklonal	Kaninchen	P. de Lanerolle, Chicago (Nowak et al., 1997)
ELAV 065	polyklonal	Kaninchen	J. Hauber, Hamburg
α -Nukleoporin mAB 414	monoklonal	Maus	Roche, Mannheim
α -Nukleoporin 62 (GP62)	polyklonal	Meerschwein	Lourim et al., 1996
α -Polymerase I: 57/299	polyklonal	Mensch	U. Scheer, Würzburg
α -Polymerase I: S 18	polyklonal	Mensch	U. Scheer, Würzburg (Reimer et al., 1987a)
α -Polymerase II: H 14	monoklonal	Maus	U. Scheer, Würzburg (Bregman et al., 1995)
α -Fibrillarlin: 72 B9	polyklonal	Mensch	U. Scheer, Würzburg (Reimer et al., 1987b)
α -Fibrillarlin: S 4	polyklonal	Mensch	U. Scheer, Würzburg (Reimer et al., 1987b)
α -B23 (NO185, Ascites)	monoklonal	Maus	M. Schmidt-Zachmann, Heidelberg (Kneissel et al., 2001)

Tab. 2.1.: Primäre Antikörper.

2.1.4.2. Sekundäre Antikörper

Antikörper gegen	gekoppelt mit	Bezugsquelle
Maus	Peroxidase	Jackson ImmunoResearch
	Texas Red	Jackson ImmunoResearch
	Cy3	Jackson ImmunoResearch
	Cy2	Jackson ImmunoResearch
	FITC	Jackson ImmunoResearch
	6 nm Kolloidalgold	Jackson ImmunoResearch
	12 nm Kolloidalgold	Jackson ImmunoResearch
	Ultra-Small Gold	Aurion
Kaninchen	Peroxidase	Jackson ImmunoResearch
	Texas Red	Jackson ImmunoResearch
	6-nm-Kolloidalgold	Jackson ImmunoResearch
	12 nm-Kolloidalgold	Jackson ImmunoResearch
Meerschwein	Peroxidase	Jackson ImmunoResearch
	Texas Red	Jackson ImmunoResearch
Mensch	Peroxidase	Jackson ImmunoResearch
	Texasred	Jackson ImmunoResearch
Schaf	Texasred	Jackson ImmunoResearch

Tab. 2.2.: Sekundäre Antikörper.

Die Antikörper der Firma Jackson ImmunoResearch wurden über Dianova (Hamburg) bezogen.

2.1.4.3. Subklassenspezifische Antikörper für den Ochterlony-Test

Kaninchen α -Maus-IgG1, -IgG2a, -IgG2b, -IgG3, -IgM (MB Biomedicals)

2.1.3.4. Isotyp-Kontrollantikörper

- gereinigtes Maus IgM, Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
- gereinigtes Kaninchen IgG, Sigma-Aldrich (Deisenhofen)

2.2. Molekularbiologisches Material

2.2.1. Plasmidvektoren

2.2.1.1. Plasmid zum Überprüfen der chemischen Kompetenz von Bakterien

➤ pUC-Vektor (Invitrogen, Karlsruhe)

- Antibiotikaresistenz: Ampicillin

2.2.1.2. Plasmid für die Klonierung von PCR-Produkten

➤ pCR 2.1 TOPO-Vektor (Invitrogen, Karlsruhe):

Der Vektor ermöglicht eine Klonierung von PCR-Produkten mit einem 3'-Überhang aus Desoxyadenosin. Der Vektor liegt bereits in linearisiertem Zustand vor und besitzt einen 3'-Überhang aus Thymidin. Das Enzym Topoisomerase I besitzt Ligaseaktivität und ist kovalent an die offenen 3'-Enden des Vektors gebunden. Nach Integration des PCR-Produkts in den Vektor dissoziiert das Enzym. Über den T7-Promotor ist eine *in-vitro*-Transkription möglich.

- Antibiotikaresistenz: Ampicillin und Kanamycin

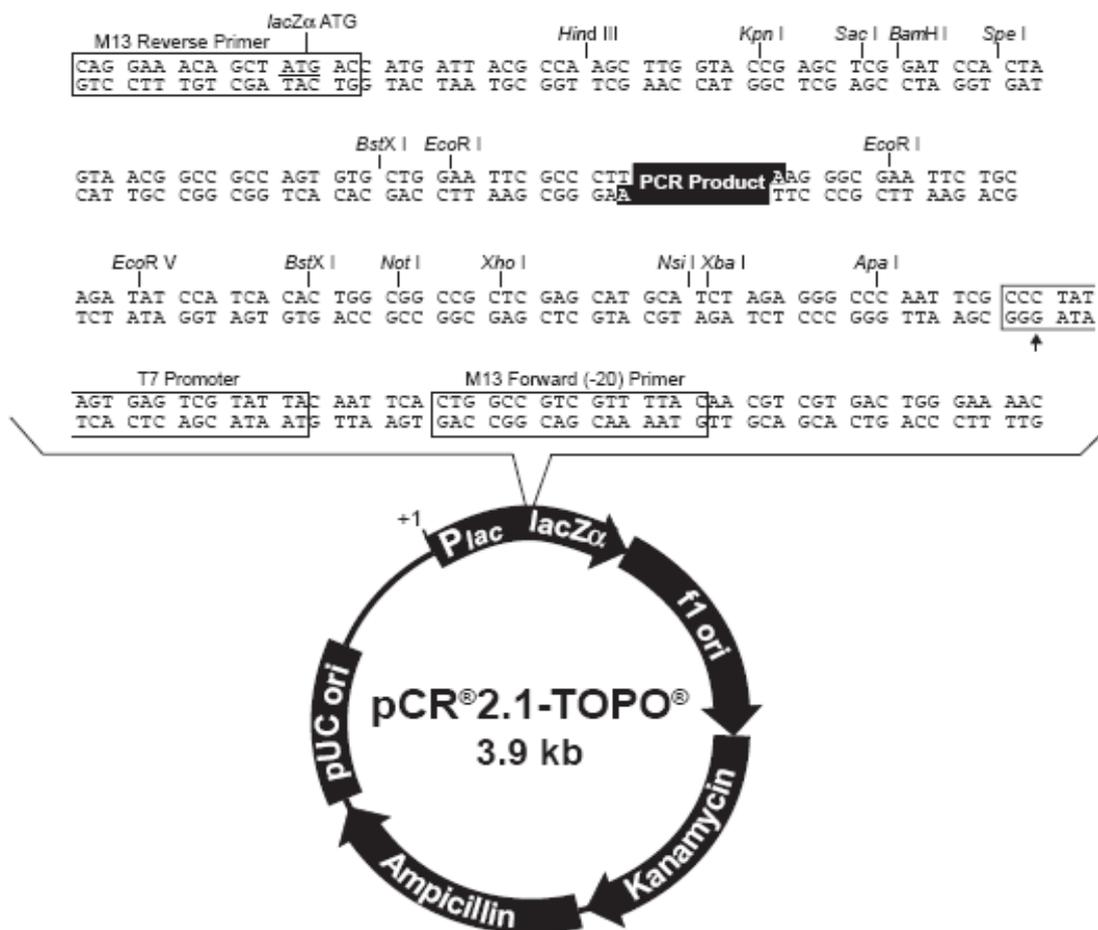


Abb. 2.1.: Multiple Klonierungsstelle im pCR 2.1 TOPO-Vektor.

2.2.1.3. Bakterielle Expressionsvektoren

➤ pGEX-5X-1, pGEX-5X-2, pGEX-5X-3 (Amersham Pharmacia Biotech):

Die pGEX-Expressionsvektoren enthalten ein *lac-I*-Gen für die Repression der Genexpression. Die Genexpression kann mittels Laktose oder Laktoseanaloga (z. B. IPTG) induziert werden. Das Gen für die Glutathione-S-Transferase (GST, aus *Shistosoma japonicum*, 26 kDa) steht unter der Kontrolle des *tac*-Promoters und enthält ein Startkodon, eine Ribosomenbindungsstelle und einen *lac*-Operator. Die einklonierte cDNA wird C-terminal an GST fusioniert. Die Aufreinigung erfolgt über den GST-Anteil des Fusionsproteins. Eine enzymatische Abspaltung des GST über die Erkennungssequenz des Faktor Xa ist möglich.

- Antibiotikaresistenz: Ampicillin

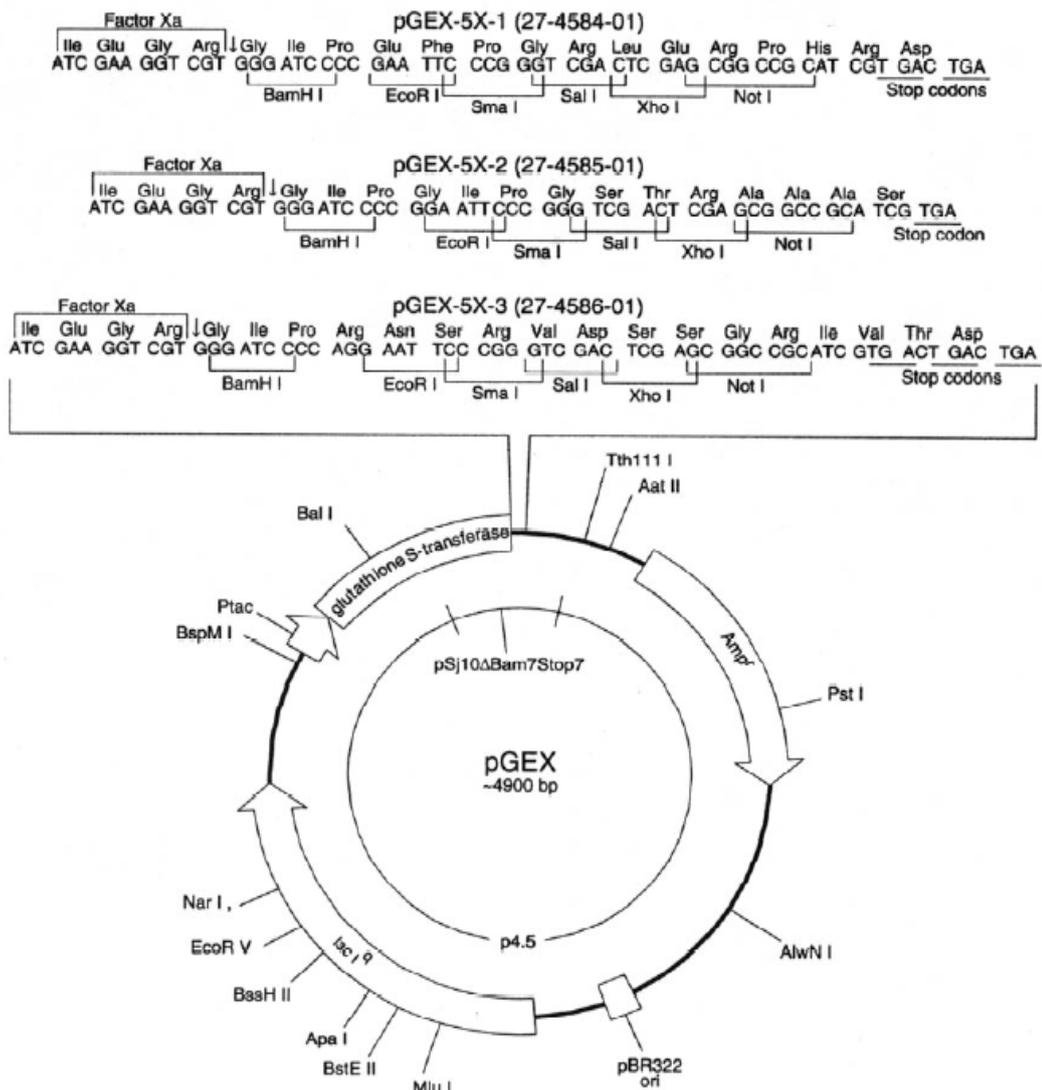


Abb. 2.2.: Multiple Klonierungsstelle im pGEX-Vektor.

➤ pQC-His6 (von H. Zentgraf, Heidelberg, zur Verfügung gestellt):

Der prokaryotische Expressionsvektor pQC-His6 ist abgeleitet vom pQE-8-Vektor (Qiagen) und besitzt einen Phagen-T5-Promotor, eine synthetische Ribosomenbindungsstelle und zwei lac-Operator-Sequenzen, welche die Bindung des lac-Repressors verstärken. Da carboxyterminal sechs Histidine angehängt werden, darf bei der Klonierung von cDNA in den pQC-His6 kein terminales Stopkodon eingefügt werden. Die Klonierung erfolgt über die Enzymschnittstellen BamHI und HindIII, die Expression erfolgt in XL1-blue- oder M15-Bakterien.

- Antibiotikaresistenz: Ampicillin

Aufbau des pQC-His6:

Basenpaar 1 bis 120: aus dem pQE-8-Vektor (Basenpaar 1 bis 120)

Basenpaar 120 bis 168: pQC-His6

Basenpaar 168 bis 3424: aus dem pQE-8-Vektor (Basenpaar 172 bis 3427)

- Klonierungsstelle im pQC-His6:

	BamHI		HindIII																	
ATG	AGA	<u>GGA TCC</u>	GGA	<u>AAG CTT</u>	CAC	CAT	CAC	CAT	CAC	CAT	CAC	CAT	TAA							
M	R	G	S	G	K	L	H	H	H	H	H	H	*							

2.2.1.4. Eukaryotische Expressionsvektoren

In eukaryotischen Systemen wurden Expressionsvektoren verwandt, die einen Zytomegalovirus (CMV)-Promoter enthalten.

➤ pcDNA3 (Invitrogen, Karlsruhe):

Der pcDNA3-Vektor erlaubt neben der eukaryotischen Expression eines Proteins ohne fusionierte Sequenz auch eine *in-vitro*-Transkription.

- Antibiotikaresistenz: Ampicillin; Selektion eukaryotischer Zellen: Neomycin (G418)

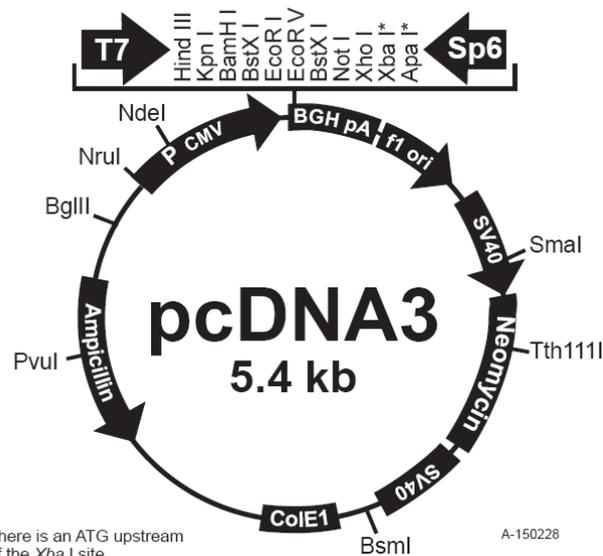
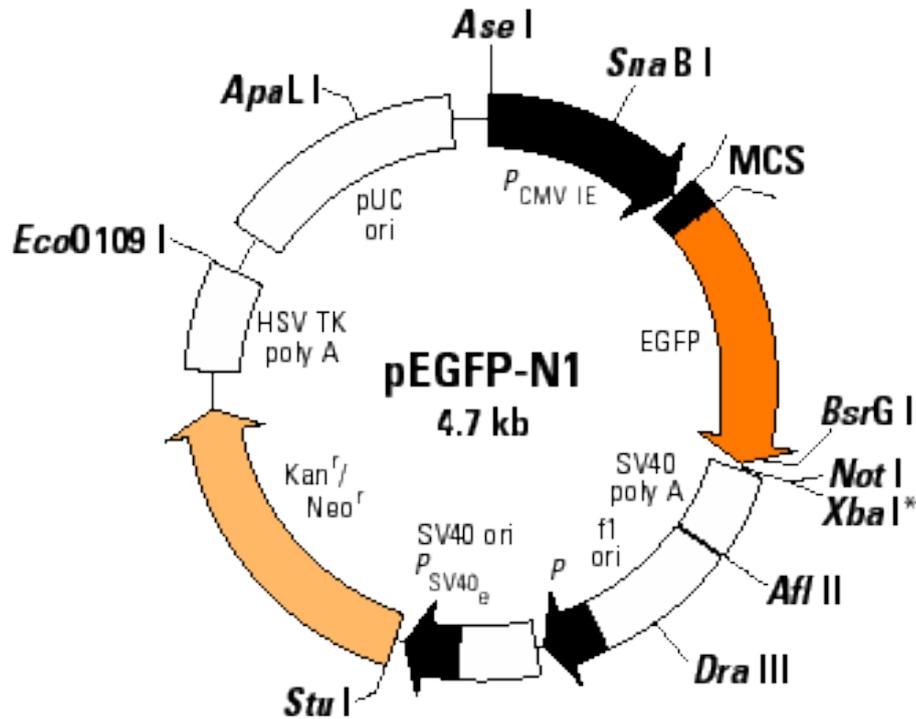


Abb. 2.3.: Multiple Klonierungsstelle im pcDNA3-Vektor.

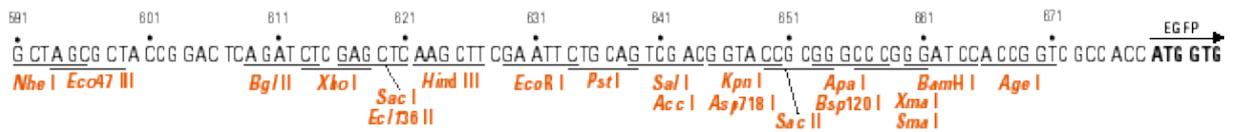
➤ pEGFP-N1, pEGFP-N2, pEGFP-N3 (BC Biosciences Clontech, Heidelberg):

Die pEGFP-Vektoren wurden zur Expression grün fluoreszierender Fusionsproteine benutzt. Carboxyterminal an die einklonierte cDNA wird EGFP („Enhanced Fluorescent Protein“ aus *Aequorea victoria*) exprimiert.

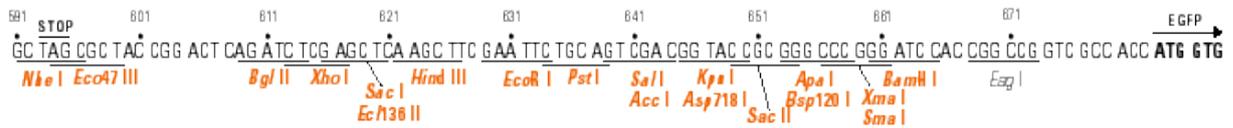
- Antibiotikaresistenz: Kanamycin; Selektion eukaryotischer Zellen: Neomycin (G418)



Multiple Klonierungsstelle („Multiple Cloning Site, MCS) von pEGFP-N1:



Multiple Klonierungsstelle (MCS) von pEGFP-N2:



Multiple Klonierungsstelle (MCS) von pEGFP-N3:

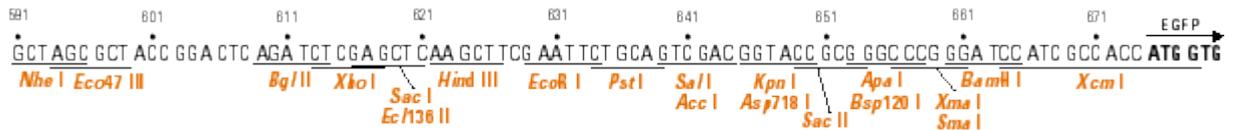


Abb. 2.4.: Multiple Klonierungsstelle im pEGFP-Vektor.

2.2.1.5. Plasmide mit einklonierter DNA

Protein	Plasmid mit einklonierter DNA
TFIIIA, Oozytentyp <i>Xenopus laevis</i>	pGEX-TFIIIA-volle Länge pQC-His6-TFIIIA-volle Länge pGEX-TFIIIA-NES mit GG-Linker
Kernmyosin IC <i>Xenopus laevis</i>	IMAG p998H2113318G3 (RZPD) pTOPO-XNM IC trunc, pQC-His6-XNM IC trunc pTOPO-XNM IC-N-terminus, pGEX-XNM IC N-terminus, pEGFP-XNM IC-N-terminus
ElrA <i>Xenopus laevis</i>	pTOPO-elrA, pQC-His6-elrA, pEGFP-elrA
XAPRIL <i>Xenopus laevis</i>	IMAGp998D1812173Q3 in pCMV-SPORT6 (RZPD) pGEX-XAPRIL- Δ NLS pEGFP-XAPRIL volle Länge
XPP32 <i>Xenopus laevis</i>	IMAGp998A04929Q3 in pCMV-SPORT6 (RZPD) pQC-His6-XPP32- Δ NLS pEGFP-XPP32-volle Länge
XPO1 <i>Xenopus laevis</i>	pQC-His6-XPO1-volle Länge

Tab. 2.3.: Plasmide mit einklonierter DNA.

RZPD: Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung

 Δ : Deletion

Von J. Hauber und A. Prechtel, Hamburg, zur Verfügung gestellt:

Protein	Plasmid mit einklonierter DNA
eIF5A	pGEX-eIF5A
CD83	pcDNA3-CD83 SL2, pcDNA3-CD83 volle Länge pcDNA3-CD83 volle Länge- Δ SL2 pcDNA3-CD83 SL2 wobble, pcDNA3-CD83 SL2 wobble volle Länge

Tab. 2.4.: Plasmide mit einklonierter DNA (J. Hauber, A. Prechtel, Hamburg).

2.2.2. Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma biomers (Ulm) bezogen.

Der Oligo-dT-Primer für die reverse Transkription wurde von der Firma Promega (Mannheim) oder MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

2.2.2.1. Insertprimer

Primer	Bemerkung	verwendete Schnittstelle	Zielvektor	Sequenz	T _m
XNM IC (Kernmyosin IC), <i>Xenopus laevis</i>					
XNM IC Aminoterminus, 16 Aminosäuren					
XNMyoC-f-5`	Startkodon	HindIII	pEGFP-N1	5`-ttgaagcttacgatgaagtacagagcagcg-3`	64°C
XNMyoIC-r-3`		HindIII	pEGFP-N1	5`-ccgaagctttaaggcactttccatggtgac-3`	67°C
XNMyoC-f-5`	Startkodon	mit EcoRI aus pCR-TOPO	pCR-TOPO pGEX-5.1	5`-ttgaagcttacgatgaagtacagagcagcg-3`	64°C
XNMyoIC-r-3`		mit EcoRI aus pCR-TOPO	pCR-TOPO pGEX-5.1	5`-ccgaagctttaaggcactttccatggtgac-3`	67°C
XNM IC verkürztes Protein, 240 aminoterminal Aminosäuren					
XNMyoC-f-5`	Startkodon	HindIII	pQC-His6	5`-ttgaagcttacgatgaagtacagagcagcg-3`	64°C
XMyoC-r-3`		HindIII	pQC-His6	5`-tgcaagcttcaagaccagacggcgaa-3`	70°C
Transkriptionsfaktor IIIA (TFIIIA), Oozytentyp, <i>Xenopus laevis</i>					
TFIIIA volle Länge					
TF3Afl-f-5`	Startkodon	BamHI	pQC-His6	5`-tgtggatccgctgaaggagagatgggagag-3`	70°C
TF3Afl-r-3`	volle Länge, kein Stopkodon	HindIII	pQC-His6	5`-cttaagctttgtatagttaattatctagaa-3`	51°C
ElrA, <i>Xenopus laevis</i>, Äquivalent zu HuR					
ElrA volle Länge					
elrA-f-3`	Startkodon	BamHI	pQC-His6 pEGFP-N3	5`-aggggatccaagatgtctaacggttatgaaga-3`	65°C
elrA-r-5`	volle Länge, kein Stopkodon	BamHI	pQC-His6 pEGFP-N3	5`-agcggatcctttgtgtgacttgctggtttt-3`	68°C

Primer	Bemerkung	verwendete Schnittstelle	Zielvektor	Sequenz	Tm
XAPRIL, <i>Xenopus laevis</i>, mögliches Äquivalent zu APRIL					
XAPRIL volle Länge					
X-APR 5`	Startkodon	BamHI	pEGFP-N3	5`-aac <u>ggatcc</u> agcaagatggacatgaaa-3`	64°C
X-APR 3`	kein Stopkodon	BamHI	pEGFP-N3	5`-gtc <u>ggatcc</u> atcctctctctgacacctca-3`	63°C
XAPRIL mit deletiertem Kernlokalisierungssignal					
XAPRIL-GST-5`	Startkodon	BamHI	pGEX-5.1	5`-aatt <u>ggatcc</u> agatggacatgaaa-3`	56°C
XAPRIL-GST-3`	NLS deletiert	XhoI	pGEX-5.1	5`-tttctc <u>gagttt</u> gccagattctcttc-3`	59°C
XPP32, <i>Xenopus laevis</i>, mögliches Äquivalent zu PP32					
XPP32 mit deletiertem Kernlokalisierungssignal					
XPP32 5`	Startkodon	BamHI	pEGFP-N3	5`-agt <u>ggatccc</u> gcagaatggacatgaagaa-3`	68°C
XPP32tr-3` Hind	NLS deletiert	HindIII	pQC-His6	5`-ctta <u>agcttt</u> ccccgtgttc-3`	52°C
XPP32 volle Länge					
XPP32 5`	Startkodon	BamHI	pEGFP-N3	5`-agt <u>ggatccc</u> gcagaatggacatgaagaa-3`	68°C
X-PP32 3`	kein Stopkodon	BamHI	pEGFP-N3	5`-ttt <u>ggatcc</u> gtcatcatctccccctcgt-3`	70°C
XPO1, <i>Xenopus laevis</i>, Äquivalent zu CRM1/exportin1					
XPO1 volle Länge					
XPO1 F1-5`	Startkodon	BamHI	pQC-His6	5`-aa <u>ggatcc</u> atgccagcaattatgacc-3`	63°C
XPO1 R1-3`	kein Stopkodon	HindIII	pQC-His6	5`-taaa <u>agctt</u> gtcgcacatttctcagg-3`	61°C

Tab. 2.5.: Insertprimer.

Tm: Schmelztemperatur des Primers.

2.2.2.2. Sequenzierprimer

Primer	Sequenz forward 5`	Tm	Sequenz reverse 3`	Tm
M13 (pCR-TOPO)	5`-gtaaaacgacggccagtg-3`	49°C	5`-ggaacagctatgacctga-3`	47°C
pEGFP-N	5`-taggcgtgtacggtggg-3`	50°C	5`-ccgtttacgtcgcctg-3`	50°C
pGEX:	5`-gcgaccatctccaaaat-3`	50°C	5`-tttcacctcatcaccga-3`	50°C
pQC-His6:	5`-gagoggataacaatttcacac-3`	49°C	5`-aatccagatggagtctcagg-3`	50°C

Tab. 2.6.: Sequenzierprimer.

Tm: Schmelztemperatur des Primers.

2.2.3. RNA

Folgende RNA wurde durch in-vitro-Transkription gewonnen:

- CD83 SL2, CD83 SL2 wobble, CD83 volle Länge, CD83 volle Länge ΔSL2, CD83 volle Länge SL2 wobble

Für die Markierung der RNA wurde entweder Digoxigenin-UTP oder ³²P-UTP verwandt.

2.2.4. Proteine

- BSA Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
- IgG gereinigtes Kaninchen IgG, Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
- IgM gereinigtes Maus IgM, Sigma-Aldrich (Deisenhofen)

Folgende Proteine stammen aus eigener Aufreinigung:

- GST, GST-XAPRIL-ΔNLS, GST-eIF5A, GST-XPP32-ΔNLS, GST-TFIIIA-NES, GST-XNM IC-N-Terminus
- elrA-His6, Ran-His6, TFIIIA-His6, XNM IC-trunc-His6, XPO1-His6, XPP32-ΔNLS-His6

Folgende Proteine wurden von J. Hauber, Hamburg, zur Verfügung gestellt:

- **HuR-His, GST-HIV-1-Rev-NES**

2.2.5. Enzyme

- „Calf Intestine Alkaline Phosphatase“ (CIAP): MBI Fermentas (St. Leon-Rot)

- Polymerasen:

- Taq- und Pfu-Polymerase: MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und institutseigene Herstellung
- Phusion High-Fidelity DNA Polymerase: Finnzymes, New England Biolabs (Frankfurt)
- T3-Polymerase, T7-Polymerase, SP6-Polymerase: MBI Fermentas (St. Leon-Rot)

- Restriktionsendonukleasen:

Alle Restriktionsenzyme wurden von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

Verwandt wurden die Restriktionsenzyme:

- BamHI 5`...G[^]GATCC...3`
- EcoRI 5`...G[^]AATTC...3`
- HindIII 5`...A[^]AGCTT...3`
- SmaI 5`...CCC[^]GGG...3`
- XbaI 5`...T[^]CTAGA...3`
- XhoI 5`...C[^]TCGAG...3`

- Reverse Transkriptase MMuLV RNase H Minus (50 U/μl): Promega (Mannheim) oder MBI Fermentas (St.Leon-Roth)
- Ribonuklease-Inhibitor (RNAsin): MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
- T4-DNA-Ligase: MBI Fermentas (St. Leon-Rot)

2.2.6. Kits

- BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (ABI)
- DIG RNA Labeling Kit von (Roche, Mannheim)
- E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit, PEQLAP (Erlangen)
- E.Z.N.A. Gelextraktions Kit, PEQLAP (Erlangen)
- peqGOLD TriFast (PEQLAB, Erlangen)
- Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Invitrogen, Karlsruhe)
- Reverse Transkription (Promega, Mannheim)
- Reverse Transkription (MBI Fermentas, St. Leon-Roth)
- TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen (Karlsruhe)
- T7 in-vitro-Transkriptions-Kit von Promega (Mannheim)

2.2.7. Marker

2.2.7.1. Größenmarker für die DNA-Gelelektrophorese

- λDNA molecular weight marker III (λDNA · Eco RI + Hind III) (MBI Fermentas):
564, 831, 947, 1375, 1584, 1904, 2027, 3530, 4268, 4973, 5148, 21226 bp
- FastRuler DNA Ladder, Middle range (MBI Fermentas, St. Leon-Rot):
100, 400, 850, 2000, 5000 bp
- MyoBP-Ladder (institutseigene Herstellung):
71, 122, 343, 648, 745, 1143, 2334, 3030, 4468 bp

2.2.7.2. Molekulargewichtsmarker für SDS-PAGE

- Precision Plus Protein Standards-Dual Color von BIO-RAD, München:
10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150, 250 kDa

➤ “High”- und “Low- Range”- Marker, BIO-RAD, München:

“High-Range”-Marker	“Low-Range”-Marker	Molekulargewicht in kDa
Myosin		200,000
b-Galactosidase		116,250
Phosphorylase B	Phosphorylase B	97,400
BSA	BSA	66,200
Ovalbumin	Ovalbumin	45,200
	Karbonat-Anhydrase	31,000
	Trypsin-Inhibitor	21,500
	Lysozym	14,400

Tab. 2.7.: “High”- und “Low- Range”- Marker, BIO-RAD, München.

2.3. Chemikalien

Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle Chemikalien in Analysequalität von folgenden Firmen bezogen: Applichem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Deisenhofen):

2.4. Material für die Zellkultur

Gewebekulturplatten, Petrischalen und Stripetten wurden bezogen von Corning Costar (Bodenheim), 15- und 50 ml- Zentrifugenröhrchen von Sarstedt (Nümbrecht), Zellkulturmedien und Zusätze von Gibco Invitrogen (Karlsruhe), Trypsin 250 von Difco.

2.5. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien wurden großteils über Hartenstein (Würzburg) oder Noras (Würzburg) bezogen.

CnBr-aktivierte Sepharose 4B	Amersham Biosciences (Uppsala)
Einbettmedium für Gefrierschnitte	Leica (Nussloch)
Femtotips-Injektionsnadeln	Eppendorf (Hamburg)
Glutathion-Sepharose-4B	Amersham Biosciences (Uppsala)
Kapillaren zur Schmelzpunktbestimmung	Hirschmann, über Noras (Würzburg)
Mehrwellobjektträger	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Microcon YM-10	Millipore
Mikroloader	Eppendorf (Hamburg)
Nickel NTA Agarose	QIAGEN (Hilden)
Nitrocellulose	Schleicher und Schuell (Dassel)
Nylonmembran	QIAGEN (Hilden)
Pasteurpipetten	Roth (Karlsruhe)

Röntgenfilm Cronex 5	AGFA
Whatman-Papier	Schleicher und Schuell (Dassel)
Verstärkerfolien	Dr.Gooß
2.6. Geräte	
Biophotometer	Eppendorf (Hamburg)
Brutschrank, CO ₂ -Auto-Zero	Hereus-Holding (Hanau)
Gelelektrophoresekammern	BIO-RAD (München)
Drehtisch Reax 2	Heidolph, über Hartenstein (Würzburg)
Drehtisch Rotary mixer	über Hartenstein (Würzburg)
Drystar Geltdrockner	H. Hölzel GmbH, über Hartenstein (Würzburg)
Elektronenmikroskop Zeiss EM 10	Zeiss (Oberkochen)
Waage DeltaRange PB3002	Mettler (Düsseldorf)
Feinwaage Mettler AC 100	Mettler (Düsseldorf)
Fluoreszenzmikroskop Axiophot Stereo	
HB050 mit Quecksilberlampe	Zeiss (Oberkochen)
Graphit-Blotkammer	LMS, über Hartenstein (Würzburg)
Heizblock	Liebisch, über Hartenstein (Würzburg)
Heizplatte IKA Combimag RCT	
Homogenisator RW20	Janke & Kunkel, über Hartenstein (Würzburg)
Kaltlichtquelle KL 1500	Schott
Kippschüttler WS5	Laborgerätebau Edmund Bühler (Tübingen)
Konfokales Laser Scanning Mikroskop	
TCS SP2	Leica
Kryostat-Mikrotom 2800 Frigocut	Reichert-Jung, Leica (Nussloch)
Mikroinjektionsgerät	Biochem Laborbedarf (Mannheim)
Mikroinjektor 5242	Eppendorf (Hamburg)
Mikromanipulator	Brinkmann Instrumentenbau (Mannheim)
Mikromanipulator	Leitz (Wetzlar)
Mikroschmiede	Bachofer Laboratoriumsgeräte (Reutlingen)
Minifuge RF	Hereus Sepatech (Hanau)
Netzgeräte	Fischer (Heidelberg)
Omnifuge 2.0 RS	Hereus (Hanau)
pH-Elektrode	über Hartenstein (Würzburg)
pH-Meter pH 525	WTW, über Hartenstein (Würzburg)
Sonifier B12	Branson Sonic Power Company, über Gerhard Heinemann (Schwäbisch Gmünd)

Stereolupe Wild M8	Leica
Sterile Werkbank BSB 6A	Gelaire Flow Laboratories
Tischzentrifuge „Mikroliter“	Hettich
Ultramikrotom	RMC (Tuson, USA)
Umkehrmikroskop Wilovert	Hund, Wetzlar
UV-Stratalinker	Stratagene EUROPE, Amsterdam, Holland
UV-Lampe	Bachofer Laboratoriumsgeräte (Reutlingen)
Vortexer GLW L46	
Wasserbad Thermomix 1441	Braun
Zentrifuge Biofuge A	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge Minifuge GL	Heraeus (Hanau)

2.7. Computerprogramme und Internet-Seiten

2.7.1. Programme

Adobe Photoshop CS Version 8.0.1
Betriebssystem Microsoft Windows XP
Microsoft Word 2000
Microsoft Powerpoint
Chromas version 1.45
Bioedit
Oligo.exe structure version 3.4

2.7.2. Internetseiten

Blast (Altschul et al., 1990)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
clustalW (Thompson et al., 1994)	http://www.ebi.ac.uk/clustalw/
ExpASy	http://expasy.org
Google	http://www.google.de
Resourcen-Center	http://www.rzpd.de
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Oligo Calculator	http://www.pitt.edu/~rsup/OligoCalc.html
RasMol Version 2.6.	
Reverse Complement	http://bioinformatics.org/sms/rev_comp.html
Pubmed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Primer3	http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
Unibibliothek Würzburg	http://www.bibliothek.uni-wuerzburg.de/
Webcutter	http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/

2.8. Datenbank-Eintragsnummern

Protein	Accession number und GenInfo Identifier (Nucleotide)
Myosin IA <i>Homo sapiens</i>	NM_005379 GI:29544746
Myosin IB <i>Homo sapiens</i>	NM_012223 GI:44889480
Myosin IC <i>Homo sapiens</i>	NM_033375 GI:46485767
Myosin ID <i>Homo sapiens</i>	NM_015194 GI:51100973
Myosin IE <i>Homo sapiens</i>	NM_004998 GI:55956915
Myosin IF <i>Homo sapiens</i>	NM_012335 GI:27544940
Myosin IG <i>Homo sapiens</i>	NM_033054 GI:54873626
Myosin IC <i>Xenopus laevis</i>	EF026164 GI: 117667424; EB724387 GI:95004021
Kernmyosin IC <i>Mus musculus</i>	AY007255 GI:11067001
Kernmyosin IC <i>Homo sapiens</i>	AC100748 GI:21306865; NM_033375 GI:46485767; BU859310 GI:24044302
Kernmyosin IC <i>Rattus norvegicus</i>	NM_023092 GI:12831208
Kernmyosin IC <i>Bos tauris</i>	DV924751 GI:82981079
Kernmyosin IC <i>Gallus gallus</i>	DR427647 GI:68329663
Kernmyosin IC <i>Xenopus laevis</i>	BC077774 GI:50416439
Kernmyosin IC <i>Xenopus tropicalis</i>	DN006063 GI:58849703
Aktin <i>Homo sapiens</i>	NM_001101 GI:50516088
Aktin <i>Xenopus laevis</i>	AF079161 GI:3348130
HuR <i>Homo sapiens</i>	U38175 GI:1022960
ElrA <i>Xenopus laevis</i>	U17596 GI:608536
APRIL <i>Homo sapiens</i>	NM_006401 GI:5454087
XAPRIL <i>Xenopus laevis</i>	BC073408 GI:49118408
PP32 <i>Homo sapiens</i>	NM_006305 GI:20127493
XPP32 <i>Xenopus laevis</i>	BC060336 GI:37805186
CRM1 <i>Homo sapiens</i>	NM_003400 GI:53759152
EXP1 <i>Mus musculus</i>	BC062912 GI:38566275
XPO1 <i>Xenopus laevis</i>	BC070550 GI:47125109
CD83 <i>Homo sapiens</i>	BC030830 GI: 21410826
XRan <i>Xenopus laevis</i>	AB030945 GI:6729159
Ran <i>Homo sapiens</i>	BC004272 GI:13279085
RanBP3 <i>Xenopus laevis</i>	BC072034 GI:48734617
RanBP3 <i>Homo sapiens</i>	NM_007320 GI:6466461
TFIIIA-Oozyttyp/somatisch <i>Xenopus laevis</i>	Protein P03001 GI: 2851464
5S rDNA-Oozyttyp <i>Xenopus laevis</i>	J01898 GI:176337
5S rDNA-somatisch <i>Xenopus laevis</i>	J01899.1 GI:176340

Tab. 2.8.: Datenbank-Eintragsnummern. Accession number und GenInfo Identifier (Nucleotide)

3. METHODEN

3.1. Flüssigkultur von Bakterien

Übernachtskulturen wurden in 10 bis 30 ml LB-Medium durch Animpfen mit einer gepickten Bakterienkolonie oder einem Aliquot aus einer Glycerinkultur angelegt. Zur Selektion wurde ein entsprechendes Antibiotikum zugesetzt. Größere Volumina LB-Medium, 100 bis 500 ml, wurden in Erlenmeyerkolben mit einem Aliquot aus einer Übernachtskultur angeimpft. Die Inkubation erfolgte im Bakterienschüttler bei 37°C.

LB (Luria-Bertani)-Medium: 10 g Bacto Trypton (Gibco)
5 g Hefeextrakt (Gibco)
5 g NaCl
ad 1000 ml mit bidestilliertem Wasser auffüllen; pH 7,4
Das LB-Medium wurde autoklaviert.

Antibiotika-Stammlösungen: Ampicillin: 100 mg/ml in bidestilliertem Wasser
Kanamycin: 50 mg/ml in bidestilliertem Wasser
Tetracyclin: 5 mg/ml in Ethanol 100 % zur Analyse

Antibiotika-Endkonzentrationen: Ampicillin: 100 µg/ml
Kanamycin: 50 µg/ml
Tetracyclin: 15 µg/ml

3.2. Anlegen von Glycerinkulturen

Für die Archivierung von Bakterien wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierzu wurde 150 µl Glycerin zu 850 µl einer Bakterien-Flüssigkultur pipettiert und gut durchmischt. Die Lagerung erfolgte bei -70°C. Zur Herstellung einer Flüssigkultur aus archivierten Bakterien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze Bakterien abgekratzt und in Medium überführt.

3.3. Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung erfolgte entweder nach dem modifizierten Protokoll für die DNA-Isolation mit alkalischer Lyse (Koul et al., 1997) oder unter Verwendung des Plasmidisolationskits nach den Angaben des Herstellers (E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit, PEQLAB, Erlangen, Deutschland).

3.3.1. Plasmidisolierung mit alkalischer Lyse (Koul et al., 1997)

Ein Milliliter einer Bakterien-Übernachtskultur wurde mit 10 000 x g für eine Minute abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Lösung 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung 2 wurde das

Reaktionsgefäß mehrmals invertiert, anschließend 150 µl Lösung 3 zugegeben und das Reaktionsgefäß vorsichtig geschüttelt. Der Zelldebris wurde eine Minute lang bei 10 000 x g abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Danach wurde ein Volumen eiskalter absoluter Ethanol zum Überstand zugegeben, durch Invertieren gemischt und die Plasmide sofort bei 10 000 x g für fünf Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Sediment zehn Minuten lang getrocknet und in 50 µl bidestilliertem Wasser gelöst.

<u>Lösung 1:</u>	50 mM	Glukose
	10 mM	EDTA, pH 8,0
	25 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	Spatelspitze	RNase A

<u>Lösung 2:</u>	0,2 N	NaOH
	1 %	SDS

<u>Lösung 3:</u>	60 ml	Kaliumacetat 5 M
	11,5 ml	Eisessig
	28,5 ml	ddH ₂ O

3.3.2. Plasmidisolierung mit dem Plasmidisolationskit (PEQLAB, Erlangen)

Der Plasmidisolationskit kombiniert eine modifizierte alkalische Lyse mit der selektiven und reversiblen DNA-Bindungseigenschaft einer Silikamembran. 5 bis 10 ml Bakterien einer Flüssigkultur wurden pelletiert und mit 250 µl der Lösung 1 gut resuspendiert. Anschließend wurde 250 µl Lösung 2 aufpipettiert und das Reaktionsgefäß mehrmals invertiert. Auf das nun klare Lysat wurde 300 µl Lösung 3 zugegeben und nach dem Invertieren sofort für zehn Minuten und 10 000 x g bei Raumtemperatur das nun flockige Präzipitat abzentrifugiert. Der Überstand wurde durch eine Säule mit einer Silikamembran für eine Minute bei 10 000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule mit 500 µl *High-bind*-Puffer und 750 µl Waschpuffer gewaschen. Nach einer einminütigen Trockenzentrifugation erfolgte die Plasmidisolierung aus der Säule mit 50 bis 100 µl sterilem bidestilliertem Wasser.

3.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration erfolgte gegen den Leerwert photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 Nanometer (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht etwa 50 µg/ml DNA oder 40 µg/ml RNA. Die Absorption bei 280 Nanometer zeigt die Verunreinigung durch Proteine, bei 230 Nanometer durch Peptide, aromatische Verbindungen und Kohlehydrate an. Aus den Quotienten konnte die Reinheit beurteilt werden.

Doppelsträngige DNA sollte einen Quotienten OD_{260}/OD_{280} von mindestens 1,8 und OD_{260}/OD_{230} von mindestens 2,2 aufweisen, RNA von 2,0 bzw. 2,2.

3.5. Fällung der DNA mit Natriumacetat und Ethanol

Zur Fällung der DNA wurde ein zehntel Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 2,5 Volumina absoluter Ethanol zur Analyse zugegeben. Optional erfolgte die Fällung bei -20°C für zwei Stunden oder bei -70°C für 30 Minuten. Anschließend wurde bei 4°C für 15 Minuten und $12\ 000 \times g$ zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Sediment zweimal mit 70-prozentigem Ethanol gewaschen. Der Überstand wurde jeweils nach der Zentrifugation für fünf Minuten bei 4°C und $12\ 000 \times g$ abgenommen. Nach Lufttrocknen für zehn Minuten konnte das Sediment in gewünschtem Puffer oder Wasser aufgenommen werden.

3.6. DNA-Gelelektrophorese

Durch das negativ geladene Phosphoribose-Rückgrat bewegt sich die DNA in einem elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode. Bei der DNA-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt, wobei aber auch die Konformation der DNA die Wandergeschwindigkeit beeinflusst. Ringförmig geschlossene DNA wandert umso schneller, je größer ihre Verwindungszahl ist. Linearisierte DNA wandert schneller als entspannte ringförmige DNA. Je nach erwarteter Fragmentgröße wurde 0,5 bis vier Prozent Universalagarose in DNA-Elektrophoresepuffer aufgeköcht. Nach dem Abkühlen der Agarose auf ungefähr 50°C wurde Ethidiumbromid mit einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml zupipettiert, die Agarose in den Gelschlitten eingefüllt und der Kamm eingesetzt. Nach Erstarren des Gels wurde die Gelkammer mit Elektrophoresepuffer gefüllt und der Gelschlitten eingesetzt. Der Größenmarker und die DNA-Proben wurden mit Laufpuffer und Lauffrontmarker versetzt und in die Taschen einpipettiert. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 100 V (10 V/cm) (TAE-Puffer, TBE-Puffer) oder bei bis zu 500 V (50 V/cm) (SB-Puffer) zur Anode. Unter UV-Licht waren die DNA-Banden durch Interkalation von Ethidiumbromid in die DNA sichtbar.

<u>TAE-Puffer (50x)</u>	2 M	Tris
	50 mM	EDTA
	1 M	Eisessig
	pH 8,5	

<u>TBE – Puffer (10x):</u>	890 mM	Tris
	890 mM	Borsäure
	20 mM	EDTA
	pH 8,2	

SB-Puffer (Natriumborat-Puffer) (20x) (Brody et al., Biotechnique 2004):

8 g NaOH (200 mM)
 45 g Borsäure
 ad 1000 ml mit bidestilliertem Wasser
 pH 8,0 - 8,5 (mit Borsäure)

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

Ethidiumbromid-Stammlösung: 10 mg/ml

Agarosekonzentration:

Agarosekonzentration in %	optimaler Trennbereich
0,3	5 – 60 kb
0,6	2 – 20 kb
0,8	1 – 10 kb
1,0	0,5 – 8 kb
1,2	0,4 – 6 kb
1,5	0,2 – 3 kb
2,0	0,1 – 2 kb

Tab. 3.1.: Agarosekonzentration und optimaler Trennbereich.

DNA-Längenmarker: λ DNA *molecular weight marker III* (MBI Fermentas)

FastRuler DNA Ladder, Middle Range (MBI Fermentas)

MyoPB-Ladder (institutseigene Herstellung)

3.7. DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen wurden nach der Kettenabbruch-Methode von Sanger und Coulson (1977) durchgeführt. Durch den Einbau eines fluoreszenzmarkierten Didesoxy-Nukleotids (ddNTP) kann die DNA-Polymerase kein weiteres Desoxy-Nukleotid (dNTP) mehr anfügen und es kommt somit zum Kettenabbruch. Da der Einbau zufällig erfolgt, entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge. Dem Premix (Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, ABI), bestehend aus dNTPs, ddNTPs (A: R6G, grün; T: ROX, rot; C: TAMRA, gelb; G: R110, blau), Polymerase, Puffer

und Magnesiumchlorid, wurde die zu sequenzierende DNA und das entsprechende Oligonukleotid beigelegt. Nach der Sequenzier-PCR wurde die DNA gefällt, getrocknet, in 25 µl TSR („*Template Suppressor Reagent*“) resuspendiert, nach einer Inkubationszeit von zwei Minuten bei 95°C in Sequenziergefae überführt und bis zur Sequenzierung in 4°C gelagert. Alternativ wurde die DNA nach dem Fällen in 25 µl *Hidi* gelöst und ohne Erhitzen in Sequenziergefae überführt. Die DNA-Fragmente wurden in einer Gelmatrix nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch die Laseranregung wurde je nach Farbstoffmarkierung des ddNTP eine charakteristische Wellenlänge emittiert, detektiert und mit einer entsprechenden Software verrechnet.

Standard-Sequenzierreaktion: 200 ng zu sequenzierende DNA
 10 bis 30 pMol Primer
 2 µl Premix (bzw. 5 µl Premix)
 ad 10 µl HPLC-Wasser (bzw. ad 20 µl)

Sequenzierprimer: siehe 2.2.2.2.

Standard-Sequenzier-PCR:

Zyklus	Schritt	Zeit	Temperatur
1	Initiale Denaturierung	1 min.	96°C
2 - 25	Denaturierung	30 sek.	96°C
	Primer Annealing	15 sek.	48°C
	Elongation	4 min.	60°C
26	Kühlung		4°C

Tab. 3.2.: Standard-Sequenzier-PCR.

3.8. RNA-Extraktion

3.8.1. RNA-Extraktion mit peqGOLD TriFast (PEQLAB)

Der Vorteil bei der Verwendung des TriFast-RNA-Extraktionskits liegt darin, dass aus derselben Probe sowohl RNA als auch DNA und Proteine (3.26.) isoliert werden können.

3.8.1.1. RNA-Extraktion aus Oozyten

Gesamtoozyten, Zytoplasma oder Oozytenkerne wurden mit wenig 3:1-Medium in 1 ml TriFast überführt und homogenisiert. Pro vier Gesamtoozyten oder Zytoplasma wurde 1 ml TriFast verwandt. Zur besseren Präzipitation der geringen RNA-Menge aus Oozytenkernen wurde 70 µg Glykogen zugesetzt. Konnten die Proben nicht sofort weiterverarbeitet werden, wurden sie vor Zugabe von Chloroform bei -70°C gelagert. Wurden die Proben sofort verarbeitet, wurde fünf Minuten bei

Raumtemperatur zur Dissoziation der Proteine von der RNA inkubiert, 200 µl Chloroform zupipettiert und durch Schütteln gemischt. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde bei 12 000 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, welche die RNA enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit 0,5 ml Isopropanol gefällt. Hierzu wurde die wässrige Phase zehn Minuten bei Raumtemperatur in Isopropanol zur Analyse inkubiert und anschließend für zehn Minuten bei 4°C und 12 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment zweimal mit 70-prozentigem Ethanol zur Analyse gewaschen. Es erfolgte eine Lagerung der Probe in 70-prozentigem Ethanol bei -20°C bis zur Weiterverwendung. Nach Zentrifugation bei 12 000 x g für fünf Minuten wurde der Überstand abgenommen, das Sediment zehn Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und in den entsprechenden Puffer oder in RNase-freies Wasser aufgenommen.

3.8.1.2. RNA-Extraktion aus adhärennten somatischen Zellen

Adhärennte somatische Zellen wurden in Petrischalen (Durchmesser 60 mm) kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde abgenommen und 2 ml TriFast auf die Zellen aufpipettiert.

Die Zellen wurden durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette lysiert. Das weitere Prozedere wurde wie in 3.8.1.1. beschrieben durchgeführt.

3.8.2. RNA-Extraktion mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol

Gesamtoozyten, Zytoplasma oder Oozytenkerne wurden in 3:1-Medium aufgenommen, zu gleichen Teilen mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Verhältnis 25:24:1) versetzt und homogenisiert. Zur besseren Präzipitation der geringen RNA-Menge aus Oozytenkernen wurde 70 µg Glykogen zugesetzt. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur zur Dissoziation der Proteine von der RNA wurde fünf Minuten bei 12 000 x g zentrifugiert. Die wässrige obere Phase, die die RNA enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zu gleichen Teilen mit Chloroform gemischt. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde fünf Minuten bei 12 000 x g zentrifugiert. Die obere Phase wurde wiederum in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit Isopropanol zur Analyse bei -20°C über Nacht gefällt. Nach der Sedimentierung bei 12 000 x g für zehn Minuten wurde die RNA zweimal mit 70-prozentigem Ethanol zur Analyse gewaschen, das Sediment zehn Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und in den entsprechenden Puffer oder in RNase-freies Wasser aufgenommen.

peqGOLD TriFast (PEQLAB, Erlangen):

gebrauchsfertig

Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Invitrogen, Karlsruhe):

gebrauchsfertig

Glykogen-Stammlösung:

7 mg/ml

3.9. Reverse Transkription

Die reverse Transkriptase ist ein Enzym mit der Eigenschaft, RNA in DNA umzuschreiben. Die so entstandene cDNA („*complementary*“ DNA) enthält im Gegensatz zur genomischen DNA keine Intronsequenzen.

3.9.1. Reverse Transkription mit dem M-MuLV Reverse Transkriptase RNase H Minus Kit (Promega, Mannheim)

Für einen Ansatz wurden 1 µg RNA auf 11 µl mit Aqua bidest aufgefüllt, für drei Minuten bei 70°C denaturiert und anschließend komplettiert mit:

- + 1 µl RNAse-Inhibitor (MBI Fermentas)
- + 4 µl Reverse-Transkriptase-Puffer (enthält bereits MgCl₂) (Promega)
- + 1 µl Nukleotid-Mix (10 mM je dNTP, MBI Fermentas)
- + 1 µl Oligo-dT-Primer (Promega)
- + 2 µl reverse Transkriptase M-MuLV (Promega)

Der Ansatz wurde eine Stunde bei 37°C und anschließend fünf Minuten bei 95°C inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.9.2. Reverse Transkription mit dem *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (MBI Fermentas, St. Leon-Roth)

Für einen Ansatz wurde 10 ng bis 5 µg RNA und 1 µl Oligo-dT-Primer (MBI Fermentas) in ein Reaktionsgefäß auf Eis pipettiert und mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde fünf Minuten lang bei 70°C inkubiert, anschließend auf Eis abgekühlt, kurz abzentrifugiert und komplettiert mit:

- + 1 µl RiboLock Ribonukleaseinhibitor (20 U/µl, MBI Fermentas)
- + 4 µl Reaktionspuffer (5 x)
- + 2 µl Nukleotid-Mix (10 mM je dNTP, MBI Fermentas)

Nach einer Inkubation für fünf Minuten bei 37°C wurde 1 µl der reversen Transkriptase (*RevertAid H Minus M-MuLV RT*, 200 U/µl) zupipettiert und bei 42°C für 60 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine Inkubation bei 70°C für zehn Minuten gestoppt und der Ansatz bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.10. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mithilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion lässt sich durch den Einsatz von spezifischen Oligonukleotiden (Primer) ein bestimmter DNA-Abschnitt vervielfältigen. Die PCR besteht aus den Komponenten Denaturierung, Hybridisierung der Oligonukleotide (Annealing) und Strangverlängerung (Elongation). Bei der Denaturierung werden die Doppelstränge der DNA in Einzelstränge zerlegt. Beim Annealing binden spezifischen Oligonukleotide, welche die zu

vervielfältigende DNA-Sequenz umrahmen, an ihre komplementäre Sequenz auf der DNA. Anschließend baut eine thermostabile DNA-Polymerase ausgehend von den Primern den komplementären Strang auf.

3.10.1. Primerdesign und PCR

Die Primer (siehe 2.2.2.) wurden mithilfe der Programme Oligo und Primer3 entworfen und von der Firma biomers (Ulm) bezogen. Beim Entwerfen der Primer wurde auf ein ausgewogenes Verhältnis von GC-Gehalt zu AT-Gehalt geachtet. Am 3'-Ende wurden repetitive Sequenz vermieden. Weiterhin wurden die Primer nach Möglichkeit so konzipiert, dass Primer eines Primerpaares nicht mit sich selbst oder dem anderen Primer hybridisieren oder Schleifen bilden konnten. An die so gefundene Primersequenz wurde die entsprechende Schnittstelle für Restriktionsenzyme und zusätzlich genügend flankierende Nukleotide angefügt, um ein effektives Schneiden des Enzyms zu ermöglichen. Nun wurde geprüft, ob das Leseraster eingehalten wurde und die komplementäre Sequenz nur einmal in der eingesetzten DNA vorhanden war.

Die Schmelztemperatur wurde mit dem Programm „*Oligocalculator*“ berechnet oder nach der Formel $T_m = 2^\circ\text{C} \cdot (A + T) + (G + C)$ abgeschätzt.

Die Annealingtemperatur für eine PCR mit der Taq- oder Pfu-Polymerase wurde zunächst 5°C unter der Schmelztemperatur angesetzt und bei unspezifischer Amplifikation schrittweise erhöht. Wurde ein Primerpaar mit verschiedenen Annealingtemperaturen verwandt, wurde die Hybridisierungszeit gesplittet und zuerst die Temperatur für den Primer mit der höheren Annealingtemperatur eingestellt, dann die niedrigere Hybridisierungstemperatur. Wurden mit dem Primer Schnittstellen eingefügt, so wurde für die Berechnung der Annealingtemperatur in den ersten fünf Zyklen die Schmelztemperatur der nicht komplementären Nukleotide der Schnittstellensequenz abgezogen. Für eine PCR mit der Phusion-Polymerase wurde bei Primern mit einer Länge über 20 Nukleotiden eine Annealingtemperatur von 3°C über der Schmelztemperatur des Primers mit der niedrigeren Schmelztemperatur gewählt. Für Primer bis 20 Nukleotiden Länge wurde als Annealingtemperatur die Schmelztemperatur des Primers mit der niedrigeren Schmelztemperatur eingestellt.

Taq- bzw. Pfu-Polymerase Standard-PCR-Ansatz (50 µl):

5 µl	Polymerase-Puffer (10 x)
3 µl (1-5 µl)	Magnesiumchlorid (25 mM) (Taq, Pfu) oder Magnesiumsulfat (25 mM) (Pfu)
1 µl	Nukleotid-Mix (10 mM je dNTP)
mind. 1 Molekül	Template (DNA)
je 0,5 µl	5'-Oligonukleotid (10 pMol/µl) und 3'-Oligonukleotid (10 pMol/µl)
1 µl	Taq-Polymerase (5 Units/µl) (keine Fehlerkorrektur, A-Überhang am 3'-Ende)

des PCR-Produkts) oder
 Pfu-Polymerase (2,5 Units/ μ l) (Fehlerkorrektur)
 ad 50 μ l Wasser (rein, DEPC behandelt)

Der Ansatz wurde auf Eis in ein 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß pipettiert und die Polymerase zum Schluss hinzugefügt.

Standard-PCR-Programm im Thermocycler:

Zyklus	Schritt	Zeit	Temperatur
1	Initiale Denaturierung	2 min.	96°C (94-96°C)
2-35 (33-40)	Denaturierung	30 sek.	96°C (94-96°C)
	Primer Annealing	30 sek. bzw. 2 x 15 sek.	Primer-abhängig
	Elongation	je nach Länge des Amplifikats Taq: 1000 Basen/Minute Pfu: 500 Basen/Minute	72°C
36	Finale Elongation	10 min.	72°C
37	Kühlung		4°C

Tab. 3.3.: Taq- bzw. Pfu-Polymerase Standard-PCR.

Phusion DNA-Polymerase (Finnzymes, New England Biolabs, Frankfurt) Standard-PCR-Ansatz

(20 μ l):

4 μ l High Fidelity Polymerasepuffer incl. MgCl₂ (5 x)
 0,4 μ l Nukleotid-Mix (10 mM je dNTP)
 0,4 μ l cDNA (40 ng)
 0,2 μ l 5`-Oligonukleotid (10 pMol/ μ l)
 0,2 μ l 3`-Oligonukleotid (10 pMol/ μ l)
 0,6 μ l DMSO
 0,2 μ l Phusion (2 Units/ μ l, glatte Enden)
 ad 20 μ l Wasser (rein, HPLC-Wasser oder DEPC behandelt)

Der Ansatz wurde auf Eis in ein 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß pipettiert und die Polymerase zum Schluss hinzugefügt.

Standard-PCR-Programm im Thermocycler:

Zyklus	Schritt	Zeit	Temperatur
1	Initiale Denaturierung	30 sek.	98°C
2-35 (33-40)	Denaturierung	10 sek.	98°C
	Primer Annealing	15 sek. (10 – 30 sek.)	Primer-abhängig
	Elongation	Fragment-abhängig 15 sek. pro 1 kb	72°C
36	Finale Elongation	5 min.	72°C
37	Kühlung		4°C

Tab. 3.4.: Phusion-Polymerase Standard-PCR.**3.11. Gelextraktion**

Die Extraktion von DNA-Fragmenten erfolgte aus TAE-gepufferten Agarosegelen (siehe 3.6.) mithilfe eines Gelextraktionskits nach den Angaben des Herstellers (E.Z.N.A. Gelextraktions Kit, PEQLAP, Erlangen).

Die gewünschte DNA-Bande wurde unter möglichst wenig UV-Exposition aus dem Gel ausgeschnitten und in ein zuvor abgewogenes Reaktionsgefäß überführt. Nach Wiegen des Gelstücks wurde ein Gelvolumen Bindepuffer zupipettiert und die Gelstücke bei 55°C komplett gelöst. Nun wurde die Lösung durch eine Zentrifugationssäule mit einer Silikamembran für eine Minute bei 10 000 x g zentrifugiert. Die DNA bindet reversibel an diese Membran. Nach zweimaliger Inkubation mit Waschpuffer für drei Minuten einer Zentrifugation sowie einer Trockenzentrifugation wurde die DNA mit sterilem, bidestilliertem Wasser aus der Säule eluiert. Hierfür wurden für die erste Elution 30 µl und für die zweite Elution 20 µl verwandt. Zur Kontrolle der Gelextraktion wurde ein Aliquot von 2 µl der ersten Fraktion und von 3 µl der zweiten Fraktion auf ein Agarosegel aufgetragen und eine Gelelektrophorese durchgeführt.

3.12. Schneiden der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Bakterien besitzen Restriktionsendonukleasen, um sich vor Fremd-DNA zu schützen. Restriktionsenzyme schneiden DNA an definierten Sequenzen. Je nach Restriktionsenzym entstehen glatte („*blunt ends*“) oder kohäsive Enden („*sticky ends*“).

Restriktionsendonukleasen:

Restriktionsenzym	Puffer	Temperatur	Units/ μ g DNA für die Übernachtinkubation
BamHI	BamHI-Puffer	37°C	0,5
EcoRI	EcoRI-Puffer	37°C	0,2
HindIII	Puffer R	37°C	0,1
SmaI	1 x TANGO-Puffer	30°C	0,2
Xba	1 x TANGO-Puffer	37°C	0,1
XhoI	Puffer R	37°C	0,1
BamHI + HindIII	2 x TANGO-Puffer	37°C	
EcoRI + XhoI	Puffer O	37°C	

Tab. 3.5.: Restriktionsendonukleasen.Standard-Ansatz für einen Verdau mit Restriktionsenzymen:

- 1 μ g DNA
 2 μ l Restriktionspuffer (passend zum Enzym, MBI Fermentas)
 1 μ l Restriktionsenzym (10 Units/ μ l, MBI Fermentas)(siehe 2.2.5.)
 ad 20 μ l mit Aqua bidest.

Der Ansatz wurde bei 37°C (SmaI 30°C) für ein bis vier Stunden inkubiert. Bei einer Inkubation über Nacht wurden nach Angaben des Herstellers zwischen 0,1 bis 0,5 Units/ μ g DNA verwendet. Die Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme erfolgte bei 85°C für 15 Minuten.

Sollte eine DNA-Sequenz mit zwei Restriktionsenzymen geschnitten werden, wurde der Verdau entweder sequenziell durchgeführt und die DNA zwischen den einzelnen Enzymreaktionen gefällt. Konnten beide Enzymen in einem gemeinsamen Restriktionspuffer ausreichende Aktivität entfalten, wurde der Verdau gleichzeitig nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

3.13. Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmide

DNA-Fragmente wurden gerichtet oder ungerichtet in Plasmide inkloniert. Bei der gerichteten Klonierung besaßen Insert und Plasmid zwei unterschiedliche flankierende Schnittstellen. Dadurch war die Einbaurichtung des Insert in das Plasmid festgelegt. Bei der ungerichteten Klonierung wurde mit nur einem Restriktionsenzym hydrolysiert. Das Insert konnte in zwei Orientierungen in das Plasmid ligiert werden. Die Orientierung wurde mit einer PCR oder einem Restriktionsenzymverdau überprüft. Bei der ungerichteten Ligation wurde zur Verhinderung der Autoligation eine Dephosphorylierung der Plasmide durchgeführt. PCR-Produkte konnten direkt in den pCR 2.1 TOPO-Vektor inkloniert werden.

3.13.1. Klonierung von PCR-Produkten in den pCR 2.1 TOPO-Vektor

Durch die terminale Transferaseaktivität der Taq-Polymerase wird ein 3'-Überhang aus Desoxyadenosin an das PCR-Produkt angehängt. Der pCR 2.1 TOPO-Vektor (siehe 2.2.1.2.) liegt linearisiert vor und besitzt einen 3'-Überhang aus Thymidin. Mithilfe der kovalent an die offenen 3'-Enden des Vektors gebundenen Topoisomerase wird das PCR-Produkt in den Vektor ligiert. Wurde für die PCR die Pfu-Polymerase oder die Phusion-Polymerase verwendet, wurde das PCR-Produkt zunächst gefällt oder geextrahiert und anschließend mithilfe der Taq-Polymerase ein dATP angehängt.

Ansatz für eine Anfügung von dATP:

16 µl	Template (Pfu- oder PHUSION-PCR-Produkt)
2 µl	Taq-Polymerase-Puffer (10 x)
3 µl (1-5 µl)	Magnesiumchlorid (25 mM)
0,4 µl	Nukleotidmix (10 mM je dNTP)
1 µl	Taq-Polymerase (5 Units/µl)

Der Ansatz wurde bei 72°C für 15 Minuten inkubiert.

Ansatz für eine TOPO-Ligation:

1 µl	Salt Solution (Invitrogen)
0,5 µl	pCR 2.1 TOPO-Vektor (Invitrogen)
2 µl	PCR-Produkt

Der Ansatz wurde gemischt, bei Raumtemperatur für fünf Minuten inkubiert, zu einem Aliquot chemisch kompetenter E. coli TOP10F oder XL1-blue pipettiert und vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation von 30 bis 45 Minuten auf Eis wurde der Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C durchgeführt und der Ansatz sofort wieder für fünf Minuten auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 250 µl vorgewärmtem SOC-Medium (Invitrogen) oder LB-Medium erfolgte die Ausbildung der Antibiotikaresistenz bei 37°C für 30 Minuten (Ampicillinresistenz) oder 60 Minuten (Kanamycinresistenz). Der Ansatz wurde auf einer Agarplatte mit Ampicillin oder Kanamycin ausgestrichen und die Platte bei 37°C über Nacht bebrütet.

3.13.2. Dephosphorylierung eines Plasmids

Wird zur Linearisierung eines Plasmids nur ein Restriktionsenzym verwendet, wird bei der Ligation eines Inserts in dieses Plasmid die Selbstligation des Plasmids favorisiert. Um dies zu verhindern, wurden die Schnittstellen dephosphoryliert, da die Ligase phosphorylierte Enden für eine Ligation benötigt. Hierzu wurde dem Restriktionsverdauansatz in den letzten 30 Minuten 0,5 µl CIAP („*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*“, MBI, Fermentas) zupipettiert. Die Inaktivierung erfolgte bei 85°C für 15 Minuten.

Alternativ wurde das Plasmid nach dem Restriktionsenzymverdau gefällt und anschließend dephosphoryliert.

3.13.3. Ligation

Die DNA-Ligase kann DNA-Fragmente durch Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpfen. Plasmid und Insert wurden mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten, so dass die Fragmente entweder komplementäre DNA-Überhänge oder glatte Enden besaßen.

Standard-Ligationsansatz (20 µl):

100 ng	Plasmid
mindestens dreifache Menge an Insert	
2 µl	T4-DNA-Ligase-Puffer (incl. ATP, MBI Fermentas)
1 µl	T4-DNA-Ligase
ad 20 µl	Aqua bidest

Der Ansatz wurde entweder 60 Minuten bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C inkubiert. Die Inaktivierung erfolgte bei 85°C für 15 Minuten.

3.14. Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Kompetente Bakterien sind in der Lage, Fremd-DNA aufzunehmen. Durch Modifikation der Lipiddoppelschicht, die die Bakterien umgeben, können sie chemisch kompetent gemacht werden (Chung et al., 1989).

Zunächst wurden tetracyclinresistente *E. coli*-Bakterien, welche kompetent gemacht werden sollten, auf eine Agarplatte mit Tetracyclin ausplattiert. Eine Kolonie wurde aufgenommen und eine Flüssigkultur mit Tetracyclin angelegt. 100 ml Flüssigkultur wurden bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,4 inkubiert. Nach Pelletieren der Kultur bei 4000 Umdrehungen pro Minute und 4°C für zehn Minuten wurde das Pellet im Kühlraum in 2,5 ml TSS aufgenommen, ohne Schäumen resuspendiert und sofort in Aliquots zu 100 µl schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -70°C.

TSS („Transformation and Storage Solution“):

LB-Medium

10 % (w/v) PEG 3000

5 % (v/v) DMSO

50 mM MgCl₂

pH 6,5

- sterilfiltrieren, Lagerung bei -20°C

3.14.1. Testen der Bakterien auf chemische Kompetenz

Zum Testen der Bakterien auf chemische Kompetenz wurde eine Transformation (siehe 3.15.) mit 10 pg und 100 pg pUC-Vektor (siehe 2.2.1.1.) durchgeführt. Der Transformationsansatz wurde auf ampicillinhaltige Agarplatten ausplattiert, bei 37°C über Nacht bebrütet und die gewachsenen Kolonien ausgezählt.

3.15. Transformation

Damit die DNA bei der Transformation nicht abgebaut wird, muss sie als ringförmiges DNA-Molekül vorliegen und einen Replikationsstartpunkt besitzen, der von der Bakterienzelle erkannt werden kann. Die für die Transformation in *E. coli*-Stämme XL1 blue, M15, BL21 und TOP10F (siehe 2.1.3.) verwandten Plasmide tragen Antibiotikaresistenzgene zur Selektion erfolgreich transformierter Bakterien.

100 µl kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, mit den zu transformierenden Plasmiden gemischt und 30 bis 60 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden wurden die Bakterien sofort für fünf Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurde 900 µl LB-Medium zupipettiert und die Bakterien zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz bei 37°C im Schüttler inkubiert. Für die Ausbildung der Ampicillin-Resistenz wurde 30 Minuten, für die Kanamycin-Resistenz 60 Minuten inkubiert. Mit einem in Ethanol getauchten und abgeflamten Drigalski-Spatel wurde jeweils ein Volumen von zehn bzw. 90 Prozent des Transformationsansatzes auf Selektionsagarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden kopfüber bei 37°C über Nacht inkubiert.

3.15.1. Anlegen von Abklatschplatten

Auf der Selektionsplatte wurden mit dem Transformationsansatz auch freies Insert oder Plasmide ohne Insert ausgestrichen. Dies kann beim Testen der Kolonien mittels PCR zu falsch positiven Ergebnissen führen. Daher wurden einzelne Bakterienkolonien auf eine weitere Selektionsplatte mit einem nummerierten Raster überführt und bei 37°C inkubiert. Von dieser Platte wurden Bakterien für eine PCR oder für Flüssigkulturen abgenommen.

3.15.2. Test der Bakterienklone nach Transformation

Mittels Restriktionsverdau oder Kolonie-PCR wurde geprüft, ob die Bakterien ein Plasmid aufgenommen haben, und ob dieses Plasmid ein Insert in der richtigen Orientierung enthält.

Für den Restriktionsverdau wurde zunächst eine Flüssigkultur angelegt und die Plasmide aus den Bakterien isoliert. Das Insert wurde aus dem Plasmid mit dem entsprechenden Restriktionsenzym (siehe 2.2.5. und 3.12.) herausgeschnitten und der Ansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt. Zur Prüfung der Orientierung des Inserts wurde ein Restriktionsenzym ausgewählt, welches eine Schnittstelle sowohl innerhalb des Inserts als auch innerhalb des Plasmids besitzt. Anhand der Fragmentgrößen konnte eine Aussage über die Orientierung des Inserts gemacht werden.

Für die Prüfung der Orientierung mittels PCR wurden jeweils 5`- oder 3`-Primer für Vektor und Insert kombiniert. Je nach Auftreten oder Fehlen eines amplifizierten Fragments in der anschließenden Gelelektrophorese konnte die Orientierung des Inserts im Plasmid festgestellt werden. Für die Kolonie-PCR wurden Bakterien von der Abklatschplatte mit der Pipettenspitze aufgenommen und in einem PCR-Reaktionsansatz resuspendiert. Der Reaktionsansatz wurde als „*Master-Mix*“ angesetzt, wobei ein Ansatz zu 50 µl (siehe 3.10.1.) für drei Reaktionen ausreicht (je Reaktion 16 µl). Nach der PCR mit den spezifischen Insert-Primern wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt.

3.16. Transfektion von somatischen Zellen mit Effectene (QIAGEN)

Mit dem „*Effectene Transfection Reagent*“, einer nicht-liposomalen Lipidrezeptur, kann auch in Anwesenheit von Serum eine hohe Transfektionsrate in somatischen Zellen erreicht werden. Die DNA wird durch Interaktion mit einem Verstärker kondensiert. Gibt man nun Effectene dazu, bilden sich kondensierte Effectene-DNA-Komplexe. Diese werden mit Zellkulturmedium gemischt und direkt auf die Zellen gegeben.

Die Zellen wurden am Tag vor der Transfektion in Petrischalen (Durchmesser 35 mm) mit sterilen Deckgläschen (Durchmesser 12 mm) ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 40 bis 80 Prozent kultiviert. Pro Schale wurde 0,4 µg Plasmid-DNA mit DNA-Kondensationspuffer auf ein Endvolumen von 100 µl aufgefüllt und 3,2 µl Verstärker zupipettiert. Nach einer Inkubation von zwei bis fünf Minuten bei Raumtemperatur wurde 10 µl Effectene zugegeben und gut gemischt. Bei der anschließenden Inkubation für fünf bis zehn Minuten bei Raumtemperatur formten sich die Transfektionskomplexe. 600 µl Zellkulturmedium wurde nun mit dem Transfektionsansatz gemischt und auf die Zellen aufgetropft. Nach 18 Stunden wurde das Medium gewechselt. Die Deckgläschen wurden nach 24 beziehungsweise 48 Stunden entnommen, die Zellen fixiert, permeabilisiert und die DNA mit Hoechst (siehe 3.31.1.1.4.) gegengefärbt. Nach Eindeckeln in Mowiol erfolgte eine Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie (siehe 3.35.).

3.17. Herstellung von markierter RNA durch in-vitro-Transkription

Um das Transportverhalten einer mRNA beziehungsweise von bestimmten Strukturelementen innerhalb der mRNA zu studieren, wurde die RNA markiert und in Zellen injiziert. Grundlage für die in-vitro-Transkription waren Plasmide mit Promotersequenzen für eine RNA-Polymerase und einer inserierten DNA-Sequenz als Template. Vor der in-vitro-Transkription erfolgte eine Linearisierung des Plasmids am 3`-Ende des Inserts mit dem entsprechenden Restriktionsenzym sowie eine Fällung der DNA mit Natriumacetat und Ethanol.

3.17.1. Markierung der RNA mit Digoxigenin

Die RNA kann nicht-radioaktiv mit Digoxigenin (DIG) über den Einbau von DIG-UTP markiert werden. Hierzu wurde der DIG RNA *Labeling Kit* von Roche (Mannheim) verwendet.

Standardansatz für eine in-vitro-Transkription in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis:

1 µg	linearisierte DNA (in Wasser)
2 µl	Transkriptionspuffer (10 x)
2 µl	NTP-Markierungsgemisch, enthält auch DIG-UTP
1 µl	RNase-Inhibitor
2 µl	RNA-Polymerase (T7, T3 oder SP6)

auf 20 µl mit RNase-freiem Wasser auffüllen.

Die Transkription erfolgte bei 37°C für zwei Stunden. Anschließend wurde die Reaktion mit 2 µl EDTA-Lösung (0,2 M, pH 8,0) gestoppt. Die markierte RNA wurde mit Lithiumchlorid und Ethanol (siehe 3.17.3.) gefällt.

3.17.2. Radioaktive Markierung der RNA mit ³²P

RNA kann radioaktiv mit ³²P-UTP markiert werden. Die Halbwertszeit von ³²P beträgt 14,28 Tage. Alle Arbeiten müssen in einem zugelassenen Radioaktivlabor durchgeführt werden. Zur Abschirmung der Strahlung wurde Eis, Plexiglas und Blei verwandt. Für die in-vitro-Transkription wurde das „Riboprobe in vitro Transcription System“ von Promega verwandt.

Standardansatz für eine in-vitro-Transkription mit ³²P-UTP:

2,25 µl	linearisierte DNA (0,2 bis 1µg/µl in Wasser)
2,5 µl	Transkriptionspuffer
1 µl	DTT, 100 mM
0,6 µl	RNase-Inhibitor
0,55 µl	ATP, CTP, GTP (10 mM)
1,3 µl	UTP (10 mM, 1:100 verdünnt mit RNase-freiem Wasser)
2,5 µl	³² P-UTP (10 µCi/µl)
0,7 µl	RNA-Polymerase (T7, T3 oder SP6)

Die Transkription erfolgte für zwei Stunden bei 37°C. Anschließend wurde 15 Minuten bei 37°C mit 0,5 µl DNase zum Verdau des DNA-Templates inkubiert und die RNA mit Lithiumchlorid und Ethanol gefällt.

3.17.3. Fällern der RNA mit Lithiumchlorid und Ethanol

Zum Fällern der RNA wurde ein zehntel des Volumen an 4 M Lithiumchlorid und 2,5 Volumina absoluter Ethanol zur Analyse, vorgekühlt bei -20°C, zugegeben. Die Fällung erfolgte für zwei Stunden bei -20°C oder für 30 Minuten bei -70°C. Anschließend wurde bei 4°C für 15 Minuten und 12 000 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Sediment zweimal mit 70-prozentigem Ethanol gewaschen. Nach Lufttrocknen für zehn Minuten wurde die RNA in RNase-freiem Wasser aufgenommen und eventuell ein Aliquot für die photometrische Konzentrationsbestimmung

entnommen. Anschließend wurde 1 µl RNase-Inhibitor zupipettiert.

3.18.1. RNA-Gelelektrophorese mit Agarosegelen

DIG-UTP-markierte RNA wurde in *Xenopus*-Oozyten mikroinjiziert. Anschließend wurde die RNA aus zehn Zellkern- oder Zytoplasmafraktionen isoliert (siehe 3.8.) und in RNA-Probenpuffer aufgenommen. Nach fünfminütigem Erhitzen bei 65 bis 70°C wurde die RNA langsam abgekühlt und der Beladungspuffer zupipettiert. Für 40 ml ein- bis vierprozentiges Agarosegel wurde die Agarose in 33,2 ml Elektrophoresepuffer aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf ungefähr 50°C wurde 6,8 ml Formaldehyd (37 %) zugegeben und das Gel in den Gelschlitten eingegossen. Die Elektrophorese erfolgte bei 10 V/cm. Die RNA wurde entweder durch Färbung in einem Ethidiumbromidbad sichtbar gemacht oder mittels Northern-Blot auf eine Nylonmembran übertragen.

<u>RNA-Elektrophorese-Puffer:</u>	20 mM	Mops
	5 mM	Natriumacetat
	1 mM	EDTA
	pH 7,0	lichtgeschützt aufbewahren
<u>RNA-Agarose-Gel:</u>	1,25 %	Agarose in RNA-Elektrophoresepuffer
	17 %	Formaldehyd
<u>RNA-Probenpuffer:</u>	120 µl	Formamid
	90 µl	RNA-Elektrophoresepuffer
	40 µl	Formaldehyd
<u>Beladungspuffer (10 x):</u>	50 %	Glycerin
	0,4 %	Bromphenolblau
	0,4 %	Xylenzyanol
	1 mM	EDTA
	pH 8,0	

3.18.1.1. Northern-Blot

Durch einen Kapillarblot kann RNA aus dem Gel auf eine Nylonmembran transferiert werden. Die RNA kann dann anhand von Sonden oder mithilfe Digoxigeninmarkierung immunologisch detektiert werden. Nach der Elektrophorese wurde das RNA-Agarosegel dreimal für fünf Minuten in bidestilliertem Wasser gewaschen und für zehn Minuten in 20 x SSC äquilibriert. Die RNA wurde über Nacht durch einen Kapillarblot mit 20 x SSC auf eine Nylonmembran (Quiabrane) geblottet. Hierzu wurde über einer Glasschale mit 20 x SSC eine Glasplatte platziert. Auf diese wurde angefeuchtetes Filterpapier so gelegt, dass beide überhängenden Enden Kontakt zum 20 x SSC in der

Glasschale bekamen. Das Gel wurde mit der Vorderseite nach unten auf das Filterpapier gelegt und die Gelränder mit Folie abgedichtet. Auf das Gel wurde eine Nylonmembran aufgelegt, darauf zwei Filterpapiere und ein Stapel saugfähiger Zellstoff. Der Blot wurde mit einem Gewicht auf einer Glasplatte beschwert. Nach dem Blotten über Nacht wurde die Nylonmembran zweimal kurz mit 2 x SSC gewaschen und die RNA im Stratagene UV Crosslinker mit der Funktion „*Autocrosslink*“ an die Membran vernetzt. Anschließend wurde die Membran erneut kurz in 2 x SSC gewaschen.

<u>20 x SSC:</u>	3 M	NaCl
	0,3 M	Natriumcitrat
	pH 7,0	

3.18.1.2. Detektion

Die Detektion der Digoxigenin-markierten RNA erfolgte immunologisch mithilfe eines gegen Digoxigenin gerichteten Antikörpers. An diesen ist alkalische Phosphatase gekoppelt. Die RNA kann entweder mit einer nachfolgenden enzymkatalysierten Farbreaktion oder mit einer Chemilumineszenz und der Belichtung eines Röntgenfilms nachgewiesen werden.

Nach dem Vernetzen der RNA auf der Nylonmembran wurde diese 30 Minuten in Puffer 2 geblockt und anschließend 30 Minuten mit anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase- Konjugat (a-DIG-AP, Roche) bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde dreimal für fünf Minuten in Puffer 1 gewaschen. Wurde die Membran mit Nitroblau-Tetrazoliumsals (NBT) und 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat (BCIP) in Puffer 3 im Dunkeln inkubiert, entstand ein unlöslicher blauvioletter Niederschlag an der Position der mit Antikörpern markierten RNA.

Für die Detektion der RNA durch Chemilumineszenz wurde die Membran zunächst fünf Minuten in Äquilibrierungspuffer und dann fünf Minuten in „*DNA Thunder Chemiluminescence Reagent*“ geschwenkt. Anschließend wurde die Membran in eine lichtdurchlässige Folie eingeschlagen. In der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und durch die Photonenemission bis zu 48 Stunden lang belichtet.

Lösungen zur Detektion der RNA:

<u>Puffer 1:</u>	100 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	150 mM	NaCl
<u>Puffer 2:</u>	1 %	Blocking Reagenz in Puffer 1
<u>Puffer 3:</u>	100 mM	Tris-HCl, pH 9,5
	100 mM	NaCl
	50 mM	MgCl ₂

Puffer 1 und 3 wurden autoklaviert.

<u>α-DIG-AP (Roche):</u>	1 : 5000 in Puffer 1
<u>NBT:</u>	50 mg/ml; in 70 % Dimethylformamid
<u>BCIP:</u>	50 mg/ml; in 100 % Dimethylformamid

<u>Färbelösung:</u>	10 ml	Puffer 3
	66 μ l	NBT
	33 μ l	BCIP

DNA Thunder CDP-Star Chemiluminescence Reagent (Perkin Elmer): gebrauchsfertig

<u>Äquilibriumspuffer:</u>	100 mM	Tris-HCl pH 9,5
	150 mM	NaCl

3.18.2. RNA-Acrylamid-Gelelektrophorese

Glasplatten wurden wie für die Protein-Gelelektrophorese beschrieben (siehe 3.20) vorbereitet. Das Acrylamidgel wurde bis zum oberen Ende der Glasplatten eingegossen und der Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Die Polymerisierung erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Nach luftblasenfreiem Einsetzen in die Elektrophoreseapparatur wurde eine Vorelektrophorese für 30 Minuten durchgeführt. 32 P-markierte RNA wurde in *Xenopus*-Oozyten mikroinjiziert. Anschließend wurde die RNA aus zwei bzw. fünf Zellkern- oder Zytoplasmafraktionen isoliert (siehe 3.8.) und in RNA-Probenpuffer aufgenommen. Die RNA-Proben wurden mit Beladungspuffer versetzt und für fünf Minuten auf 65°C erhitzt. Vor dem Beladen des Gels wurden die Taschen ausgespült. In freie Geltaschen wurde Beladungspuffer mit Blaumarker pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 40 mA, bis das Xylenzyanol, welches bei etwa 100 Basen läuft, etwa drei Viertel der Gelstrecke zurückgelegt hat.

<u>TBE – Puffer (10x):</u>	890	mM Tris
	890	mM Borsäure
	20	mM EDTA
		pH 8,2

<u>Gel-Stammlösung:</u>	8 M	Harnstoff
	6 %	Acrylamid
		(aus einer 30 %igen Lösung Acrylamid:Bisacrylamid 29:1)
	10 %	TBE 10x

<u>RNA-Gelladepuffer:</u>	10 %	TBE 10x
	10 %	Glycerin
	8 M	Harnstoff

Blaumarker: Bromphenolblau (lila-blau) und Xylenzanol (türkis) in RNA-Gelladepuffer

Zusammensetzung eines 6 %igen RNA-Acrylamidgels:

60 ml	Gel-Stammlösung
230 µl	APS (10 %)
60 µl	TEMED

Elektrophoresepuffer: 1 x TBE

3.18.2.1. Autoradiographie

Nach der Gelelektrophorese wurde das RNA-Acrylamidgel auf Filterpapier im Vakuumtrockner getrocknet. Zur Strahlungsabschirmung wurde eine Plexiglasplatte aufgelegt. Anschließend wurde das Gel in eine bleibeschichtete Belichtungskammer mit Verstärkerfolien (Dr. Gooß) platziert und ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Belichtung erfolgte bei -70°C . Der Röntgenfilm wurde in der Dunkelkammer entwickelt und fixiert.

3.19. Herstellung rekombinanter Proteine in Bakterien

Die Herstellung rekombinanter Proteine in *E. coli* - Bakterien kann mittels IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) induziert werden. In ein prokaryotisches Expressionsplasmid wurde die cDNA-Sequenz für ein gewünschtes Protein oder einen Proteinabschnitt in die Klonierungsstelle inkloniert und das Plasmid in einen für die Proteinexpression geeigneten *E. coli*-Bakterienstamm transformiert (siehe 3.15). Aus einer Plasmid enthaltenden Bakterienkolonie oder einer Bakterien-Glycerinkultur wurde zunächst eine Übernachtskultur angelegt. Anschließend wurde mit dieser Kultur eine Flüssigkultur von 200 bis 500 ml angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,4 bis 0,6 kultiviert und IPTG in einer Konzentration von 0,1 mM bis 1 mM zugesetzt. Vor Zugabe des IPTG ist durch die Bindung des lac-Repressor-Tetramers an den lac-Operator die Proteinexpression des rekombinanten Proteins unterdrückt. Das Laktoseanalogon IPTG, welches selbst nicht verstoffwechselt wird, bindet an den lac-Repressor und wirkt dort als allosterischer Effektor. Mit der Konformationsänderung des Repressors ändert sich nun auch seine Affinität zur DNA-Bindungsstelle. Folglich kommt es zur Bindung der RNA-Polymerase und zur Transkription und Translation.

Nach zwei bis fünf Stunden Kultivierung bei 37°C im Bakterienschüttler wurde die Flüssigkultur pelletiert, der Überstand dekantiert, autoklaviert und das Pellet bei -20°C bis zur Aufreinigung der rekombinanten Proteine (siehe 3.19.1. und 3.19.2) gelagert. Jeweils vor Zugabe von IPTG und am Ende der Proteinexpression wurde ein Aliquot der Bakterien entnommen, pelletiert, in SDS-Probenpuffer aufgekocht und die Proteinexpression mittels SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) und Coomassie-Färbung überprüft.

3.19.1. Aufreinigung von GST-gekoppelten Proteinen

Mithilfe einer Glutathion-Sepharose als Säulenmatrix können rekombinante GST-Fusionsproteine aus Bakterienlysaten aufgereinigt werden. GST (Glutathion-S-Transferase) bindet an das Glutathion der Sepharose. Mit reduziertem Glutathion wird kompetitiv das Fusionsprotein aus der Säule abgelöst.

Glutathion-Sepharose 4B wurde für fünf Minuten bei 4°C und 500 x g sedimentiert und dreimal mit PBS gewaschen. Pro 100 ml Bakterienkulturansatz wurde 50 µl abzentrifugierte Säulenmatrix eingesetzt. Je 100 ml Bakteriensediment wurde in 1 ml Resuspendierungspuffer resuspendiert und mit 2,6 µl MnCl (1 M), 26 µl MgCl₂ (1 M) und einer Spatelspitze Lysozym aus Hühnereiweiß versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten auf Eis wurde zum Aufschluss der Bakterienzellen dreimal 20 Sekunden lang sonifiziert. Anschließend wurde NaCl in einer Endkonzentration von 0,5 M und Triton in einer Endkonzentration von 1 % (v/v) zugegeben und die Suspension zehn Minuten auf Eis gestellt. Danach erfolgte eine Zentrifugation für zehn Minuten bei 4°C und 13 000 x g.

Je ein Aliquot des Überstands und des Sediments wurde auf ein Proteingel aufgetragen. Zeigte sich das Protein in der Sedimentfraktion, mussten zunächst die Einschlusskörperchen mit einem Harnstoffpuffer aufgeschlossen werden (siehe 3.19.1.1.). Befand sich das aufzureinigende Protein im Überstand, wurde dieser auf die vorbereitete Säulenmatrix aufpipettiert. Die Bindung der GST-Fusionsproteine an die Säule erfolgte für eine Stunde bei 4°C auf dem Drehtisch. Nach der Zentrifugation bei 500 x g und 4°C für fünf Minuten wurde der nicht gebundene Überstand entfernt und die Säule mit 1 ml Waschpuffer 1 und danach dreimal mit Waschpuffer 2 gewaschen. Eluiert wurde dreimal mit 50 µl Elutionspuffer, wobei jeweils zehn Minuten auf dem Drehtisch inkubiert und nach der Zentrifugation für fünf Minuten bei 500 x g und 4°C der Überstand mit dem eluierten GST-Fusionsprotein abgenommen wurde. Das Eluat wurde über Nacht bei 4°C gegen PBS dialysiert.

Proteinaseinhibitormix (nach Dhadialla und Raikhel, 1990)(alle Reagenzien von SERVA, Heidelberg):

1 mM	Benzamidin
1 mM	EDTA
2 µg/ml	Aprotinin
2 µg/ml	Antipain
2 µg/ml	Chymostatin
2 µg/ml	Leupeptin
2 µg/ml	Pepstatin (in DMSO lösen)

Der Proteinaseinhibitormix wurde als 100 x Konzentrat angesetzt und in -20°C gelagert.

PMSF: 100 mM in Methanol

<u>PBS:</u>	140 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	10 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,8 mM	KH ₂ PO ₄
	pH 7,4	
<u>Resuspendierungspuffer:</u>	PBS	
	1 mM	PMSF
	1:100	Proteinaseinhibitormix
<u>Elutionspuffer:</u>	50 mM	Tris
	150 mM	NaCl
	15 mM	Glutathion

3.19.1.1. Aufschluss von Einschlusskörperchen

Um die Einschlusskörperchen aufzuschließen, wurde je 100 ml Bakteriensediment in 4 ml Harnstoffpuffer resuspendiert und 30 Minuten bei 4°C unter leichtem Rühren inkubiert. Anschließend wurde 30 Minuten bei 4°C und 13 000 x g zentrifugiert und der Überstand zur Entfernung des Harnstoffs gegen PBS dialysiert. Die Dialyse erfolgte schrittweise zunächst gegen 6 M, 4 M, 3 M, 2 M und 1 M Harnstoff in PBS und anschließend gegen PBS ohne Harnstoff. Nach der Zentrifugation des Dialysats bei 13 000 x g und 4°C für 15 Minuten konnte der Überstand auf die vorbereitete Säulenmatrix aufgetragen werden (siehe 3.19.1.).

<u>Harnstoffpuffer:</u>	50 mM	Tris-HCl	pH 8,0
	50 mM	KCl	
	8 M	Harnstoff	
	1 mM	DTT	
	1 mM	PMSF	

<u>Dialyselösung:</u>	PBS	siehe 3.19.1.
		Harnstoffkonzentrationen: 6 M, 4 M, 3 M, 2 M, 1 M

3.19.2. Aufreinigung von His-gekoppelten Proteinen

Rekombinante His-markierte Fusionsproteine können mit einer speziellen Säulenmatrix, der Nickel NTA-Agarose, aus Bakterienlysaten aufgereinigt werden. Das Hexahistidintag bindet an das immobilisierte Metall Nickel. Ist eine Aufreinigung unter nicht denaturierenden Bedingungen nicht erfolgreich, wird sie unter denaturierenden Bedingungen wiederholt.

3.19.2.1. Aufreinigung unter nicht denaturierenden Bedingungen

Für die Säule wurden 2 ml Nickel NTA-Agarose (QIAGEN) eingesetzt, was einem Säulenvolumen von 1 ml entsprach. Die Säule wurde mit 7 ml Lysepuffer äquilibriert. Das Bakteriensediment wurde im fünffachen Eigenvolumen Lysepuffer pH 7,8 resuspendiert und zum kompletten Aufbrechen der Bakterien dreimal 20 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Die Suspension wurde zehn Minuten bei 10 000 x g zentrifugiert und der Überstand zur Proteinreinigung auf die äquilibrierte Nickel-NTA-Agarosesäule pipettiert. Die Säule durfte nicht trocken laufen oder durch den Pipettiervorgang aufgewirbelt werden. In die Elutionsfraktionen wurde ein zehntel Volumenanteil 1 M Tris-HCl, pH 9,5 zur Neutralisierung zugegeben, um saure Hydrolyse zu vermeiden.

Elutionsschema:

Säule		2 ml Ni-NTA-Agarose	Säulenvolumen 1 ml
Lysepuffer	pH 7,8	7 ml	
Probe		Überstand nach Lyse	Durchlauf wird gesammelt
Waschpuffer	pH 6,0	5 ml	Eluat 6,0
Waschpuffer	pH 5,5	1 ml	Eluat 5,5
Waschpuffer	pH 5,0	1 ml	Eluat 5,0
Waschpuffer	pH 4,5	1 ml	Eluat 4,5
Waschpuffer	pH 4,0	1 ml	Eluat 4,0
Waschpuffer	pH 3,5	1 ml	Eluat 3,5
Waschpuffer	pH 3,0	1 ml	Eluat 3,0
Lysepuffer	pH 7,8	13 ml	Spülen der Säule

Tab. 3.6.: Aufreinigung von His-gekoppelten Proteinen unter nicht denaturierenden Bedingungen.
Elutionsschema für die Aufreinigung von His-gekoppelten Proteinen.

Die Säule wurde 30 Minuten mit 0,5 M NaOH inkubiert, anschließend in 30-prozentigem Ethanol aufgenommen und bei 4°C aufbewahrt.

Waschpuffer: Lysepuffer ohne Triton, + 10 % Glycerin
pH-Werte: 6,0 – 5,5 – 5,0 – 4,5 – 4,0 – 3,5 – 3,0

Lysepuffer: 50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl
1 % Triton
pH 7,8

3.19.2.2. Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen

Für die Säule wurden 2 ml Nickel NTA-Agarose (QIAGEN) eingesetzt, was einem Säulenvolumen von 1 ml entsprach. Die Säule wurde mit 7 ml Denaturierungspuffer äquilibriert. Das Bakteriensediment wurde pro Gramm Sediment in 5 ml Denaturierungspuffer pH 8,0 resuspendiert und zum kompletten Aufbrechen der Bakterien dreimal 20 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Danach wurde entweder eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C unter leichter Bewegung inkubiert. Die Suspension wurde zehn Minuten bei 10 000 x g zentrifugiert und der Überstand zur Proteinreinigung auf die äquilibrierte Nickel-NTA-Agarosesäule pipettiert. Die Säule durfte nicht trocken laufen oder durch den Pipettiervorgang aufgewirbelt werden. In die Elutionsfraktionen ab pH 6,3 wurde ein zehntel des Volumenanteils an 1 M Tris-HCl, pH 9,5 zur Neutralisierung zugegeben, um saure Hydrolyse zu vermeiden.

Alternativ wurde das Bakteriensediment in 5 ml Waschpuffer pH 8,0 pro Gramm Sediment aufgenommen, mit Ultraschall behandelt und wie oben beschrieben inkubiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand auf die mit Waschpuffer pH 8,0 äquilibrierte Säule gegeben. Nach dem Durchlaufen der Probe wurde die Säule mit Waschpuffer pH 8,0 gespült.

Elutionsschema:

Säule		2 ml Ni-NTA-Agarose	Säulenvolumen 1ml
Denaturierungspuffer	pH 8,0	7 ml	
Probe		Überstand nach Lyse	Durchlauf wird gesammelt
Denaturierungspuffer	pH 8,0	10 ml	10-faches Säulenvolumen
Waschpuffer	pH 8,0	5 ml	5-faches Säulenvolumen
Waschpuffer	pH 6,3	5 ml	5-faches Säulenvolumen
Elutionspuffer A	pH 5,9	3 ml	Eluat 5,9
Elutionspuffer A	pH 4,5	3 ml	Eluat 4,5
Elutionspuffer B		7 ml	Eluat B

Tab. 3.7.: Aufreinigung von His-gekoppelten Proteinen unter denaturierenden Bedingungen.

Elutionsschema für die Aufreinigung von His-gekoppelten Proteinen.

Die Säule wurde 30 Minuten mit 0,5 M NaOH inkubiert und anschließend in 30-prozentigem Ethanol aufgenommen und bei 4°C aufbewahrt.

Zum Entfernen des Harnstoffs aus dem Eluat 5,9 und Eluat 4,5 wurde gegen PBS dialysiert. Die Dialyse erfolgte schrittweise zunächst gegen 6 M, 4 M, 3 M, 2 M und 1 M Harnstoff in PBS und anschließend gegen PBS ohne Harnstoff.

<u>Denaturierungspuffer:</u>	6 M	Guanidinhydrochlorid
	0,1 M	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
	0,01 M	Tris-HCl
	pH 8,0	
<u>Waschpuffer:</u>	8 M	Harnstoff
	0,1 M	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
	0,01 M	Tris-HCl
	pH-Werte:	8,0 und 6,3
<u>Elutionspuffer A:</u>	Waschpuffer	
	pH-Werte:	5,9 und 4,5
<u>Elutionspuffer B:</u>	6 M	Guanidinhydrochlorid
	0,2 M	Essigsäure
<u>PBS:</u>	siehe 3.19.1.	
<u>Dialysepuffer:</u>	Harnstoffkonzentrationen: 6 M, 4 M, 3 M, 2 M, 1 M in PBS	
<u>Neutralisierungspuffer:</u>	1 M	Tris-HCl, pH 9,5

3.19.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration stand die Proteinbestimmung nach Bradford (BIORAD, durchgeführt nach den Angaben des Herstellers) zur Verfügung. Eine schnelle und kostengünstige Möglichkeit zur Abschätzung der Proteinkonzentration konnte durch Proteingelektrophorese (siehe 3.20.) geliefert werden. Ein Protein unbekannter Konzentration wurde in mehreren Verdünnungsstufen aufgetragen. Bovines Serumalbumin (BSA) wurde in einer Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen ebenfalls auf das Gel aufgetragen. Nach Anfärbung der Proteine im Gel mit Coomassie konnte aufgrund der Bandenstärke und Vergleich mit der BSA-Verdünnungsreihe die Konzentration des Proteins abgeschätzt werden.

BSA-Verdünnungsstufen: 0,1µg-0,25µg-0,5µg-1,0µg-2µg-5µg-10µg in PBS

3.20. Eindimensionale Protein-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteingemische wurden unter denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Hierfür wurde das Gel- und Puffersystem nach Thomas und Kornberg (1975) mit einer Acrylamidkonzentration von neun, zwölf und 18 Prozent benutzt.

Ornstein und Davis haben 1964 die diskontinuierliche Gelelektrophorese beschrieben (Ornstein, 1964; Davis, 1964). 1967 wurde die Verwendung von SDS bei der Gelelektrophorese publiziert (Shapiro 1967). Laemmli hat die diskontinuierliche Gelelektrophorese mit der Verwendung von SDS kombiniert (Laemmli, 1970). Thomas und Kornberg (1975) haben die von Laemmli beschriebene Methode modifiziert.

Die diskontinuierliche Gelelektrophorese zeichnet sich durch die Verwendung eines großmaschigen Sammelgels und eines engmaschigen Trenngels aus. Der Probenpuffer und das Sammelgel beinhalten Tris-HCl (pH 6,8), die Puffer in der Elektrophoresekammer Tris-Glycin (pH 8,8) und das Trenngel Tris-HCl (pH 8,8). Wird Strom an das Gelsystem angelegt, bilden Chloridionen im Sammelgel das so genannte „Leit-“, Glycin das „Folgeion“. Im sauren Milieu liegt Glycin ungeladen vor. Zwischen „Leit- und Folgeion“ bildet sich eine elektrische Feldstärke aus, die im Bereich des „Folgeions“ höher ist als im Bereich des „Leit-“. Hier ordnen sich die Proteine an. Treffen die Proteine auf das Trenngel, werden sie abgebremst und an der Oberfläche des Trenngels konzentriert. Das alkalische Milieu des Trenngels favorisiert die Ionisation von Glycin. Glycinat überholt die Polypeptide und wandert im Trenngel direkt hinter den Chloridionen.

Denaturierte Proteine binden SDS und werden dadurch negativ geladen. Durch die Überdeckung der Eigenladung der Proteine ist nun eine Auftrennung nach der Größe möglich. SDS bewirkt außerdem eine Entfaltung von Peptidketten. Disulfidbrücken können mit reduzierenden Thiolverbindungen, zum Beispiel Mercaptoethanol oder Dithiothreitol, gelöst werden.

Zwei Glasplatten wurden mit Ethanol gereinigt, die Abstandhalter seitlich dazwischengelegt, mit Klemmen fixiert und mit 0,5 Prozent Agarose in Wasser abgedichtet. Die Unterseite der Platten des Minigel-Systems wurden zuvor von außen mit Klebestreifen versehen und zwischen die Platten eine etwa 0,5 cm hohe Agaroseschicht gegossen. Das Trenngel wurde wie unten angegeben hergestellt. TEMED und APS wurden am Ende dazugegeben. Ammoniumpersulfat stellt freie Radikale für die Polymerisation von Acrylamid und Bisacrylamid zur Verfügung, TEMED katalysiert die Bildung der freien Radikale und beschleunigt so die Polymerisation. Das Trenngel wurde bis etwa 0,5 cm unterhalb der späteren Taschen gegossen und mit bidestilliertem Wasser überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser entfernt, das Sammelgel aufgegossen und der Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Nach Polymerisierung des Sammelgels wurde die untere Kammer der Elektrophoresekammer mit Puffer gefüllt und die Platten nach Entfernung des Klebestreifens beziehungsweise des unteren Abstandhalters luftblasenfrei eingesetzt. Nach Füllung der oberen Kammer mit Puffer wurde der Kamm entfernt.

Gefällte Oozytenproteine wurden bei 4 000 Umdrehungen pro Minute für zehn Minuten abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Sediment getrocknet. Das Sediment, die Molekulargewichtsmarker oder andere verwendete Proteine wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen, bei 95°C für fünf Minuten gekocht, abzentrifugiert und in die Geltaschen einpipettiert. In die Taschen konnten im Minigelsystem maximal 25 µl, bei großen Gelen bis 100 µl eingebracht werden. In leere Taschen wurde zur Markierung der Lauffront Bromphenolblau in Probenpuffer aufgetragen. Im Minigelsystem erfolgte die Auftrennung der Proteine bei einer Stromstärke von 40 mA pro Gel, bei großen Gelen über Nacht bei einer Stromstärke von 7 bis 11 mA.

Nach Entfernung von Sammelgel und Agaroseschicht konnte das Gel entweder für den Western-Blot (siehe 3.20.1.) oder eine Anfärbung der Proteine im Gel verwendet werden. Für eine Anfärbung der Proteine im Gel wurde mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur in der Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend über Nacht entfärbt. Alternativ wurde das Gel mit PAGE blue (MBI Fermentas) nach den Angaben des Herstellers gefärbt. Danach wurde das Gel entweder auf Filterpapier im Vakuumtrockner oder zwischen Einmachfolie eingespannt getrocknet oder für eine Silberfärbung weiterverwendet.

Zusammensetzung des Trenngels:

	2 Minigele		2 große Gele	
	12 %	18 %	12 %	18 %
A	4 ml	6 ml	16 ml	24 ml
B	2,5 ml	2,5 ml	10 ml	10 ml
ddH₂O	3,4 ml	1,4 ml	13,7 ml	5,7 ml
TEMED	3,33 µl	3,33 µl	13,33 µl	13,33 µl
APS	100 µl	100 µl	400 µl	400 µl

Tab. 3.8.: Zusammensetzung des Trenngels für 2 Minigele und 2 große Gele.

Zusammensetzung des Sammelgels:

	2 Minigele	2 große Gele
A`	0,65 ml	1,3 ml
C	1,25 ml	2,5 ml
ddH₂O	3,1 ml	6,2 ml
TEMED	5 µl	10 µl
APS	150 µl	300 µl

Tab. 3.9.: Zusammensetzung des Sammelgels für 2 Minigele und 2 große Gele.

Lösungen für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese:A 30 % Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung für das Trenngel

30 g Acrylamid
0,15 g Bisacrylamid
ad 100 ml ddH₂O; filtrieren

A` 30 % Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung für das Sammelgel

30 g Acrylamid
0,8 g Bisacrylamid
ad 100 ml ddH₂O

B Trenngelpuffer

3 M Tris-HCl pH 8,8
0,4 % SDS

C Sammelgelpuffer

0,75 M Tris-HCl pH 6,8
0,4 % SDS

D Ammoniumpersulfat (APS): 10 % in ddH₂OE Elektrophoresepuffer

50 mM Tris-HCl
0,38 M Glycin
0,1 % SDS
pH 8,8

F: Färbelösung

0,1 % Serva Blau R 250 (entspricht Coomassie Brilliant Blue),
20 % Methanol
7,5 % Essigsäure

alternativ: PAGE blue (MBI Fermentas, St. Leon-Roth)

G: Entfärbelösung

20 % Methanol
7,5 % Essigsäure

H	<u>SDS-Probenpuffer:</u>	
	60 mM	Tris-HCl pH 6,8
	5 %	SDS
	10 %	Glycerin
	10 %	β -Mercaptoethanol

Bei hohem Eigenvolumen der zu lösenden Probe wurde der SDS-Probenpuffer als 2 x Probenpuffer angesetzt.

Molekulargewichtsmarker: *High range* und *Low range* (BioRad)
 Precision Plus Protein Standards-Dual Color (BioRad)

3.20.1. Western-Blot

Proteine können aus dem Gel mit einem Elektrophoret-Verfahren (Kyhse-Andersen, 1984; Towbin et al., 1979) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden. Anschließend können ein immunologischer Nachweis spezifischer Proteine oder Bindungsstudien mittels Overlay-Blot-Assay durchgeführt werden. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine wurden das Trenngel, die Nitrozellulose und 18 Whatman-Filterpapiere in Gelgröße in den jeweiligen Puffern äquilibriert. Im Graphitblotter wurden die Proteine bei einer Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gelfläche in 1,5 Stunden auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Der Blot wurde luftblasenfrei nach folgendem Schema aufgebaut:

obere Platte	- Kathode -
9 Lagen Whatman,	Puffer 3
Acrylamidgel	Puffer 3
Nitrozellulose	Puffer 1
3 Lagen Whatman	Puffer 1
6 Lagen Whatman	Puffer 2
untere Platte	+ Anode +

Tab. 3.10.: Aufbau eines Western-Blots.

Zum Anfärben der Molekularmarkerbanden, zum Überprüfen des Transfers sowie zur Beladungskontrolle wurde die Nitrozellulosemembran in Ponceau S angefärbt und mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Die Nitrozellulosemembran wurde in Folie eingeschlagen und eingescannt. Dann wurden die Markerbanden abgeschnitten und getrocknet. Die Membran mit den aufgetragenen Proben wurde auf der proteinhaltigen Seite mit Bleistift markiert, die äußere untere Ecke abgeschnitten und in TBST entfärbt.

<u>Puffer 1:</u>	25 mM Tris-HCl pH 10,4	
	20 %	Methanol
 <u>Puffer 2:</u>	300 mM	Tris-HCl pH 10,4
	20 %	Methanol
 <u>Puffer 3:</u>	25 mM	Tris-HCl, pH 9,4
	40 mM	DL-Norleucin
	20 %	Methanol

3.20.2. Renaturierung von Proteinen nach denaturierender SDS-Gelelektrophorese

Da die SDS-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt wurde, mussten in manchen Fällen die Proteine renaturiert werden, um von Antikörpern erkannt zu werden. Hierfür wurde entweder das Trenngel nach Gelelektrophorese oder die Nitrozellulose nach Western-Blot für zwei Stunden bei Raumtemperatur in Renaturierungspuffer inkubiert.

<u>Renaturierungspuffer:</u>	10 mM Tris-HCl
	4 mM Harnstoff
	2 mM EDTA
	50 mM NaCl
	0,1 mM DTT (nach pH-Adjustierung dazugeben)
	pH 7,4

3.20.3. Immunblot

Nach dem Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran können einzelne Proteine mit spezifischen Antikörpern dargestellt werden. Zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrozellulosemembran je nach Primärantikörper für eine oder zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit Magermilch oder Bayley's inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur (siehe Tab. 3.11.). Ungebundene Antikörper wurden durch mehrmaliges Waschen entfernt. Danach wurde mit dem sekundären, Meerrettichperoxidase-gekoppelten Antikörper (siehe Tab. 3.11.) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und erneut gründlich gewaschen.

Die Detektion erfolgte mit dem „Enhanced-Chemical-Luminescence Detektionssystem“ (ECL, Amersham Buchler, Braunschweig oder Peqlab, Erlangen) nach Angaben des Herstellers. Das in der Detektionslösung enthaltene Luminol wird unter alkalischen Bedingungen nach Zugabe von Wasserstoffperoxid und chemischen Verstärkern durch die katalytische Aktivität der Meerrettichperoxidase oxidiert und in einen angeregten Zustand versetzt. Bei Übergang des Luminols

in den Grundzustand wird Energie in Form von Photonen frei. Die maximale Emission wird nach fünf bis 20 Minuten erreicht, die Halbwertszeit beträgt 60 Minuten.

Die Detektionslösung wurde auf die Nitrozellulosemembran aufgetragen. Nach einer Minute wurde die Detektionslösung von der Membran entfernt und die Membran in eine lichtdurchlässige Folie eingeschlagen. In der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm auf die Membran aufgelegt. Nach der Belichtung durch emittierte Photonen wurde er entwickelt und fixiert. Die belichtete Stelle erschien als Schwärzung.

Alternativ wurden die Lösungen für die Chemilumineszenz selbst hergestellt ([#81](http://www.laborjournal.de-Labortrick-Tipp)) und wie unten angegeben gemischt. Nach einer Inkubation für zwei Minuten bei Raumtemperatur wurde der Röntgenfilm zur Belichtung aufgelegt.

<u>TBS:</u>	140 mM	NaCl
	10 mM	Tris-HCl pH 7,4

TBST: TBS + 0,05 % Tween 20

Lösungen zur Absättigung der Nitrozellulose:

5 %	Magermilchpulver in TBS, pH 7,4
10 %	Magermilchpulver in TBST, pH 7,4
10 %	Bayley`s in TBST

Chemilumineszenz-Reagenzien:

Enhanced-Chemical-Luminescence Detektionssystem (Amersham, Braunschweig oder Peqlab, Erlangen):

Lösung 1/Lösung 2	1 : 1
-------------------	-------

Chemilumineszenz-Reagenzien aus eigener Herstellung ([#81](http://www.laborjournal.de-Labortrick-Tipp)):

<u>ECL-A:</u>	200 ml	0,1 M Tris-HCl (pH 8,6)
	50 mg	Luminol (Sigma)
Lagerung:	4°C	
<u>ECL-B:</u>	11 mg	para-Hydroxycoumarinsäure (Sigma)
	in 10 ml	DMSO
Lagerung:	dunkel, RT	
<u>ECL-C:</u>	H ₂ O ₂ (30 %)	

Gebrauchsfertige Mischung: 1 ml ECL-A + 0,3 µl ECL-C + 100 µl ECL-B

Antikörper:

Primäre Antikörper	Absättigung	Antikörper- dilution und Inkubationszeit	Sekundärantikörper in 10 % Magermilch in TBST
α-BSA	10 % Magermilch/TBST 2 h RT/ 4°C ÜN	1h RT 1 : 1000 in TBST	α-Maus-POD 1:5000
α-eIF5A #1a, 9, 11	10 % Magermilch/TBST 2 h RT/ 4°C ÜN	1h RT 1 : 1000 in TBST	α-Kaninchen-POD 1:10000
α-eIF5A #2a, 3a, 8	10 % Magermilch/TBST 2 h RT/ 4°C ÜN	1h RT 1 : 5000 in TBST	α-Kaninchen-POD 1:10000
α-ELAV 065	10 % Magermilch/TBST 2 h RT/ 4°C ÜN	1h RT 1 : 500 in TBST	α-Kaninchen-POD 1:10000
α-GST	10 % Magermilch/TBST 2 h RT/ 4°C ÜN	1h RT 1 : 1000 in TBST	α-Kaninchen-POD 1:10000
α-His6	5 % Magermilch in TBS 1 Stunde RT	1h RT 1 : 50 in TBS	α-Maus-POD 1:5000
α-Kernmyosin IC #42 (<i>Xenopus laevis</i>)	5 % Magermilch in TBS 1h RT	1h RT pur	α-Maus-POD 1:5000
α-Kernmyosin IC #54 (<i>Xenopus laevis</i>)	5 % Magermilch in TBS 1 h RT	1h RT pur	α-Maus-POD 1:5000
α-Kernmyosin IC gp30 (<i>Xenopus laevis</i>)	10 % Magermilch/TBST 2 Stunden RT/ 4°C ÜN	1h RT 1 : 25 in TBST	α-Meerschwein-POD 1:10000
α-Kernmyosin IC (<i>Homo sapiens</i>)	10 % Magermilch/TBST 2 h RT/ 4°C ÜN	1h RT 1 : 2000 in TBST	α-Kaninchen-POD 1:10000
α-TFIIIA (<i>Xenopus laevis</i>)	5 % Magermilch in TBS 1 h RT	1h RT pur	α-Maus-POD 1:5000

Tab. 3.11.: Primäre und sekundäre Antikörper für den Immunblot.

Absättigungsbedingungen und Dilution der primären und sekundären Antikörper. Die Inkubation der Nitrozellulosemembran mit den primären und sekundären Antikörpern erfolgte jeweils für eine Stunde bei Raumtemperatur.

3.20.3.1. Entfernung gebundener Antikörper

Eine proteinbeladene Nitrozellulose konnte wiederholt für den Immunblot verwandt werden, wenn bereits gebundene Antikörper von der Nitrozellulose entfernen wurden. Hierfür wurde die Membran für 30 Minuten bei 50°C in Entfernungspuffer unter Bewegung inkubiert. Anschließend wurde sie mehrmals in großen Volumina TBST gewaschen. Nach erneutem Absättigen konnte wieder mit einem Primäantikörper inkubiert werden. In der Regel reichte für die erneute Absättigung eine um die Hälfte reduzierte Zeitspanne aus.

Entfernungspuffer („Stripping Buffer“): 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,7
 100 mM β -Mercaptoethanol
 2 % SDS

3.21. Herstellung von Antikörpern

3.21.1. Herstellung von monoklonalen Antikörpern

Die Herstellung der monoklonalen Antikörper gegen den Aminoterminus des *Xenopus laevis* Kernmyosin IC erfolgte in Kooperation mit H. Zentgraf, DKFZ Heidelberg. Immunisiert wurde mit dem Fusionsprotein XNMtrunc-His (Tab. 2.3.; Abb. 4.3.3.). Es besteht aus den aminoterminalen 240 Aminosäuren des Kernmyosin IC mit einem carboxyterminalen Hexahistidintag, ist ungefähr 25 kDa groß und wurde unter denaturierenden Bedingungen mit der Nickel NTA-Agarose aufgereinigt. Einer vier bis sechs Wochen alten Maus wurden 10 bis 100 μ g Antigen pro Immunisierungsschritt subkutan auf beide Fußrücken injiziert.

Tag 0: Gesamtvolumen 100 μ l, 50 % Adjuvans complete
 Tag 4 und 6/7: Gesamtvolumen 100 μ l; ohne Adjuvans
 Tag 7/8: Entnahme der Kniekehlenlymphknoten nach Genickbruch der Maus

Die Kniekehlenlymphknoten wurden in RPMI ohne Zusätze überführt, von Fettresten befreit, mit einem Spritzenkolben zerrieben und abzentrifugiert. SP2/0-Mausmyelomzellen wurden zwei zu eins mit den Lymphknotenzellen gemischt und zentrifugiert (150 x g für zehn Minuten bei Raumtemperatur). Auf das Pellet wurde innerhalb einer Minute 1,5 ml PEG aufgetropft und die Zellsuspension dabei langsam mit einer Pipettenspitze gerührt. Nach einer weiteren Minute wurden jeweils innerhalb einer Minute 1 ml, 3 ml, 8 ml und nochmals 8 ml RPMI ohne Zusätze zugegeben und dabei die Suspension vorsichtig geschwenkt. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen in Ausplattiermedium in einer Konzentration von 3×10^5 Zellen pro ml resuspendiert und je 200 μ l in eine Vertiefung einer 96-Well-Platte pipettiert. Nach einer Inkubation von vier bis sieben Tagen bei 37°C und fünf Prozent CO₂ wurde der Überstand abgenommen und getestet. Die aus der Fusion von B-Zellen und Myelomzellen entstandenen Hybridomazellen besitzen die Eigenschaft,

Antikörper gegen das immunisierte Protein in das Zellkulturmedium zu produzieren und sind immortal.

SP2/0-Medium: RPMI mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % NEAA („*Non Essential Amino Acids*“), 1 % L-Glutamin, 0,5 % Natriumpyruvat; Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂

Ausplattierungsmedium: RPMI mit 10 % FCS, 1 x HAT und 24 µM Mercaptoethanol

Teilweise wurde zum Zellkulturüberstand Raffinose in einer Konzentration von 20 mg/ml vor dem Einfrieren zugesetzt.

Raffinose-Stammlösung: 200 mg/ml

3.21.1.2. Bestimmung der Antikörper-Subklasse (Ouchterlony-Test)

Die Subklasse der monoklonalen Antikörper wurde nach Ouchterlony und Nilsson (1978) durch doppelte Inmundiffusion bestimmt. Objektträger wurden mit Aceton gereinigt und ein Prozent Agarose in PBS aufpipettiert. Nach dem Erstarren der Agarose wurde eine Rosette mit einem zentralen und sechs äußeren Löchern eingestanz. In das Zentralloch wurde 20 µl des monoklonalen Antikörpers und in die äußeren Löcher 20 µl der subklassenspezifischen Antikörper pipettiert. Das nicht beladene Loch wurde mit PBS gefüllt. Nach 30 Minuten wurde nochmals je 20 µl der Antikörper zugegeben und der Ansatz über Nacht in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 48 Stunden ohne Bewegung mit PBS gewaschen. Dann wurde der Agarosestreifen mit verdünnter Coomassie-Färbelösung (eins zu fünf in PBS) gefärbt und mit Entfärber entfärbt. Anhand der Präzipitationslinie konnte die Antikörper-Subklasse abgelesen werden.

PBS: siehe 3.19.1.

Agaroselösung: 1 % Agarose in PBS

Coomassie-Färbelösung: siehe 3.20.
1 : 5 in PBS

Entfärbelösung: siehe 3.20.

Subklassenspezifische Antikörper:

Kaninchen α-Maus-IgG1, -IgG2a, -IgG2b, -IgG3, -IgM (MB Biomedicals) 1 : 4 in PBS

3.21.2. Herstellung polyklonaler Antikörper

Die Herstellung des polyklonalen Antikörpers erfolgte durch die Firma Seqlab (Göttingen). Gereinigtes Peptid mit der Sequenz CMKYRAAAPAIDGVRVT wurde mehrmals in zwei Meerschweinchen injiziert und das Serum gewonnen.

3.21.2.1. Affinitätsreinigung

Mithilfe der Affinitätsreinigung können spezifische Antikörper aus einem Serum angereichert werden. Ein Peptid oder Polypeptid mit entsprechendem Epitop wird an eine Säulenmatrix gebunden. Anschließend werden nicht besetzte Bindungsstellen abgesättigt, die Säule mit dem antikörperhaltigen Serum inkubiert und die Antikörper aus der Säule eluiert.

3.21.2.1.1. Beladen der CNBr-aktivierten Sepharose

Das zu bindende Protein wurde über Nacht bei 4°C gegen Bindungspuffer dialysiert und anschließend bei 12 000 x g für zehn Minuten abzentrifugiert. Zunächst wurde 100 mg CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Amersham Biosciences) abgewogen, in 10 ml Quellungspuffer aufgenommen und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Sepharose bei 500 x g und 4°C für fünf Minuten pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur für zehn Minuten in 10 ml Bindungspuffer inkubiert. Die Sepharose wurde wie oben beschrieben sedimentiert und mit 5 mg Protein in Bindungspuffer versetzt. Die Bindung des Proteins an die Sepharose geschieht für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C auf dem Rollertisch. Nach der Zentrifugation bei 500 x g und 4°C für fünf Minuten wurde das nicht gebundene Protein abgenommen und die Sepharose mit 10 ml Absättigungspuffer für zwei bis vier Stunden bei Raumtemperatur auf dem Rollertisch inkubiert. Anschließend erfolgten mehrere Waschstschritte, dazwischen wurde die Sepharose jeweils bei 500 x g, 4°C und fünf Minuten sedimentiert. Die beladene Säule kann in PBS bei 4°C für vier bis acht Wochen gelagert und mehrmals für eine Affinitätsreinigung verwandt werden.

PBS: siehe 3.19.1.

Quellungspuffer: 1 mM HCl

Bindungspuffer: 500 mM NaCl
250 mM NaHCO₃
pH 8,8 mit Na₂CO₃

Absättigungspuffer: 200 mM Glycin in Bindungspuffer

<u>Waschpuffer 1:</u>	100 mM	Natriumacetat
	500 mM	NaCl
	pH 4 mit Essigsäure	
<u>Waschpuffer 2:</u>	0,5 %	Triton in PBS
<u>Waschpuffer 3:</u>	0,1 %	Triton in PBS
<u>Waschpuffer 4:</u>	500 mM	NaCl in PBS
<u>Phosphatpuffer:</u>	10 mM	Na ₂ HPO ₄ (basisch)
	10 mM	NaH ₂ PO ₄ (sauer)
	der basische Puffer wird als Grundlage genommen und mit dem sauren Puffer bis zum pH von 7,4 titriert	
<u>Trennpuffer:</u>	3 M	KSCN in Phosphatpuffer

Waschschemata:

Waschschemata:		alternatives Waschschemata:	
Bindungspuffer	10 ml	Bindungspuffer	10 ml
Waschpuffer 1	10 ml	Waschpuffer 1	10 ml
Bindungspuffer	10 ml	Bindungspuffer	10 ml
Waschpuffer 1	10 ml	Waschpuffer 1	10 ml
Bindungspuffer	10 ml	Bindungspuffer	10 ml
Waschpuffer 1	10 ml	Waschpuffer 1	10 ml
		Bindungspuffer	10 ml
		Waschpuffer 1	10 ml
		Bindungspuffer	10 ml
		Waschpuffer 1	10 ml
Waschpuffer 2	10 ml		
Waschpuffer 3	10 ml		
Waschpuffer 4	10 ml		
Trennpuffer	5 ml sofort zentrifugieren		
PBS	10 ml	PBS	10 ml
PBS	10 ml	PBS	10 ml
PBS	10 ml	PBS	10 ml

Tab. 3.12.: Waschschritte bei der Affinitätsreinigung.

<u>Renaturierungspuffer:</u>	20 mM	Mops
	100 mM	Natriumacetat
	5 mM	Magnesiumacetat
	0,25 %	Tween
	10 %	Magermilchpulver
	5 mM	DTT (nach pH-Adjustierung dazugeben)
	pH 7,1	

<u>Bindungspuffer:</u>	20 mM	Mops
	100 mM	Kaliumacetat
	5 mM	Magnesiumacetat
	1 %	Tween
	5 mM	DTT (nach pH-Adjustierung dazugeben)
	pH 7,1	

3.23. Zellkultur

Somatische Monolayerzellen wurden in Zellkulturmedium kultiviert (siehe 2.1.2.). Bei Konfluenz wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gespült und bis zu ihrem Ablösen in 1 ml Trypsin inkubiert. Der Trypsinverdau wurde mit 5 ml Zellkulturmedium geblockt und 300 bis 700 µl der Zellsuspension in eine Petrischale (35 mm Durchmesser) mit frischem Zellkulturmedium ausgesät.

PBS: siehe 3.19.1.

Ablösepuffer: 0,06 % Trypsin 250 (Difco)
0,02 % EDTA
in PBS, sterilfiltrieren

3.24. Trennung von Zellkern und Zytoplasma somatischer adhärenter Zellen

Kulturzellen der Zelllinien HeLa, A6 und XTC wurden in großen Petrischalen bis zur Subkonfluenz kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde abgegossen und die Zellen mit TKM-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden mit einem Gummischaber von Schalenboden abgelöst und mit TKM-Puffer in Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde bei 1000 Umdrehungen für fünf Minuten bei 4°C sedimentiert. Das Sediment wurde in 10 ml eisgekühltem Lysepuffer aufgenommen und zehn bis 40 Minuten zum Schwellen der Zellen auf Eis inkubiert. Das Aufbrechen der Zellen erfolgte mit einem sterilen Glas-Teflon-Homogenisator. Die Effizienz wurde lichtmikroskopisch kontrolliert. Die Suspension wurde dann in einem Zentrifugenröhrchen bei 3000 Umdrehungen pro Minute bei 4°C für zehn Minuten zentrifugiert. Zur Bestimmung der Zellkernzahl wurde ein Aliquot in einer Neubauer-

Zählkammer ausgezählt. Das Zellkernsediment wurde je 10^6 Zellkerne in 20 μ l SDS-Probenpuffer (siehe 3.20.) aufgenommen und aufgeköcht. Der zytoplasmahaltige Überstand wurde in sechsfachem Volumen Aceton gefällt, abzentrifugiert und ebenfalls in Probenpuffer aufgenommen und aufgeköcht.

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

Lysepuffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,2
 0,5 mM PMSF

Formel zur Berechnung der Zellkernzahl nach Zählung mit der Neubauer-Zählkammer:

(Zellzahl 4 große Quadrate : 4) \times 10^4 \times Verdünnungsfaktor \times Volumen in ml = Zellkernzahl

Zur Berechnung der Zellkernzahl wurden 10 μ l der Suspension in eine Neubauer-Zählkammer einpipettiert. Jeweils alle 16 kleinen Quadrate der vier großen Quadrate wurden mäanderförmig ausgezählt. Dabei wurden alle Zellkerne, welche auf der linken und oberen Begrenzungslinie eines kleinen Quadrates lagen, diesem Quadrat zugerechnet.

3.25. Entnahme von *Xenopus laevis*-Ovar

Ein *Xenopus laevis*-Weibchen wurde für 15 bis 20 Minuten in MS 222 (Serva) narkotisiert und auf Eis gelegt. Durch einen ungefähr einen Zentimeter großen Schnitt im Unterbauch wurde ein Teil des Ovars entnommen und in Barth-Medium oder OR2-Medium aufbewahrt. Die Wunde wurde mit zwei Einzelknopfnähten geschlossen und der Frosch bis zu seinem vollständigen Erwachen aus der Narkose mit feuchten Tüchern bedeckt. Danach wurde er noch über Nacht von seinen Artgenossen separiert in einem Aquarium gehalten.

Oozytenaufbewahrungsmedien:

OR2-Medium (Wallace et al., 1973):

82,5 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
1,0 mM	CaCl ₂
1,0 mM	MgCl ₂
5,0 mM	HEPES
pH 7,8	

Modifiziertes Barth-Medium (Gurdon, 1991):

90 mM	NaCl
1 mM	KCl
0,8 mM	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
0,3 mM	Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O
0,4 mM	CaCl ₂ x 2 H ₂ O
2 mM	NaHCO ₃
10 mM	HEPES
Phenolrot als pH - Indikator	
pH 7,6	

Narkoselösung:

MS 222 (Aminobenzoessäure-ethylester-methansulfat) 0,2 % in Leitungswasser

3.25.1. Manuelle Isolation von Oozytenkompartimenten und Fällung der Proteine

Xenopus laevis-Oozyten wurden mit Uhrmacherpinzetten defollikuliert. Gesamtoozyten wurden mit 3:1-Medium in ein Reaktionsgefäß überführt, mit einem Homogenisator zerkleinert und in einer Tischzentrifuge bei 10 000 Umdrehungen pro Minute für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde in Aceton aufgenommen. Kerne, Kernhüllen und Zytoplasma wurde manuell aus den Oozyten gewonnen wie in Krohne und Franke (1983) beschrieben. Für die Fällung von Proteinen aus Zellkern und Zytoplasma wurde Kernisolationsmedium in zwei Uhrglasschälchen so eingefüllt, dass die Flüssigkeitsoberfläche nach oben gewölbt war. Die Oozyte wurde mit Uhrmacherpinzetten aufgerissen und der Kern aus der Oozyte gerollt. Alternativ wurde, wenn möglich, mit der Pinzette ein zentrales Loch in den animalen Pol gestochen, wodurch der Kern aus der Zelle austrat. Mit der Kerntransferpipette wurde der Oozytenkern luftblasenfrei in das zweite Uhrglasschälchen überführt, Zytoplasmareste abgewaschen und direkt in eiskaltes Ethanol überführt. Das Zytoplasma wurde mit der Oozyten-Transferpipette aufgenommen und in einem Reaktionsgefäß mit 10 000 Umdrehungen pro Minute für fünf Minuten zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Fällung des Überstandes in Aceton. Zur Gewinnung von Kernhülle und Karyoplasma wurden zunächst Kerne in Kernisolationsmedium isoliert und mit der Kerntransferpipette in ein Uhrglasschälchen mit Kernhüllenisolationsmedium überführt. Mit einer selbst hergestellten Kernhüllenpipette, deren Lumen etwas kleiner ist als der Kerndurchmesser, wurde der Kern aufgenommen. Dabei löste sich die Kernhülle vom Karyoplasma. Kernhülle und Karyoplasma wurden getrennt in eiskaltem Ethanol gesammelt. Die Fällung der Oozytenproteine erfolgt entweder bei -20°C über Nacht oder bei -70°C für zwei Stunden.

Kernisolationsmedium (3:1-Medium):
75 mM KCl
25 mM NaCl
10 mM Tris-HCl, pH 7,4

Kernhüllenisolationsmedium (3:1-Medium + MgCl₂):
75 mM KCl
25 mM NaCl
10 mM MgCl₂
10 mM Tris-HCl, pH 7,4

Für die Fällung der Proteine aus Zellkern, Kernhülle, Karyoplasma:

100 % Ethanol zur Analyse, eiskalt

Fällung Proteine aus Gesamtoozyten oder Zytoplasma:

100 % Aceton zur Analyse, eiskalt, sechs- bis achtfaches Probenvolumen

3.26. Isolation von Proteinen mit peqGOLD TriFast (PEQLAB, Erlangen)

Mit dem TriFast-Reagenz kann aus derselben Probe sowohl RNA als auch DNA und Proteine isoliert werden. Die Proteinextraktion erfolgt nach Abnahme der RNA-haltigen wässrigen Phase (siehe 3.8.1.1.) und DNA-Präzipitation.

Wie in 3.8.1.1. beschrieben, wurde die wässrige RNA-haltige Phase komplett abgenommen. Übrig blieb die Phenol- und Interphase, welche die DNA und die Proteine enthielt und bei 4°C über Nacht gelagert werden konnte. Pro Milliliter TriFast wurde die DNA mit 0,3 ml absolutem Ethanol präzipitiert. Nach mehrmaligem Invertieren wurde die Probe für drei Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Dann wurde die DNA bei 2 000 x g und 4°C für fünf Minuten sedimentiert. Im Sediment befand sich die DNA, der Phenol/Ethanol-Überstand enthielt die Proteine und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 1,5 ml Isopropanol und Inkubation für zehn Minuten bei Raumtemperatur wurden die Proteine präzipitiert. Anschließend wurde für zehn Minuten bei 12 000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Proteinpellet dreimal mit 2 ml 0,3 M Guanidinhydrochlorid in 95-prozentigem Ethanol gewaschen. Nach jeweils 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde bei 7 500 x g und 4°C für fünf Minuten zentrifugiert. Danach wurde das Proteinsediment in 2 ml absolutem Ethanol gevortext, 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und erneut bei 7 500 x g und 4°C für fünf Minuten zentrifugiert. In Guanidinhydrochlorid oder in Ethanol können die Proben kurzfristig bei 4°C oder längere Zeit bei -20°C gelagert werden. Der Ethanol wurde vollständig entfernt, das Proteinpellet getrocknet, in SDS-Probenpuffer (siehe 3.20.) aufgenommen und bei 95°C aufgeköcht.

peqGOLD TriFast (PEQLAB, Erlangen): gebrauchsfertig

Guanidinhydrochlorid: 0,3 M in 95 % Ethanol

SDS-Probenpuffer: siehe 3.20.

3.27. Behandlung von Zellen mit Actinomycin D (AMD)

Actinomycin D führt zur Hemmung der Transkription durch Bindung an die doppelsträngige DNA, zur Segregation der Nukleolen und zur Retraktion der lateralen transkriptionsaktiven Schleifen bei Lampenbürstenchromosomen in Amphibienoozyten. Es wurde somatischen XTC-Zellen in einer Konzentration von 0,05 µg/ml für zwei bis drei Stunden zugesetzt. Oozyten wurden in 10 bis 20 µg/ml für mindestens zwei Stunden inkubiert.

Actinomycin D (Sigma) Stammlösung: 100 µg/ml

3.28. Behandlung von Zellen mit Leptomycin B

Mit Leptomycin B kann der CRM1-vermittelte Export gehemmt werden. Leptomycin B (LMB) ist eine Substanz mit antifungalen und antibiotischen Eigenschaften, die darüber hinaus auch in der Tumortherapie eingesetzt wird. Es bindet kovalent durch sein α,β -ungesättigtes δ -Lakton an die Sulfhydrylgruppe von Cystein an Position 528 des CRM1 (Kudo et al., 1997; Kudo et al., 1999). Folglich kann Ran-GTP und Exportsubstrat nicht mehr an CRM1/Exportin1 binden, weshalb der Export unterbunden wird. Somatische Zellen wurden mit Leptomycin B in einer Konzentration von 20 nM im Zellkulturmedium für zwei Stunden inkubiert. Oozyten wurden in 200 nM Leptomycin B für zwei Stunden eingelegt. Wurden die Zellen mikroinjiziert, so wurden sie bis zur Fixierung bzw. im Falle der Oozyten bis zur Trennung von Kern und Zytoplasma in Leptomycin B gelagert.

Leptomycin B Stammlösung: 10 µM in PBS

3.29. Mikroinjektion in *Xenopus laevis*-Oozyten

Xenopus laevis-Oozyten lassen sich leicht gewinnen und aufgrund ihrer Größe gut manipulieren und mikroinjizieren. Injiziert wurden zum Beispiel RNA oder Proteine, deren Exportverhalten getestet werden sollten, oder inhibierende Antikörper. Oozyten lassen sich nach der Injektion manuell in die Zellkern- und Zytoplasmafraktion trennen.

Defollikulierte Oozyten wurden entweder vor der Injektion in den Zellkern zentrifugiert und somit anhand des Zellkernabdrucks an der Oozytenmembran die Lage des Zellkerns sichtbar gemacht. Für die Zentrifugation wurden Oozyten auf einem grobmaschigen Netz in Petrischalen platziert. Die Zentrifugation erfolgte auf Trägerplatten bei 1200 Umdrehungen pro Minute, 16°C und geringer Beschleunigung und Bremse (Stufe 2) für acht bis 25 Minuten. Alternativ wurden die Oozyten tief in den animalen Pol injiziert, wobei der Injektionslösung zur optischen Kontrolle der Farbstoff

Dextranblau (Fischer et al., 1999) beigemischt wurde. Zur immunologischen Kontrolle der Injektionsgenauigkeit wurde den Injektionslösungen BSA in einer Konzentration von 1 mg/ml zugesetzt.

Mikroinjektionsnadeln wurden aus Glaskapillaren zur Schmelzpunktbestimmung mit einer Mikroschmelze selbst hergestellt. Durch Anbringen von Eichstrichen im Millimeterabstand entstand eine Skalierung in 50 Nanoliter-Schritten. Mithilfe des Mikromanipulators wurde in den Oozytenkern ein Volumen von 25 Nanoliter (ein halber Teilstrich), in das Zytoplasma ein Volumen von 50 Nanoliter (ein Teilstrich) injiziert. Proteine wurden in PBS, RNA in RNase-freiem Wasser (GIBCO) diluiert. Nach einer gewissen Inkubationszeit wurden die Oozyten in 3:1-Medium manuell in Zellkern und Zytoplasma getrennt oder eine Spreitung (3.33.) durchgeführt. Für die RNA-Isolation wurden Zellkerne oder Zytoplasma direkt in TriFast oder Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol überführt (siehe 3.8.). Die Zellkernproteine wurden in Ethanol, die Zytoplasmaproteine in Aceton gefällt (siehe 3.25.1.).

PBS: siehe 3.19.1.

Dextranblau (Serva) : 10 mg/ml

BSA: 1 mg/ml

Bromuridin: 100 mM

Injizierte Fusionsproteine:

GST-TFIIIA-NES 1 mg/ml

GST-REV-NES 1 mg/ml

TFIIIA-His 0,5 mg/ml

Injizierte Antikörper:

α -eIF5A

α -ELAV 65

α -XNM IC #42 0,07 mg/ml

α -XNM IC #54 0,07 mg/ml

IgG, IgM 0,07 mg/ml

Injizierte RNA:

CD83 volle Länge-Dig

CD83 volle Länge mit gewobelter SLII-Region-Dig

CD83 mit deletierter SLII-Region-Dig

CD83 SLII-³²P

CD83 SLII-gewobbelt-³²P

3.30. Mikroinjektion in somatische Zellen

Somatische Zellen wurden über Nacht auf autoklavierten und Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen (siehe 3.31.1.1.1.) oder Fragmenten von Mehrwellobjektträgern kultiviert, welche in der Mitte mit einem Diamantenstift kreisrund eingeritzt waren. Die Injektionsobjekte wurden in Petrischalen (60 mm Durchmesser) überführt. Eine Mikroinjektionskanüle (Femtotips, Eppendorf, Hamburg) wurde mit 1,5 µl Injektionslösung beladen und in die Halterung eingeschraubt. Nach Öffnen der Stickstoffflasche wurden die entsprechenden Injektionsdruckwerte mit den Regulationsknöpfen eingestellt. Um ein Verstopfen der Kanüle zu vermeiden wurde ein permanenter Druck (P3) an die Kanüle angelegt. Nach Einstechen der Mikroinjektionskanüle in den Zellkern einer somatischen Zelle wurde mit einem Fußpedal ein Injektionsdruck (P2) aufgebaut. Kam es zum Verstopfen der Kanüle, konnte sie mithilfe eines erhöhten Druckes (P1) und durch Säubern der Nadelspitze am Deckgläschenrand wieder durchgängig gemacht werden. Alternativ wurde der Druck P3 auf einen permanenten Injektionsdruck eingestellt. Die Zellen wurden bis zur Weiterverarbeitung im Brutschrank kultiviert.

Injektionsdrücke:

Druckventil		alternativ
P1	3000-3500 hPa	3500 hPa
P2	70-500 hPa (Injektionsdruck)	500 hPa
P3	40-120 hPa	70-130 hPa (Injektionsdruck)

Tab. 3.13.: Injektionsdrücke für die Mikroinjektion in somatische Zellen.

Injizierte Fusionsproteine:

XPP32-His mit deletiertem Kernlokalisationsignal

XAPRIL-His mit deletiertem Kernlokalisationsignal

Injizierte Antikörper:

α-XNM IC #54 0,1 mg/ml

IgM 0,1 mg/ml

3.31. Immunfluoreszenz

3.31.1. Immunlokalisierung von Proteinen

Das Verteilungsmuster von Proteinen in Zellen, einzelnen Zellkompartimenten oder auf Gefrierschnitten kann mithilfe spezifischer Antikörper dargestellt werden. Hierzu wird die indirekte Immunfluoreszenz angewandt. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen erkennt der spezifische primäre Antikörper sein Epitop an dem zu untersuchenden Protein. Der sekundäre Antikörper ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt und bindet an die konstante Region des Primäantikörpers. Bei Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge entsteht eine charakteristische Fluoreszenz. Das Fluoreszenzverteilungsmuster entspricht der Lokalisation des zu untersuchenden Proteins.

3.31.1.1. Immunfluoreszenz in somatischen Zellen

Somatische Zellen wurden für die Immunfluoreszenz auf sterilen, mit Poly-L-Lysin vorbehandelten Glasdeckgläschen (12 mm Durchmesser) angezüchtet. Je nach Antikörper wurden die somatischen Zellen mit Methanol/Aceton zur Analyse oder mit Paraformaldehyd/Triton behandelt.

3.31.1.1.1. Beschichtung der Deckgläschen mit Poly-L-Lysin

Durch die Beschichtung von Deckgläschen mit Poly-L-Lysin erhalten die Zellen eine bessere Haftung auf der Glasoberfläche. Die Deckgläschen wurden in 70-prozentigem Ethanol sterilisiert und getrocknet. Anschließend wurden die Deckgläschen für fünf Minuten mit Poly-L-Lysin (Sigma) beschichtet und zweimal mit PBS gewaschen, weil Poly-L-Lysin im Zellkulturmedium proliferationshemmend wirken kann.

PBS: siehe 3.19.1.

Poly-L-Lysin:	Stammlösung:	1 mg/ml in sterilem PBS
	gebrauchsfertige Lösung:	0,1 mg/ml in sterilem PBS

3.31.1.1.2. Fixierung mit Methanol/Aceton

Die zellbewachsenen Deckgläschen wurden kurz in PBS gewaschen und die Zellen für zehn Minuten in Methanol (-20°C) und vier Minuten in Aceton zur Analyse (-20°C) permeabilisiert und fixiert. Anschließend wurden die Deckgläschen luftgetrocknet. Alternativ wurden die Zellen in Methanol/Aceton zur Analyse (Verhältnis eins zu eins) für zehn bis 30 Minuten bei -20°C permeabilisiert und fixiert.

PBS: siehe 3.19.1.

3.31.1.1.3. Fixierung mit Paraformaldehyd

Zwei Prozent Paraformaldehyd wurde unter Erwärmung auf 60°C in PBS gelöst und auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach dem Waschen der zellbewachsenen Deckgläschen mit PBS erfolgte die Fixierung mit Paraformaldehyd für zehn Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen kurz in PBS gewaschen und mit 0,1 Prozent Triton in PBS für fünf Minuten permeabilisiert. Alternativ erfolgte die rasche Fixierung in vier Prozent Paraformaldehyd und die Permeabilisierung mit 0,05 Prozent Triton für zehn Minuten oder 0,2 Prozent Triton für drei Minuten. Nach dem Waschen der Deckgläschen in PBS wurde entweder direkt die Antikörperinkubation angeschlossen oder noch mit 100 mM Glycin in PBS für zehn Minuten inkubiert und mit ein Prozent BSA in PBS für 20 Minuten abgesättigt.

Fixierungspuffer: 2 % Paraformaldehyd in PBS
 4 % Paraformaldehyd in PBS

Permeabilisierungspuffer: 0,05 % Triton in PBS
 0,1 % Triton in PBS
 0,2 % Triton in PBS

Glycinpuffer: 100 mM Glycin in PBS

Absättigungspuffer: 1 % BSA in PBS

3.31.1.1.4. Antikörperinkubation

Nach der Fixierung der Zellen mit Methanol/Aceton oder Paraformaldehyd schloss sich die Antikörperinkubation an. Die Deckgläschen wurden in eine feuchte Kammer überführt und mit 30 µl in PBS diluierendem Primärantikörper inkubiert. Die Konzentration wurde experimentell ermittelt und betrug in der Regel das Zehnfache der Konzentration für den Immunblot. Die Inkubationszeit betrug in der Regel 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach zweimaligem Waschen in PBS für fünf Minuten zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper wurde der Sekundärantikörper in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration aufgebracht. Der Sekundärantikörper war mit Fluoreszenzfarbstoffen Texas Red, FITC oder Cy2 gekoppelt. Nach zehnmütiger Inkubationszeit wurde ein Tropfen Hoechst 33258 (Hoechst, Frankfurt) zur Färbung der DNA zupipettiert und weitere zehn Minuten inkubiert. Anschließend wurde dreimal für fünf Minuten in PBS gewaschen. Nach einer einminütigen Dehydrierung in Ethanol wurden die Zellen luftgetrocknet und mit Mowiol auf einen Objektträger aufgebracht. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss)(siehe 3.35.) oder am konfokalen Laserscan Mikroskop (Leica)(siehe 3.36.).

Hoechst 33258 (Hoechst): Stammlösung: 5 mg/ml
gebrauchsfertige Lösung: 13,3 µg/ml in PBS

PBS: siehe 3.19.1.

Primärantikörper:

Antikörper	Fixierung	Verdünnung und Inkubationszeit	Sekundärantikörper
α-B23 (NO185, Ascites)	PFA/Triton	1 : 100; 30 min	α-Maus
α-CRM1 Peptid Japan	PFA/Triton	1 : 20; 30 min	α-Kaninchen
α-Fibrillarin: 72 B9	PFA/Triton	1 : 25; 30 min	α-Mensch
α-Fibrillarin: S 4	PFA/Triton	1 : 500; 30 min	α-Mensch
α-His6	PFA/Triton	1:5; 30 min	α-Maus
α-Kernmyosin IC #42 (<i>Xenopus laevis</i>)	PFA/Triton	pur; 30 min	α-Maus
α-Kernmyosin IC #54 (<i>Xenopus laevis</i>)	PFA/Triton	pur; 30 min	α-Maus
α-Kernmyosin IC gp30 (<i>Xenopus laevis</i>)	PFA/Triton Methanol/Aceton	1 : 30 (aufkonzentrierter AK); 30 min	α-Meerschwein
α-Kernmyosin IC (<i>Homo sapiens</i>)	PFA/Triton	1 : 200; 30 min	α-Kaninchen
α-Nukleoporin mAB 414	PFA/Triton	1 : 100; 30 min	α-Maus
α-Nukleoporin 62 gp62	PFA/Triton	1 : 1000; 30 min	α-Meerschwein
α-Polymerase I: 57/299	PFA/Triton	1 : 500; 30 min	α-Mensch
α-Polymerase I: S 18	PFA/Triton	1 : 500; 30 min	α-Mensch
α-Polymerase II: H 14	PFA/Triton	1 : 100; 90 min	α-Maus

Tab. 3.14.: Primärantikörper für die Immunfluoreszenz in somatischen Zellen.

Sekundärantikörper:

Antikörper gegen	gekoppelt mit	Verdünnung
Maus	Texas Red	1:100
	Cy2	1:50
	FITC	1:50
Kaninchen	Texas Red	1:100
Meerschwein	Texas Red	1:50
Mensch	Texas Red	1:100

Tab. 3.15.: Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz in somatischen Zellen.

<u>Mowiolpuffer:</u>	140 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	10 mM	Na ₂ HPO ₄
	pH 8,0 mit KH ₂ PO ₄	
<u>Mowiol-Einbettmedium:</u>	5 g	Mowiol 4088 (Sigma)
	+ 40 ml	Mowiolpuffer
	16 Stunden bei RT rühren	
	+ 20 ml	Glycerin wasserfrei
	16 Stunden bei RT rühren, 15 min. 12 000 U/min	
	Überstand portionsweise bei -20°C lagern	

3.31.1.1.5. Immunkolokalisation von Proteinen in somatischen Zellen

Die Kolokalisation von Proteinen in somatischen Zellen wurde mithilfe der Doppelimmunfluoreszenz geprüft. Dies war aber nur möglich, wenn die beiden verwendeten Primärantikörper aus verschiedenen Tieren generiert wurden und die beiden benutzten Sekundärantikörper nicht mit demselben Fluorochrom markiert waren. Zunächst wurden die Zellen wie in 3.31.1.1.2. und 3.31.1.1.3. beschrieben fixiert. Die Antikörperinkubation erfolgte wie in 3.31.1.1.4. beschrieben. Zuerst wurde der Primärantikörper gegen das eine zu lokalisierende Protein appliziert, anschließend der passende Sekundärantikörper. Dann wurde mit dem Primärantikörper gegen das zweite zu testende Protein inkubiert und ein Sekundärantikörper mit einem anderen Fluorochrom gewählt. Zwischen den einzelnen Antikörperinkubationen erfolgten je zwei fünfminütige Waschschrte mit PBS zur Entfernung ungebundener und unspezifisch gebundener Antikörper.

3.31.1.2. Anfertigung von Ovar-Gefrierschnitten

Für die Immunfluoreszenz konnten von *Xenopus laevis*-Ovar Gefrierschnitte hergestellt werden. Vor der Gefriermikrotomie wurde das Ovar entweder in Methylbutan oder nach Sucrosebehandlung in Einbettmedium schockgefroren. Zum Einfrieren von Ovar in Methylbutan wurden von *Xenopus laevis*-Ovar kleine, etwa 0,5 mal 0,5 Zentimeter große Stücke abgeteilt, kurz auf Whatman-Papier abgerollt und auf Parafilm in Methylbutan schockgefroren. Anschließend wurden die Ovarstücke bei -70°C in Methylbutan bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

Alternativ wurden kleine Stücke (0,4 x 0,4 cm) von *Xenopus*-Ovar in 30 Prozent Sucrose in PBS eingelegt und drei Stunden bzw. über Nacht auf einem Rollertisch bei 4°C inkubiert, bis die Ovarstücke abgesunken sind. Anschließend wurde die Sucrose zehn Minuten lang in Waschlösung bei 4°C ausgewaschen. Nach kurzer Inkubation in purem Einbettmedium wurden die Ovarstücke mit Einbettmedium in Gelatine kapseln oder Alufoliehüllen überführt und in Flüssigstickstoff schockgefroren. Die Lagerung bis zum weiteren Gebrauch erfolgte bei -70°C.

<u>PBS:</u>	siehe 3.19.1.
<u>Sucroslösung:</u>	30 % in PBS
<u>Waschlösung:</u>	Einbettmedium/PBS 1 : 1
<u>Einbettmedium für Gefrierschnitte (Leica):</u>	gebrauchsfertig

Für Immunfluoreszenzen wurden Gefrierschnitte mit einem Kryostat-Mikrotom bei -25°C hergestellt. Die eingefrorenen Ovarstückchen wurden mit einem Tropfen Einbettmedium (Leica Instruments) auf dem Objektisch befestigt. Die 7 µm dicken Schnitte wurden durch Aufdrücken mit einem acetongereinigten Objektträger aufgenommen und luftgetrocknet. Die Qualität der Schnitte wurde im Umkehrmikroskop überprüft.

3.31.1.3. Immunfluoreszenz auf Ovar-Gefrierschnitten

Die Gefrierschnitte (siehe 3.31.1.2.) wurden nach dem Lufttrocknen zehn Minuten in Aceton bei -20°C fixiert und bei Raumtemperatur nochmals bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primär- und Sekundärantikörper wie bei der Immunfluoreszenz in somatischen Zellen.

Alternativ wurden die Schnitte nach dem Lufttrocknen zehn Minuten mit vier Prozent Paraformaldehyd in PBS fixiert und anschließend zehn Minuten mit 100 mM Glycin in PBS inkubiert. Danach erfolgte eine Absättigung mit ein Prozent BSA in PBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Die Präparate wurden in diesem Fall nicht luftgetrocknet, sondern nach Waschen in PBS für die Inkubation mit dem Primär- und Sekundärantikörper weiterverwendet.

Primärantikörper:

Antikörper	Fixierung	Verdünnung und Inkubationszeit	Sekundärantikörper
α-CRM1 Peptid Japan	Aceton	1 :20; 30 min	α-Kaninchen
α-eIF5A #2a,3a,8,22	Aceton	1 : 500; 30 min	α-Kaninchen
α-eIF5A #9,10,11,23,24	Aceton	1 : 100; 30 min	α-Kaninchen
α-Kernmyosin IC #42 (<i>Xenopus laevis</i>)	PFA	pur; 30 min	α-Maus
α-Kernmyosin IC #54 (<i>Xenopus laevis</i>)	Aceton	pur; 30 min	α-Maus
α-Kernmyosin IC gp30 (<i>Xenopus laevis</i>)	Aceton	1 : 30; 30 min	α-Meerschwein
α-Nukleoporin 62 gp62	Aceton	1 : 1000; 30 min	α-Meerschwein
α-TFIIIA #17	Aceton	1 : 1; 30 min	α-Maus
α-TFIIIA #37	Aceton	pur; 30 min	α-Maus

Tab. 3.16.: Primärantikörper für die Immunfluoreszenz auf Oozyten-Gefrierschnitten.

Sekundärantikörper:

Antikörper gegen	gekoppelt mit	Verdünnung
Maus	Texas Red	1:100
	Cy2	1:50
Kaninchen	Texas Red	1:100
Meerschwein	Texas Red	1:50

Tab. 3.17.: Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz auf Oozyten-Gefrierschnitten.

Hoechst 33258 (Hoechst): Stammlösung: 5 mg/ml
gebrauchsfertige Lösung: 13,3 µg/ml in PBS

Mowiol: siehe 3.31.1.1.4.

3.32. Bromuridintriphosphat-Einbau

Mithilfe des Bromuridintriphosphat (BrUTP)-Einbaus kann die Transkription sichtbar gemacht werden. Durch Doppelimmunfluoreszenzen (siehe 3.31.1.1.5.) oder durch Mikroinjektionsexperimente mit inhibierenden Antikörpern können Hinweise auf eine Beteiligung von spezifischen Proteinen bei der Transkription gewonnen werden.

3.32.1. Bromuridintriphosphat-Einbau in somatische Zellen

Der Bromuridintriphosphat (BrUTP)-Einbau in somatische Zellen wurde wie in Hock et al. (1998) beschrieben durchgeführt. A6-Kulturzellen wurden auf Poly-L-Lysin vorbehandelten Mehrwellobjektträgern (Marienfeld) kultiviert. Nach der Mikroinjektion von Antikörpern (Kernmyosinantikörper #54) oder Kontrollantikörpern (Isotypkontrolle IgM) wurde 40 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Objektträger wurden kurz in PBS gewaschen und mit 0,1 Prozent Triton in PBS für eine Minute permeabilisiert. Nach kurzem Waschen in PBS erfolgte die Äquilibrierung für zwei Minuten mit Transkriptionspuffer. Dieser wurde nun mit Zellstoff abgesaugt, der Transkriptionsansatz aufpipettiert und für zehn Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert.

Erfolgte die Transkription unter Zugabe von 25 µg/ml α -Amanitin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen), so wurde die Polymerase II und III gehemmt, nur die Transkription durch die Polymerase I wurde dargestellt.

Nach kurzem Waschen in PBS erfolgte die Fixierung mit zwei Prozent Paraformaldehyd in PBS. Anschließend wurde dreimal für fünf Minuten in PBS gewaschen und für fünf Minuten mit 0,1 Prozent Triton in PBS permeabilisiert. Als primärer Antikörper wurde ein Antikörper gegen BrdUTP, welcher auch BrUTP erkennt, eingesetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde dreimal für fünf Minuten in PBS gewaschen und mit dem

Sekundärantikörper in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach 20 Minuten wurde ein Tropfen Hoechst zupipettiert und weitere zehn Minuten inkubiert. Es folgten drei fünfminütige Waschschrte mit PBS und eine einminütige Dehydrierung in 100-prozentigem Ethanol. Nach Lufttrocken wurde auf die Mehrwellobjektträger ein Deckgläschen mit Mowiol aufgebracht. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (siehe 3.35).

<u>Transkriptionspuffer:</u>	100 mM	KCl
	5 mM	MgCl ₂
	0,5 mM	EGTA, pH 8,0
	1 mM	PMSF
	25 %	Glycerol
	50 mM	Tris-HCl pH 7,4
	5 U/ml	RNAsin

BrUTP-Transkriptionsansatz:

Der Transkriptionsansatz wurde als fünffach-Ansatz vorbereitet und mit Transkriptionspuffer auf eine einfache Arbeitskonzentration verdünnt.

0,4 mM	BrUTP (Roche), Stammlösung 100 mM in dH ₂ O
0,5 mM	CTP, GTP, ATP (MBI Fermentas), Stammlösung 100 mM
25 µg/ml	α-Amanitin, Stammlösung 1 mg/ml in PBS
5 U/ml	RNAsin (MBI), Stammlösung 40 U/µl

Antikörper:

Primär-antikörper	Fixierung	Verdünnung und Inkubationszeit	Sekundär-antikörper	Verdünnung und Inkubationszeit
α-BrdUTP	PFA/Triton	1 : 10; 60 min	α-Maus Cy3	1 : 100; 30 min
α-BrdUTP	PFA/Triton	1 : 50; 60 min	α-Schaf Texas Red	1 : 50; 30 min

Tab. 3.18.: Antikörper für den Nachweis von BrUTP in somatischen Zellen.

<u>Hoechst 33258 (Hoechst):</u>	Stammlösung:	5 mg/ml
	gebrauchsfertige Lösung:	13,3 µg/ml in PBS

Mowiol: siehe 3.31.1.1.4.

3.32.2. Bromuridintriphosphat-Einbau in Oozyten

Für den Bromuridintriphosphat (BrUTP)-Einbau in Oozyten wurden Zellen der Stadien IV und V defollikuliert. Aliquots wurden mit Actinomycin D in einer Konzentration von 10 bis 20 µg/ml für mindestens zwei Stunden inkubiert oder mit Kernmyosinantikörper #42 oder #54 oder Isotypkontrollantikörper IgM in einer Konzentration von je 0,07 mg/ml mikroinjiziert. Nach einer Inkubation von mindestens zwei Stunden wurden 50 nl BrUTP in das Zytoplasma injiziert. Nach fünf bis 20 Minuten wurde die Spreitung durchgeführt (siehe 3.33.). Nach Zentrifugation und Fixieren der Präparate wurde das eingebaute Bromuridin mit einem Antikörper nachgewiesen.

Hoechst 33258 (Hoechst): Stammlösung: 5 mg/ml
gebrauchsfertige Lösung: 13,3 µg/ml in PBS

Mowiol: siehe 3.31.1.1.4.

Antikörper:

Primär-antikörper	Fixierung	Verdünnung und Inkubationszeit	Sekundär-antikörper	Verdünnung und Inkubationszeit
α-BrdUTP	PFA/Triton	1 : 50; 60 min	α-Schaf Texas Red	1 : 50; 30 min

Tab. 3.19.: Antikörper für den Nachweis von BrUTP in Oozyten.

3.33. Präparation von Lampenbürstenchromosomen

Die Präparation von Lampenbürstenchromosomen erfolgte nach Gall (1991) mit Modifikationen. Für die Herstellung der Chromosomenkammern wurden Glasdeckgläschen (Durchmesser 18 Millimeter) mit heißem Paraffin unter Plexiglasplättchen (25 x 35 Millimeter, mit einem 7 mm großen zentralen Loch) befestigt. Das Ovar eines weiblichen *Xenopus laevis* wurde wie unter 3.25. beschrieben entnommen und in Barth-Medium oder OR2-Medium (siehe 3.25.) bei 18 bis 22°C über Nacht gelagert.

In einigen Fällen wurden Oozyten vor der Präparation mit Antikörpern oder Bromuridin mikroinjiziert (siehe 3.29.). Die Kernisolation erfolgte bei manuell defollikulierten Oozyten des Stadiums IV und V in Isolationsmedium. Mit der Kerntransferpipette wurde der Kern von Zytoplasmaresten gesäubert und sofort in ein Uhrglasschälchen mit Spreitungsmedium überführt, kurz gespült und mit reichlich Spreitungsmedium in eine vorgekühlte Chromosomenkammer einpipettiert. Mit zwei Uhrmacherpinzetten wurde die Kernhülle aufgerissen und der Kerninhalt ausgeschüttet. Die Spreitung erfolgte für 30 Minuten auf Eis. Die Chromosomenkammer wurde mit einem Deckgläschen und *Rubber Cement* (Fixogum) verschlossen. Nach Qualitätskontrolle am Umkehrmikroskop (16er

Objektiv) erfolgte die Zentrifugation auf Trägerplatten. Zentrifugiert wurde für 20 Minuten bei 10°C mit 2500 Umdrehungen pro Minute, Beschleunigung und Bremse auf Stufe 4. Danach wurde das Fixogum abgezogen und das Deckgläschen seitlich von der Chromosomenkammer geschoben.

Zur Fixierung wurde die Chromosomenkammer für eine Stunde senkrecht in Fixierungspuffer gestellt. Anschließend wurden die Deckgläschen mit den Präparationen mit einer Rasierklinge entfernt. Nach kurzem Waschen in PBS erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer. Die Deckgläschen wurden zweimal fünf Minuten mit PBS gewaschen und mit dem Sekundärantikörper für 20 Minuten inkubiert. Nach Zupipettieren eines Tropfens DNA-Farbstoff Hoechst wurde für weitere zehn Minuten inkubiert. Nun erfolgten drei Waschschrte mit PBS für je fünf Minuten. Alternativ wurde anstatt Hoechst der DNA-Farbstoff DAPI verwandt. Dieser wurde beim letzten Waschschrte zugesetzt. Die Einbettung der feuchten Präparate erfolgte in Mowiol oder in 50 Prozent Glycerin in PBS.

<u>Isolationsmedium (5:1-Medium + PO₄):</u>	83 mM	KCl
	17 mM	NaCl
	6,5 mM	Na ₂ HPO ₄
	3,5 mM	KH ₂ PO ₄
	pH 7,0	
<u>Spreitungsmedium (1/4 5:1-Medium + PO₄):</u>	21 mM	KCl
	4 mM	NaCl
	1,6 mM	Na ₂ HPO ₄
	0,9 mM	KH ₂ PO ₄
	0,1 %	Formaldehyd
	pH 7,0	
<u>Fixierungspuffer:</u>	2 % Paraformaldehyd in PBS	
<u>PBS:</u>	siehe 3.19.1.	
<u>Hoechst 33258 (Hoechst):</u>		
Stammlösung:	5 mg/ml	
gebrauchsfertige Lösung:	13,3 µg/ml	in PBS

Primärantikörper:

Antikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper
α -BrdUTP	1 : 50	α -Schaf
α -Emerin	pur	α -Maus
α -Kernmyosin IC #54 (<i>Xenopus laevis</i>)	pur	α -Maus
α -Polymerase II: H 14	1 : 100	α -Mensch

Tab. 3.20.: Primärantikörper für die Immunfluoreszenz auf Lampenbürstenchromosomen.

Sekundärantikörper:

Antikörper gegen	gekoppelt mit	Verdünnung
Maus	Texas Red	1:100
	Cy2	1:50
Mensch	Texas Red	1:100
Schaf	Texas Red	1:50

Tab. 3.21.: Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz auf Lampenbürstenchromosomen.

3.34. Immunfluoreszenz in amplifizierten Nukleolen aus *Xenopus*-Oozyten

Die Isolation, Fixierung und Immunfluoreszenz erfolgte im Wesentlichen wie in Mais und Scheer (2000) beschrieben (siehe auch 3.33.). Für die Isolation wurde aus frischem Ovar Oozyten der Stadien IV und V defollikuliert. In einigen Fällen fand eine Vorbehandlung der Oozyten mit Actinomycin D (siehe 3.27.) und/oder eine Mikroinjektion mit Antikörpern und Bromuridin (siehe 3.29.) statt. Manchmal wurde zur Stabilisierung der Nukleolen und Cajal-Körperchen dem Spreitungsmedium 0,5 mM MgCl₂ zugesetzt. In diesem Fall wurde ein Fixierungspuffer mit 1 mM MgCl₂ angesetzt.

Primärantikörper:

Antikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper
α -B23 (NO185, Ascites)	1 : 100	α -Maus
α -Fibrillarin: 72 B9	1 : 25	α -Mensch
α -Fibrillarin: S 4	1 : 500	α -Mensch
α -Kernmyosin IC #42 (<i>Xenopus laevis</i>)	pur	α -Maus
α -Kernmyosin IC #54 (<i>Xenopus laevis</i>)	pur	α -Maus
α -Polymerase I: 57/299	1 : 500	α -Mensch
α -Polymerase I: S 18	1 : 500	α -Mensch

Tab. 3.22.: Primärantikörper für die Immunfluoreszenz in amplifizierten Nukleolen.

Sekundärantikörper:

Antikörper gegen	gekoppelt mit	Verdünnung
Maus	Texas Red	1:100
	Cy2	1:50
	FITC	1:50
Mensch	Texas Red	1:100

Tab. 3.23.: Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz in amplifizierten Nukleolen.

3.35. Fluoreszenzmikroskopie

Fluorochrommarkierte Antikörper können mit der Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden. Fluorochrome absorbieren Licht eines für sie charakteristischen Wellenlängen-bereichs (Anregungsspektrum). Mit der Lichtenergie werden Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben. Beim Rücksprung in das Grundniveau emittiert das Elektron ein Photon. Das abgestrahlte Licht (Emissionsspektrum) ist langwelliger als das Anregungslicht.

Zellen, Gefrierschnitte, Lampenbürstenchromosomen und amplifizierte Nukleolen wurden wie in 3.16., 3.31., 3.32., 3.33. und 3.34. beschrieben vorbereitet und das Färbemuster mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiophot Stereo (Zeiss) analysiert. Zur Dokumentation wurden mit einer digitalen Kameraeinheit Aufnahmen gemacht und in Adobe Photoshop bearbeitet.

3.36. Konfokale Laserscan Mikroskopie

Bei der Laserscan Mikroskopie wandert ein Laser zeilenweise über das Präparat und regt mit seinem Licht die Fluorochrome an. Im Gegensatz zum Fluoreszenzmikroskop können gezielt Fluoreszenzsignale aus der fokussierten Ebene dargestellt werden, während die Signale über und unterhalb der Fokusebene ausgeblendet werden. Die emittierte Fluoreszenz wird detektiert und zu einem Bild verrechnet. Zellen, Lampenbürstenchromosomen und amplifizierte Nukleolen wurden wie in 3.31., 3.33. und 3.34 beschrieben vorbereitet und mit dem konfokalen Laserscan Mikroskop TCS SP2 (Leica) ausgewertet. Die Bilder wurden mit Adobe Photoshop nachbearbeitet.

Laser:

Laser	Anregungswellenlänge	Fluorochrom
Blaulaser	405 nm	Hoechst, DAPI
Argonlaser	488 nm	FITC, Cy2
Orangelaser	561 nm	Texas Red, Cy3

Tab. 3.24.: Laser für die konfokale Laserscan Mikroskopie.

3.37. Elektronenmikroskopie

3.37.1. Einbettung von mikroinjizierten Oozyten in Epon

Die Einbettung von mikroinjizierten Oozyten erfolgte wie in Mais und Scheer (2000) beschrieben. Oozyten der Stadien IV und V wurden aus *Xenopus laevis*-Ovar defollikuliert und mikroinjiziert. Nach einer Inkubation für drei Stunden bei 18 bis 20°C wurden die Oozyten in 2,5 Prozent Glutaraldehyd mit Ionen für mindestens drei Stunden auf Eis fixiert. Anschließend wurden die Oozyten viermal für je drei Minuten mit 0,2 M Cacodylat-Puffer und viermal je drei Minuten mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Nun erfolgte die Postfixierung mit zwei Prozent Osmium für mindestens eine Stunde auf Eis. Danach wurden die Oozyten viermal je drei Minuten mit bidestilliertem Wasser gewaschen. 0,5 Prozent Uranylacetat, lichtgeschützt aufbewahrt, wurde für fünf Minuten bei 12 000 Umdrehungen pro Minute abzentrifugiert und auf die Oozyten pipettiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Die Oozyten wurden abermals viermal je drei Minuten mit Wasser auf Eis gewaschen und mit einer Alkoholreihe dehydriert. Hierzu wurden die Oozyten jeweils zweimal für mindestens 15 Minuten in 50-, 70- und 96-prozentigem Alkohol auf Eis und dreimal 15 Minuten mit 100-prozentigem Alkohol bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Oozyten dreimal für 20 Minuten bei Raumtemperatur in Propylenoxid und ein bis zwei Stunden in eine Mischung aus gleichen Teilen Propylenoxid und Epon eingelegt. Über Nacht erfolgte die Inkubation in einem Gemisch aus einem Teil Propylenoxid und drei Teilen Epon. Am nächsten Tag wurden die Oozyten in frisches Epon eingelegt und das Epon nach zwei Stunden nochmals erneuert. Nach Einbringen eines Papierstreifens mit der Präparatekennzeichnung erfolgte die Aushärtung für mindestens zwei Tage im Brutschrank bei 60°C.

Mikroinjektionslösung: Kontroll-IgM oder α XNM IC #54 (0,07 mg/ml)

Cacodylatpuffer: 0,05 M Cacodylsäure Na-Salz Trihydrat

2,5 % Glutaraldehyd mit Ionen:

5 ml	Glutaraldehyd 25 %
2,5 ml	KCl 1 M
1,25 ml	MgCl ₂ 0,1 M
41,21 ml	0,05 M Cacodylatpuffer
	pH 7,2

Osmiumtetroxid: 2 % OsO₄ in 0,05 M Cacodylatpuffer

Uranylacetat: 0,5 % Uranylacetat in bidest. Wasser

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

<u>Epon-Lösung B:</u>	1 ml = 1,212 g
	44,5 ml MNA
	50 ml Epon 812

<u>Epon-Gemisch:</u>	4 : 3 (w/w)
	24,6 g Epon-Lösung A
	20,8 g Epon-Lösung B
	0,8 ml DMP-30 (Lösung C)

3.37.2. Immungoldlokalisierung

3.37.2.1. Immungoldlokalisierung auf handisolierten Kernhüllen und Einbettung in Epon

Unter Plexiglasplättchen (25 x 35 Millimeter, mit einem 7 mm großen zentralen Loch) wurden Glasdeckgläschen (Durchmesser 18 Millimeter) mit Wachs befestigt. Zehn Kernhüllen aus *Xenopus laevis*-Oozyten wurden in die Kammer einpipettiert und anschließend auf Trägerplatten für fünf Minuten bei 4°C mit 1000 Umdrehungen pro Minute, Beschleunigung und Bremse auf Stufe 4 zentrifugiert.

Alternativ wurden auch 10 Kerne in die Kammer einpipettiert, mit Pinzetten zerquetscht und wie die Kernhüllen zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Deckgläschen vorsichtig mit einer Rasierklinge abgelöst und die Flüssigkeit abgesaugt. Nun erfolgte eine Inkubation mit dem ersten Antikörper für 90 Minuten bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer. Anschließend erfolgten zwei Waschschriffe mit PBS für je fünf Minuten. Der goldgekoppelte Sekundäantikörper wurde eine Stunde lang bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert.

Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Fixierung in 2,5 Prozent Glutaraldehyd mit Ionen für 30 Minuten. Anschließend wurde kurz in Cacodylatpuffer gewaschen und mit zwei Prozent Osmiumtetroxid für 30 Minuten postfixiert. Nach vorsichtigem Waschen in bidestilliertem Wasser erfolgte eine Dehydrierung der Präparate über eine aufsteigende Alkoholreihe (50, 70, 90, 96, 100 Prozent) für je fünf Minuten bei 4°C und für zweimal fünf Minuten mit absolutem Ethanol bei Raumtemperatur. Die Deckgläschen mit den Kernhüllen wurden vier Stunden lang in ein Epon-Propylengemisch und anschließend zweimal in frisches Epon eingelegt. Nach Anfertigung der Eponkapseln erfolgte die Aushärtung des Präparates (siehe 3.37.3.)

PBS: siehe 3.19.1.

Cacodylatpuffer: siehe 3.37.1

2,5 % Glutaraldehyd mit Ionen: siehe 3.37.1

Osmiumtetroxid: siehe 3.37.1

Epon-Gemisch: siehe 3.37.1

Primärantikörper:

Antikörper	Dilution in PBS	Sekundärantikörper
α -CRM1 Peptid Japan	1 : 10	α -Kaninchen
α -eIF5A #22	1 : 500	α -Kaninchen
α -Kernmyosin IC #54 (<i>Xenopus laevis</i>)	pur	α -Maus
α -TFIIIA #17/2	1 : 1	α -Maus

Tab. 3.25.: Primärantikörper für die Elektronenmikroskopie.

Sekundärantikörper:

Antikörper gegen	gekoppelt mit	Verdünnung
Maus	6-nm-Kolloidalgold	1 : 20
	12-nm-Kolloidalgold	1 : 20
Kaninchen	6-nm-Kolloidalgold	1 : 20
	12-nm-Kolloidalgold	1 : 20

Tab. 3.26.: Sekundärantikörper für die Elektronenmikroskopie.

3.37.3. Anfertigung der Eponkapseln

Gelatinekapseln wurden mit Epon gefüllt und ein Zettel mit der Präparatekennzeichnung eingebracht. Die Deckgläschen wurden auf einen mit Alufolie überzogenen Objektträger gelegt und die Gelatine-kapseln mit der Öffnung nach unten auf die Deckgläschen gestürzt. Das Aushärten des Epons

erfolgte für 48 Stunden bei 60°C. Danach konnte nach Zurechtschneiden der überstehenden Deckgläschenränder und Schockgefrieren in Flüssigstickstoff das Deckgläschen mit Luftdruck abgesprengt werden. Die Schnittfläche wurde pyramidenförmig angetrimmt und konnte nun im Ultramikrotom geschnitten werden.

3.37.4. Anfertigung der Ultradünnschnitte und Kontrastierung

Die Ultradünnschnitte wurden am Ultramikrotom mit einer Schnittdicke von 30 bis 80 Nanometer hergestellt und auf Pioloform F beschichteten Kupfernetzchen (Typ 50 und 75, Durchmesser drei Millimeter, VECO Industrieprodukte GmbH, Solingen-Höhscheid) aufgebracht und luftgetrocknet. Für die Kontrastierung erfolgte eine Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit Uranylacetat. Anschließend wurde in CO₂-freiem, abgekochten bidestillierten Wasser gut gespült und in der Bleicitratlösung nach Reynolds für zehn Minuten inkubiert. Hierfür wurden die Bleicitratropfen auf Parafilm pipettiert und NaOH-Plätzchen daneben gelegt. Um das Bleicitrat vor dem CO₂ aus der Atemluft zu schützen, wurde das Netzchen auf den Bleicitratropfen gelegt und die Tropfen mit einer Petrischale abgedeckt. Danach wurde erneut gut mit abgekochtem bidestillierten Wasser gewaschen und luftgetrocknet. Die Präparate wurden mit einem EM10-Elektronenmikroskop von Zeiss ausgewertet.

<u>Uranylacetat:</u>	2 %	Uranylacetat in Ethanol
<u>Bleicitrat nach Reynolds (1963):</u>	1,33 g	Bleinitrat
	1,76 g	Natriumcitrat
	8 ml	NaOH 1N
	auf 50 ml mit abgekochtem bidestillierten Wasser auffüllen	

3.37.5. Transmissions-Elektronenmikroskopie

Bei der Elektronenmikroskopie wird als Strahlenquelle ein Elektronenstrahl verwandt. Eine V-förmige Kathode wird im Vakuum auf ungefähr 2 000°C erhitzt, wobei Elektronen ausgesandt werden. Die Elektronen werden im Vakuum auf ihrem Weg zur Anode stark beschleunigt. Die Präparate werden in den Strahlengang eingebracht, wodurch die Elektronen abgelenkt werden und auf einem Bildschirm ein Abbild des Präparates entsteht.

Die Netzchen mit den Präparateschnitten wurden in den Strahlengang eines EM10 Elektronenmikroskopes von Zeiss eingeschleust. Zur Dokumentation wurden EM-Plattenfilme (Kodak) belichtet und anschließend mit Tetenal Schnellfixierer fixiert. Die Negative wurden mit hoher Auflösung (1000-1200 dpi) eingescannt und mit Adobe Photoshop bearbeitet.

4. ERGEBNISSE

4.1. Export von CD83 mRNA

Reife dendritische Zellen exprimieren an ihrer Oberfläche den Oberflächenrezeptor CD83. Die nukleozytoplasmatische Translokation der CD83 mRNA kann durch Hypusininhibitoren gehemmt werden, was eine Beteiligung des einzig bekannten hypusinhaltigen Proteins beim Export vermuten lässt (Kruse et al, 2000).

Innerhalb der kodierenden Sequenz des CD83-Transkriptes findet sich ein Bereich, der eine *Stem-Loop*-Konfiguration ausbildet und mit dem Protein HuR interagiert (Prechtel et al., 2006). Dieser Bereich wird daher *HuR-Response-Element* (HRE), oder auch posttranskriptionelles regulatorisches Element (PRE) oder *Stem-Loop-2-Element* (SL2) genannt. HuR ist ein ubiquitär exprimiertes Mitglied der ELAV-Familie („*Embryonic Lethal Abnormal Vision*“) RNA-bindender Proteine (Ma et al., 1996). Es bindet an AU-reiche Bereiche in der 3'-untranslatierten Region bestimmter mRNAs und führt zur Stabilisierung der RNA (Fan et al, 1997). Hierbei wirkt es den destabilisierenden AUF-Proteinen entgegen. Im Falle der CD83 mRNA führt eine Bindung an das *HuR-Response-Element* jedoch nicht zu einer Stabilisierung (Prechtel et al., 2006). Des Weiteren kann HuR an die Proteine APRIL und PP32 binden, welche beide leucinreiche Exportsignale beinhalten und mit CRM1 interagieren (Brennan et al, 2000).

4.1.1. Das *HuR-Response-Element* (HRE) ist für den Export von CD83-Transkripten essentiell

Die kodierende Sequenz von CD83 mit der Lokalisation des *HuR-Response-Element* (HRE) und die untranslatierten Bereiche sind in Abb. 5.1. im Anhang gezeigt.

Zunächst sollte überprüft werden, ob das *HuR-Response-Element* (HRE) in der kodierenden Sequenz von CD83 für den Export essentiell ist. Dazu wurden durch *in-vitro*-Transkription Digoxigenin-UTP oder ³²P-UTP-markierte CD83 mRNA-Konstrukte hergestellt. Neben der gesamten wildtypischen Sequenz (CD83 Wildtyp) wurden Transkripte produziert, bei denen das HRE entweder deletiert (CD83 ΔHRE) oder durch eine so genannte gewobbelte Sequenz ersetzt wurde (CD83 HRE-wobble). Die HRE-RNA ist in der Lage, eine *Stem-Loop*-Form auszubilden. Daher wurden bei der gewobbelten Sequenz die Nukleotide der HRE-Sequenz so ausgetauscht, dass die Triplets zwar für dieselben Aminosäuren kodierten, aber eine *Stem-Loop*-Konfiguration nicht mehr möglich war.

Die verschiedenen mRNA-Konstrukte wurden in Zellkerne von *Xenopus*-Oozyten injiziert. Nach 30 Minuten wurde die RNA aus Zellkern- und Zytoplasmafraktion getrennt isoliert. Die markierte RNA wurde nach der Gelelektrophorese entweder durch Belichtung eines Röntgenfilmes oder nach Northernblot durch eine Farbreaktion nachgewiesen.

Wie in Abb. 4.1.1. dargestellt, wurde nur die Wildtyp-CD83 mRNA exportiert. Die Transkripte mit der HRE-Deletion oder der *Stem-Loop*-defizienten Variante wurden im Zellkern retiniert. Dies spricht dafür, dass das HuR-Response-Element mit seiner charakteristischen Sekundärstruktur essentiell für den nukleozytoplasmatischen Export der CD83-Transkripte ist.

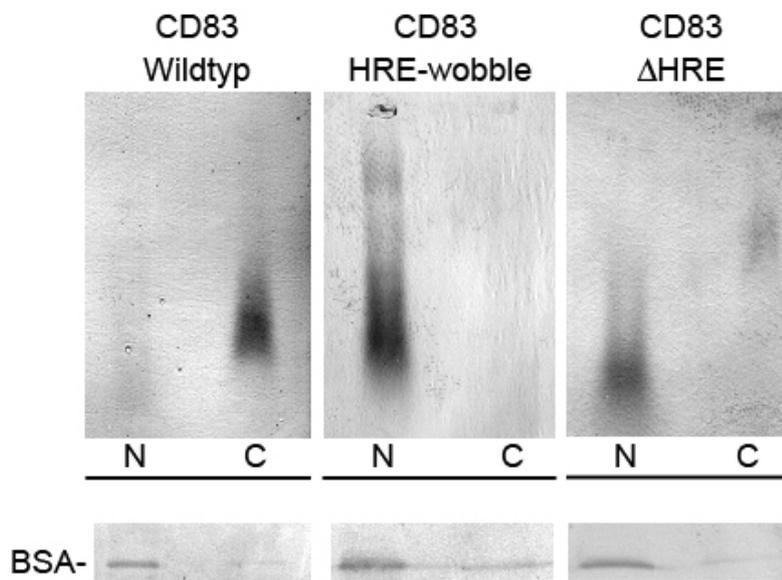


Abb. 4.1.1.: Das HuR-Response-Element (HRE) ist für den Export der CD83 mRNA essentiell.

Verschiedene mRNA-Konstrukte für die gesamte kodierende Sequenz des Oberflächenrezeptors CD83 wurden mit BSA zur Injektionskontrolle in den Zellkern manuell defollikulierter Oozyten injiziert. Das HuR-Response-Element (HRE) der CD83-HRE-wobble-mRNA nimmt im Gegensatz zum Wildtyp keine *Stem-Loop-2*-Konfiguration an, führt aber zur identischen Aminosäuresequenz. Bei der Deletionsvariante CD83 Δ HRE fehlt das HuR-Response-Element. Nach 30 Minuten wurden die Oozyten in Zellkern- und Zytoplasmafraktion getrennt und jeweils sowohl eine RNA- und Proteinisolation durchgeführt. Die RNA wurde mit einem einprozentigen RNA-Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die injizierte RNA wurde nach Immundetektion mit Digoxigenin-Antikörpern mit einer Farbreaktion dargestellt. Die wildtypische CD83 mRNA wurde im Gegensatz zu CD83 HRE-wobble und CD83 Δ HRE mRNA exportiert. In der unteren Reihe ist der Immunblot mit BSA-Antikörpern zur Injektionsgenauigkeit gezeigt. N: Zellkernfraktion; C: Zytoplasmafraktion.

4.1.2. HuR, eIF5A und CRM1 sind am Export von CD83 mRNA beteiligt

Das HuR-*Response*-Element der CD83 mRNA interagiert mit HuR und ist für den Export essentiell (Prechtel et al., 2006). HuR und sein *Xenopus*-Homolog ElrA werden vom Antikörper ELAV 065 erkannt. Daher wurde geprüft, ob durch die Mikroinjektion von ELAV 065-Antikörper der Export von CD83-HRE inhibieren werden kann. Für diese Versuche wurden Transkripte eingesetzt, die nur aus der HRE-Sequenz oder der gewobbelten HRE-Sequenz bestanden. In den Kontrollloozyten wurden HRE-Transkripte exportiert, HRE-wobble-Transkripte hingegen verblieben im Zellkern (Abb. 4.1.2., Spur 2 und 3). Nach Mikroinjektion von ELAV 065-Antikörpern wurde auch der Export der HRE-Transkripte weitgehend unterbunden (Abb. 4.1.2., Spur 5 und 6).

Die Beteiligung von eIF5A am Export wurde ebenfalls mit inhibierenden eIF5A-Antikörpern getestet. Auch nach Mikroinjektion von eIF5A-Antikörpern wurden HRE-Transkripte nicht mehr in das Zytoplasma transportiert (Abb. 4.1.2., Spur 7 und 8).

Da ELAV- und eIF5A-Antikörper den Export von HRE-Transkripte aus dem Zellkern unterbinden konnten, wurde eine Beteiligung von HuR und eIF5A am Export von CD83 mRNA vermutet.

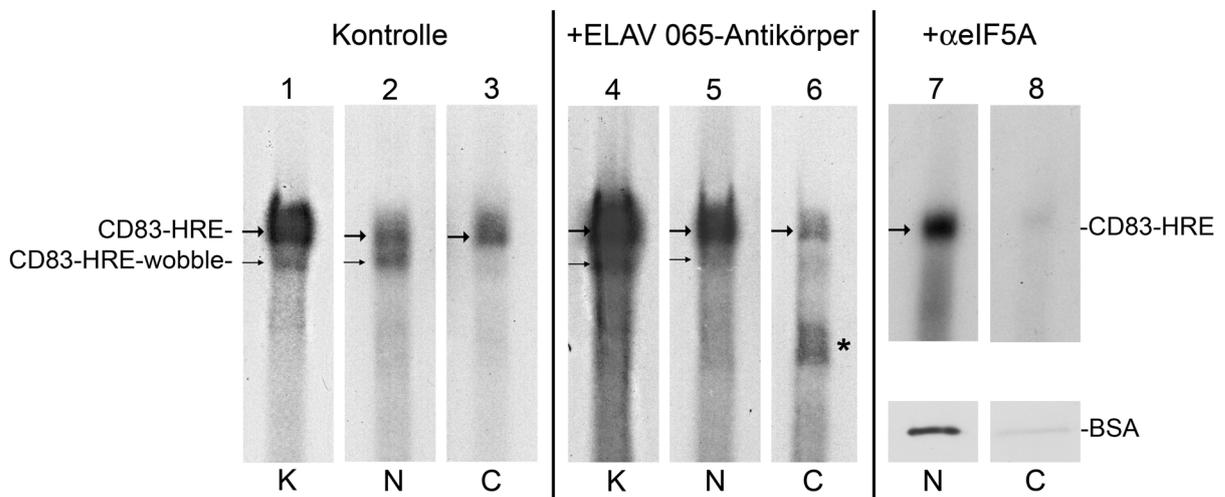


Abb. 4.1.2.: Der Export der CD83-HRE-RNA (HRE-Domäne) wird durch ELAV 065-Antikörper und eIF5A-Antikörper inhibiert.

Zunächst wurden Isotypkontrollantikörper (Spur 1-3), Antikörper gegen HuR (ELAV 065-Antikörper)(Spur 4-6) oder eIF5A-Antikörper (Spur 7 und 8) in den Zellkern injiziert. Eine Stunde später wurde radioaktiv markierte CD83-HRE-RNA (HRE-Domäne) in manuell defollikulierte Oozyten mikroinjiziert. Nach 30 Minuten wurde die RNA aus gesamten injizierten Oozyten (K), aus den Kernfraktionen (N) und Zytoplasmafraktionen (C) isoliert und mit einem sechsprozentigem Acrylamidgel aufgetrennt und die radioaktive injizierte RNA durch die Schwärzung eines Röntgenfilms nachgewiesen. Zur Injektionskontrolle wurde neben Dextranblau CD83-HRE-wobble (Spur 1-6) oder BSA (Spur 7 und 8) mikroinjiziert. CD83-HRE-wobble (dünner Pfeil) wird wie BSA nicht exportiert (Spur 2, 5 und 7). Das *Stem-Loop*-konfigurierte HuR Response Element (HRE)(dicker Pfeil) wird im Gegensatz zum gewobbelten HRE in das Zytoplasma transportiert (Spur 1-3). Sowohl ELAV-Antikörper (Spur 4-6) als auch eIF5A-Antikörper (Spur 7 und 8) konnten den Export des *Stem-Loop*-konfigurierten HRE hemmen. Die markierte Bande (*) stellt vermutlich ein Degradationsprodukt des CD83-HRE dar.

Es wurde beschrieben, dass die Inkubation einer ektop CD83-expressierenden COS-Nierenzelllinie mit dem CRM1-Inhibitor Leptomycin B eine Anreicherung von CD83 mRNA im Zytoplasma blockieren konnte (Prechtel et al., 2006). Aus diesem Grunde wurden die Oozyten ebenfalls mit Leptomycin B vorbehandelt und anschließend der Export der CD83-HRE analysiert. Tatsächlich wurde CD83-HRE im Zellkern angereichert (Abb. 4.1.3., vergleiche Spur 2 und 3 mit Spur 4 und 5), wodurch auch im Oozytensystem ein Hinweis für eine Beteiligung von CRM1 beim Export von CD83 mRNA gefunden werden konnte.

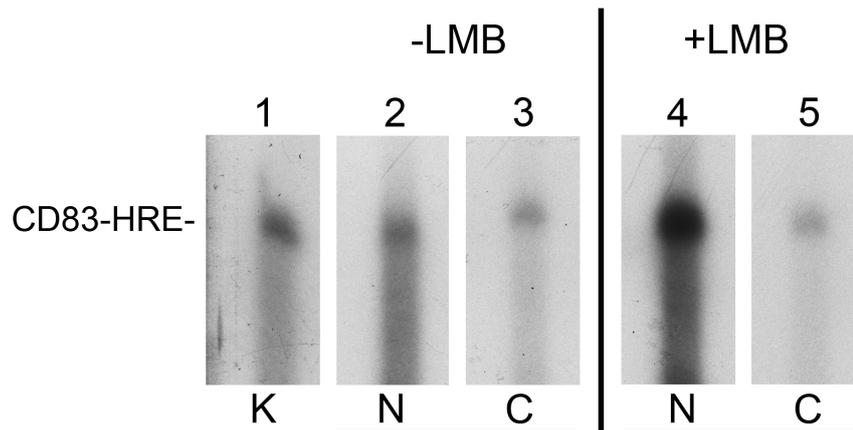


Abb 4.1.3.: Der Export der CD83-HRE-RNA (HRE-Domäne) wird durch Leptomycin B (LMB) inhibiert. Manuell defollikulierte *Xenopus*-Oozyten wurden eine Stunde lang in Barth-Medium ohne (Spur 2 und 3) und mit Leptomycin B (200 nM) (Spur 4 und 5) inkubiert. Radioaktiv markierte wurde in Oozytenkerne injiziert. Nach 30 Minuten wurde die RNA aus der Kern- und Zytoplasmafraktion isoliert auf ein sechsprozentiges RNA-Acrylamidgel aufgetragen und mittels Autoradiographie nachgewiesen. Spur 1 zeigt die radioaktiv markierte CD83-HRE-RNA aus zwei injizierten Oozyten. Bei den Leptomycin B-behandelten Oozyten ist eine Anreicherung der markierten CD83-HRE-RNA im Zellkern zu sehen (Spur 2). K: Kontrolle, radioaktiv markierte CD83-HRE-RNA aus zwei gesamten injizierten Oozyten; N: radioaktiv markierte CD83-HRE-RNA aus der Zellkernfraktion; C: radioaktiv markierte CD83-HRE-RNA aus der Zytoplasmafraktion. Als optische Injektionskontrolle wurde Dextranblau in den Injektionsansatz gegeben.

4.1.3. Am Export von humaner CD83 mRNA beteiligte Faktoren haben Homologe bei *Xenopus laevis*

In dieser Arbeit wurde das Exportverhalten humaner CD83 mRNA in *Xenopus laevis*-Oozyten untersucht. ElrA ist als *Xenopus*-Homolog zu HuR bereits beschrieben (Good, 1996). ElrA zeigt auf dem Proteinlevel 92 % Identität zu HuR (siehe Abb. 4.1.6.). HuR besitzt zwei exportrelevante Bindungspartner, APRIL und PP32. Neben einem noch nicht bekannten Transportweg wird HuR vermutlich mit Hilfe von CRM1 sowie APRIL und/oder PP32 exportiert. Da solche Proteine für *Xenopus laevis* noch nicht beschrieben wurden, sollten bioinformatisch potentielle Homologe für APRIL und PP32 identifiziert werden. In Abbildung 4.1.4. und 4.1.5. sind die humanen Proteine und deren *Xenopus*-Kandidaten dargestellt. Neben den klassischen Kernlokalisierungssignalen weisen alle Proteine mehrere leucinreiche Sequenzbereiche auf, die Ähnlichkeiten mit einem leucinreichen Exportsignal besitzen.

APRIL	MDMKRRIHLELRNRTPAAVRELVLNCKSNKGKIEGLTAEFVNLEFLSLINVGLISVSNL	60
XAPRIL	MDMKRRIHLELRNRTPSDVRELVLNCRHAHEGKIEGLTAEFVNLEFLSLINVLLMSVSNL	60
	****:*****:*****:::***** ***** *:*****	
APRIL	PKLPKPKKLELSENRIFGGLDMLAEKLPNLTHLNLSGNKLDISTLEPLKKLECLKSLDL	120
XAPRIL	PKLPKPKKLELSDNRISGGLDVLAEKLSNLTHLNLSGNKIKDISTLEPLKKFETLKSLLD	120
	*****:*** *****:*****.*****:*****:*****:*****	
APRIL	FNCEVTNLNDYRESVFKLLPQLTYLDGYDREDQEAPSDAEVDG--VDEEEDEEGEED	178
XAPRIL	FNCEVTNLNDYRESVFKLLPQLTYLDGYDREDKEAPSDAEADGDGVDEEEDEEGEED	180
	*****:*****:*****.***** *****:*****:*****	
APRIL	DEDEDEGEEEE--FDEEDEDEDEVEGEDDDE---VSEEEEFVFG---LDEEDE--DEDE	227
XAPRIL	EDEEEFGEEDDVEDDEDEDEEELAEEDDEEDGSGEEEFDFGHGDEVDEEDEDDEE	240
	:::*:***** *:*****: .:***:* .*****:** :****: **:*	
	↓	
APRIL	DEEEEGGKGE KKRRE TDEEG--EDD	251
XAPRIL	DEEEESGKGE KKRR DTDEEGDEED	266
	*****.*****:***** **	

Abb. 4.1.4.: Sequenzvergleich von APRIL bei *Homo sapiens* und *Xenopus laevis*.

Die Aminosäuresequenz von humanem APRIL und *Xenopus*-APRIL (XAPRIL) ist zu 80 Prozent identisch (identische Aminosäuren sind grau unterlegt). Der Sequenzvergleich wurde mit clustalW durchgeführt. Mögliche leucinreiche Kernexportsignale (Position 63-71, 87-95, 112-120) sind unterstrichen und fett gedruckt (Konsensussequenz LxxLxxLxL wobei L durch I,V,F,M ersetzt sein darf und rot gekennzeichnet ist). Das klassische Kernlokalisationsignal, bestehend aus Arginin und Lysin (Position 238-241 bzw. 252-255), ist fett und kursiv dargestellt. Die Phosphorylierung des Threonin an Position 244 soll den nukleozytoplasmatischen Export von APRIL triggern (Fries et al., 2007). Das Threonin an Position 244 von APRIL ist fett gedruckt und mit einem Pfeil gekennzeichnet.

PP32	MEMGRRIHLELRNRTPSDVKELVLNDRSNEGKLEGLTDEFEELEFLSTINVGLTSIANL	60
XPP32	MDMKRRIHLELRNRTPADVKELVLNDRSKEGKIEGLTDEFEGLEFLSTINVCLSSIANL	60
	: :*****:*****.*****:***** ***** ***** *:*****	
PP32	PKLNKPKKLELSDNRVSGGLEVLAEKCPNLTHLNLSGNKIKDLSTIEPLKKLENLKSLLD	120
XPP32	PKLNKPKKLELSDNNISGGLEVLAEKCPNLTHLNLSGNRIKDLSTIEPLKKLEHLKSLLD	120
	*****:*****.*****:*****:*****:*****:*****	
PP32	FNCEVTNLNDYRENVFKLLPQLTYLDGYDRDDKEAPSDAEGYVEGLDDEEEDDEEEYD	180
XPP32	FNCEVTNLNDYRENLFKLLPQLTYLDGYDRDDKEAPSDAEGYVEGLDDEDEDEDDYD	180
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
PP32	EDAQVVEDEEDEDEEEEGEEDVSGEEEEEDEEGYNDGEVDDEEEDDEELGEEERGQ KKRRE	240
XPP32	EDVPPGEEGEDDDDEEEEGEEDVSGEEEEEEDASREGED-EGDEE----AEHGE KKRRD	235
	** . *: **:*:*****:*****: . :** * * ** *:*****:	
PP32	PEDEGEDDD	249
XPP32	QDEGEDDD	244
	:*****	

Abb. 4.1.5.: Sequenzvergleich von PP32 (*Homo sapiens*) und dem *Xenopus*-Äquivalent XPP32.

Die Aminosäuresequenz von humanem PP32 und dem *Xenopus*-Äquivalent XPP32 ist zu 81 Prozent identisch (identische Aminosäuren sind grau unterlegt). Der Sequenzvergleich wurde mit clustalW durchgeführt. Mögliche leucinreiche Kernexportsignale (Position 63-71, 112-120) sind unterstrichen und fett gedruckt (Konsensussequenz LxxLxxLxL wobei Leucine rot gekennzeichnet sind). Das klassische

Kernlokalisierungssignal, bestehend aus Arginin und Lysin (Position 235-238 bzw. 231-234), ist fett und kursiv dargestellt.

Nun wurden zu allen möglicherweise am CD83 mRNA-Export beteiligten menschlichen Proteinen bioinformatisch *Xenopus*-Äquivalenten ermittelt (Tab. 4.1.). Für jedes menschliche Protein außer CD83 konnte ein *Xenopus*-Äquivalent zugeordnet werden. Auf dem Proteinlevel weisen XAPRIL und XPP32 zu ihrem humanen Pendant 80 bzw. 81 Prozent Identität auf. Die Rate ähnlicher Aminosäuren lag bei 89 Prozent für APRIL und XAPRIL und 91 Prozent für PP32 und XPP32. Humanes HuR und *Xenopus*-ElrA haben 92 Prozent identische Aminosäuren, humanes CRM1 und das *Xenopus*-Protein XPO1 97 Prozent, humanes Ran und das *Xenopus*-Äquivalent XRun 98 Prozent, β -Aktin von Mensch und *Xenopus* 99 Prozent und eIF5A beider Spezies 100 Prozent identische Aminosäuren. Das Protein RanBP3 von Mensch und *Xenopus* zeigt 69 Prozent identische und 84 Prozent ähnliche Aminosäuren.

<i>Homo sapiens</i>	<i>Xenopus laevis</i>	identische AS	ähnliche AS
CRM1/Exportin1	XPO1	97 %	98 %
Ran	XRun	98 %	99 %
RanBP3	RanBP3	69 %	84 %
eIF5A	eIF5A	100 %	100 %
β -Aktin	β -Aktin	99 %	100 %
HuR	ElrA	92 %	95 %
APRIL	XAPRIL	80 %	89 %
PP32	XPP32	81 %	91 %

Tab 4.1.: Vergleich der Aminosäuresequenzen von humanen Proteinen, die beim Export von CD83 mRNA möglicherweise eine Rolle spielen, mit den Homologen bei *Xenopus laevis*.

Die Proteine besitzen zwischen 69 und 100 % identische und zwischen 84 und 100 % ähnliche Aminosäuren (AS). Für das humane Protein CD83 konnte mit Datenbankanalysen kein entsprechendes Protein bei *Xenopus laevis* identifiziert werden. Die Sequenzvergleiche wurden mit clustalW durchgeführt. Sie sind im Anhang in Abb. 5.2. (CRM1/Exportin1/XPO1), 5.3. (Ran), 5.4. (RanBP3), 5.5. (eIF5A), 5.6. (β -Aktin), bzw. in Abb. 4.1.6. (HuR/ElrA), 4.1.4. (APRIL/XAPRIL) und 4.1.5. (PP32/XPP32) zu sehen.

4.1.4. Leucinreiche Sequenzen bei HuR, APRIL, PP32 und den *Xenopus*-Homologen

Als nächstes sollten leucinreiche Exportsignale von ElrA, XAPRIL und XPP32 anhand der Konsensussequenz gefunden werden. Die Sequenz **[LIVFM]-X(2-3)-[LIVFM]-X(2-3)-[LIVFM]-X-[LIVFM]** subsumiert leucinreiche Exportsignale (la Cour et al., 2004). Das leucinreiche Exportsignal

von HIV-1-Rev stellt den Prototyp dieser Exportsignale dar. Sowohl bei HuR und ElrA, als auch bei APRIL und XAPRIL sowie PP32 und XPP32 konnten leucinreiche Sequenzen gefunden (Tab. 4.2.). Die leucinreiche Konsensussequenz lautete hierfür [LIF]-XX-L-XX-L-X-L. In leucinreichen Exportsignalen treten neben den Leucinen unter anderem häufig die Aminosäuren Glutaminsäure (E), Asparaginsäure (D) und Serin (S) auf. In der Tat fanden sich diese Aminosäuren in den leucinreichen Sequenzbereichen von HIV-1-Rev, APRIL, XAPRIL, PP32 und XPP32, nicht jedoch bei HuR oder ElrA (Tab. 4.2.).

Protein	LXXLXXLXL
HIV-1-Rev	LPPLERLTL
H. s. HuR	INTLNGLRL
X. l. ElrA	INTLNGLRL
H. s. APRIL	LPKLLKLEL---LPNLTHLNL---LECLKSLDL
X. l. XAPRIL	LPKLLKLEL---LSNLTHLNL---FETLKSLDL
H. s. PP32	LNKLLKLEL-----//-----LENLKSLDL
X. l. XPP32	LNKLLKLEL-----//-----LEHLKSLDL

Tab. 4.2.: Vergleich verschiedener leucinreicher Sequenzen in den humanen Proteinen HuR, APRIL und PP32 und ihren *Xenopus*-Homologen mit dem Prototyp im HIV-1-Rev-Protein.

Die leucinreichen Sequenzen der humanen und der *Xenopus*-Proteine sind ähnlich aufgebaut wie das Exportsignal des HIV-1-Rev. Die leucinreichen Sequenzbereiche der Proteinpaare (HuR-ElrA, APRIL-XAPRIL, PP32, XPP32) sind nahezu identisch. Leucine bzw. deren Substitute sind rot gekennzeichnet, die in leucinreichen Exportsignalen ebenfalls häufig vorkommenden Aminosäuren Glutaminsäure (E), Asparaginsäure (D) und Serin (S) sind blau markiert.

HuR soll nur nach Interaktion mit APRIL oder PP32 in der Lage sein, mit dem Exportrezeptor für leucinreiche Sequenzen, CRM1, exportiert zu werden (Brennan et al., 2000). Dennoch enthält HuR selbst eine leucinreiche, HIV-1-Rev-NES ähnliche Sequenz. Um die Lage dieser Sequenz bei HuR und ElrA zu lokalisieren, wurde ein Sequenzvergleich von HuR und ElrA durchgeführt und die drei RNA-Erkennungsmotive (RRM1, RRM2, RRM3) sowie die bekannte Shuttelsequenz HNS eingezeichnet. Hierbei zeigte sich, dass die leucinreiche Sequenz innerhalb des ersten RNA-Erkennungsmotives liegt (Abb. 4.1.6.). Leucinreiche Exportsignale formen oft eine α -Helix aus, zumindest am Aminoterminus (la Cour et al., 2004). Daher wurde eine dreidimensionalen Modellierung von HuR/ElrA zur Darstellung von Sekundärstrukturen durchgeführt (Abb. 4.1.7.). In der Tat zeigte sich am Aminoterminus der leucinreichen Sequenz von HuR/ElrA eine α -Helix.

HuR weist zwar Merkmale eines leucinreichen Exportsignals auf. Es fehlen jedoch die häufig in diesen Sequenzen vorkommenden Aminosäuren Glutaminsäure (E), Asparaginsäure (D) und Serin (S) (Tab. 4.2.). Außerdem liegt der leucinreiche Sequenzbereich innerhalb eines Bindungsmotivs.

ElrA	MSNGYEDHMDVCRDDIGRTNLIVNYLPQNMTQDELRSLFSSIGEVE ^{SAKLIRDKVAGHS}	60
HuR	MSNGYEDHMAEDCRGDI ^{GR} TNLIVNYLPQNMTQDELRSLFSSIGEVE ^{SAKLIRDKVAGHS}	60
	***** : ** .*****	
ElrA	LGYGFVNYLNAKDAERAINTLNGLR ^{LQSKTIKVS} FARPSSES ^{IKDANLYISGLPRTMTQK}	120
HuR	LGYGFVNYVTAKDAERAINTLNGLR ^{LQSKTIKVS} YARPSSEVI ^{KDANLYISGLPRTMTQK}	120
	***** : .***** :***** *****	
ElrA	DVEDMFLPFGHIINSRVLVDQATGLSRGVAFIRFDKRSEAE ^{EAIASFNGHKPPGSSEPI} T	180
HuR	DVEDMFSRFGRIINSRVLVDQTTGLSRGVAFIRFDKRSEAE ^{EAITSFNGHKPPGSSEPI} T	180
	***** ** :***** :***** :*****	
ElrA	VKFAANPNQNKNVALLSQICHSPA ^{RRFGG^{VP}VHHQAQRFRFSPMGVDHMS} SISSVNVASSA	240
HuR	VKFAANPNQNKNVALLSQLYHSPA ^{RRFGG^{VP}VHHQAQRFRFSPMGVDHMS} GLSGVNVPGNA	240
	***** : ***** :***** . :* .*****	
ElrA	TSGWCIFVYNLQDADEGILWQMF ^{GPF} GAVTNVKVIRDFNTNKCKGFGFVTMTNYEEAAM	300
HuR	SSGWCFIYNLQDADEGILWQMF ^{GPF} GAVTNVKVIRDFNTNKCKGFGFVTMTNYEEAAM	300
	:***** :*****	
ElrA	AIASLNGYRLGDKTLQVSFKTSKSHK	326
HuR	AIASLNGYRLGDKILQVSFKTNKSHK	326
	***** ***** .****	

Abb. 4.1.6.: Lage von leucinreicher, NES-ähnlicher Sequenz und HNS bei HuR und ElrA.

Die RNA-Bindungsmotive sind in rot dargestellt. RRM 1: AS 21-94; RRM 2: AS 107-182; RRM 3: AS 245-318. In blau ist die HuR-Shuttel-Sequenz (HNS) markiert. Mit den kursiven und unterstrichenen Argininen (AS 205-219) besitzt dieser Sequenzbereich Ähnlichkeiten mit einem zweigeteilten Kernlokalisationssignal. Der Sequenzvergleich wurde mit clustalW durchgeführt.

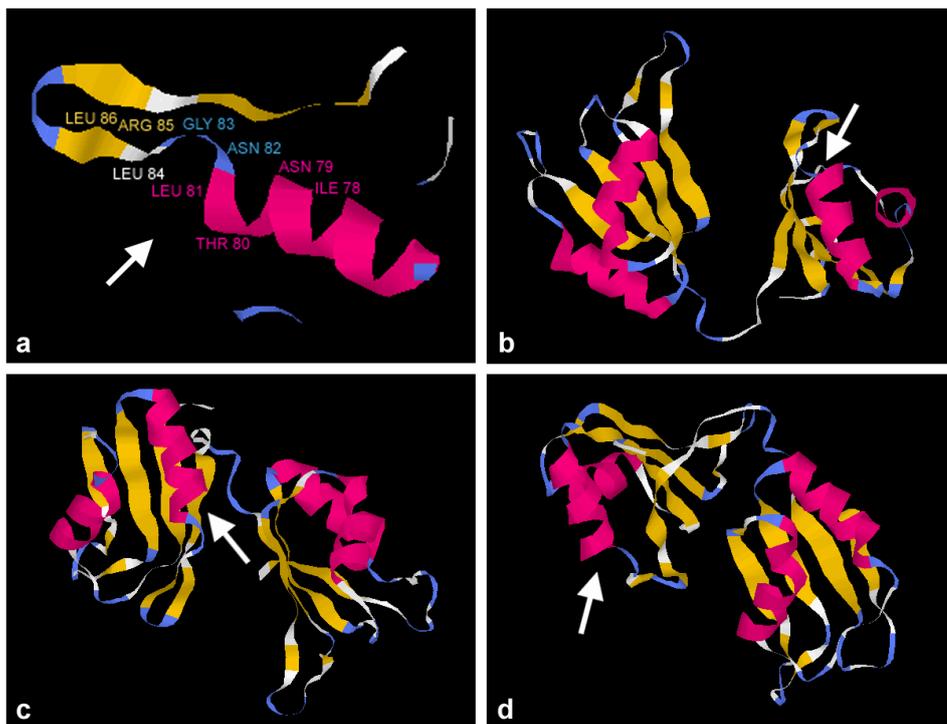


Abb. 4.1.7.: Dreidimensionales Modell von HuR/ElrA. Am Aminoterminus der leucinreichen Sequenz befindet sich eine α -Helix.

Die dreidimensionale Darstellung von HuR/ElrA erlaubt die Analyse von Sekundärstrukturen. Die leucinreiche Sequenz (a) ist an ihrem Aminoterminus Teil einer α -Helix (ILE 78, ASN 79, LEU 81). Die Aminosäuren der leucinreichen Sequenz sind beschriftet. In b, c und d sind verschiedene Ansichten der RNA-Erkennungsmotive 1 und 2 und die Lage der leucinreichen Sequenz (Pfeil) zu sehen.

4.1.5. XAPRIL und XPP32 werden CRM1-vermittelt exportiert

Der CRM1-Inhibitor Leptomycin B führt zur Hemmung des Exports von Substraten mit leucinreichen Exportsignalen. XAPRIL und XPP32 besitzen sowohl ein Kernlokalisierungssignal als auch Kernexportsignal. Daher musste zunächst die Lokalisation der Proteine bestimmt werden. Hierzu wurde die kodierende Sequenz für ElrA, XAPRIL und XPP32 in einen eukaryotischen Expressionsvektor inkliniert. Die Lokalisation der resultierenden GFP (grün fluoreszierendes Protein)-Fusionsproteine in somatischen *Xenopus*-Zellen konnte per Fluoreszenzmikroskopie bestimmt werden (Abb. 4.1.8.). Sowohl ElrA, als auch XAPRIL und XPP32 lokalisieren vorwiegend im Zellkern.

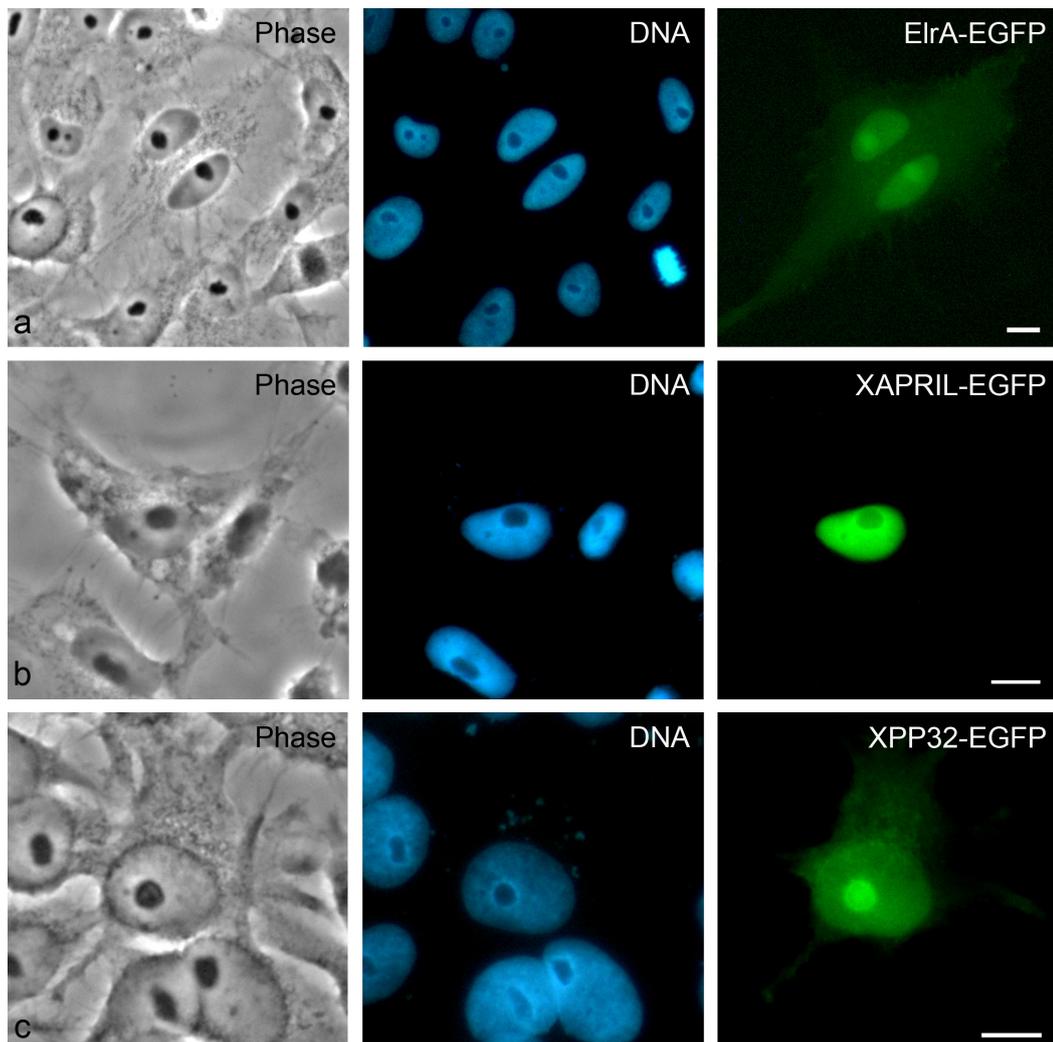


Abb. 4.1.8.: EGFP-Fusionsproteine von ElrA (a), XAPRIL (b) und XPP32 (c) sind im Zellkern von XTC-Zellen lokalisiert. Da jedes Fusionsprotein sowohl Kernexportsignale als auch Kernlokalisationssignale enthält, überwiegt der Kernimport. Eichstrich 10 μm .

Um nur den Export von XAPRIL und XPP32 darzustellen, wurde das C-terminal liegende Kernlokalisationssignal deletiert (XAPRIL- ΔNLS , XPP32- ΔNLS). Bakterien wurden mit Expressionsvektoren mit der kodierenden Sequenz für diese Import-inkompetenten Proteine transfiziert und die Proteinexpression mittels IPTG induziert. Anschließend wurden die Proteine GST-APRIL- ΔNLS und XPP32- ΔNLS -His6 aus dem Bakterienlysat aufgereinigt. Somatische A6-*Xenopus*-Zellen wurden mit und ohne CRM1-Inhibitor Leptomycin B (LMB) inkubiert und mit XPP32- ΔNLS -His6 in den Kern mikroinjiziert. Nach zwei Stunden wurden die Zellen fixiert und das Histidin-markierte XPP32- ΔNLS mit Histidin-Antikörpern nachgewiesen. Während bei den nicht mit LMB behandelten Zellen XPP32- ΔNLS -His6 im Zytoplasma detektiert werden konnte, konnte Gegensatz dazu bei den leptomycinbehandelten Zellen XPP32- ΔNLS -His6 nur im Kern und nicht im Zytoplasma nachgewiesen werden. Hieraus wurde gefolgert, dass der nukleozytoplasmatische Export von XPP32- ΔNLS -His6 durch CRM1 vermittelt wird.

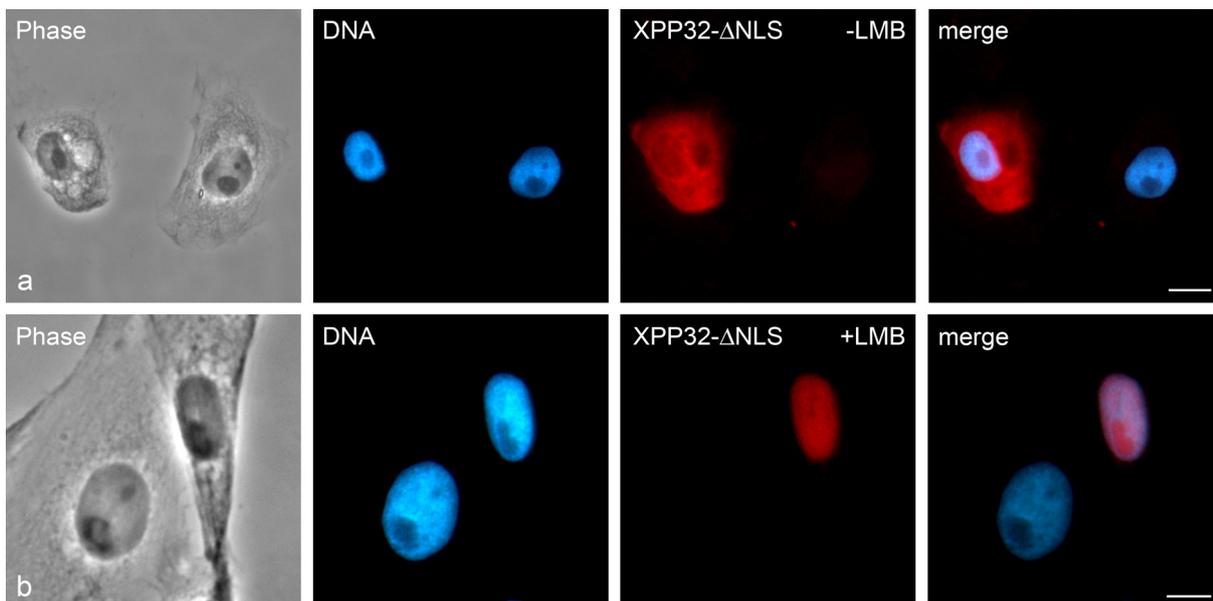


Abb. 4.1.9.: Der Export von XPP32 ist durch Leptomycin B (LMB) hemmbar.

Das Kernlokalisationssignal von XPP32 wurde deletiert und ein Fusionsprotein XPP32- ΔNLS -His6 hergestellt. A6-Zellen wurden für zwei Stunden ohne (a) oder mit LMB (b) inkubiert und das Fusionsprotein in den Zellkern injiziert. Nach zwei Stunden Inkubation wurden die Zellen fixiert und eine Immunfluoreszenz mit Histidin-Antikörpern durchgeführt. Ohne Leptomycin B kam es zum Export des Proteins in das Zytoplasma (a), in Anwesenheit von LMB wurde der Export unterbunden (b). Eichstrich 10 μm .

Dieses Experiment wurde ebenfalls mit GST-XAPRIL- ΔNLS wiederholt. Aufgrund der starken Hintergrundfärbung konnte das exogen applizierte GST-XAPRIL- ΔNLS in der Immunfluoreszenz

jedoch nicht zufrieden stellend dargestellt werden. Injektionsversuche mit *Xenopus*-Oozyten blieben ebenfalls erfolglos.

Um dennoch eine Aussage über eine Interaktion von XAPRIL mit CRM1 treffen zu können, wurde ein Overlay-Blot-Assay durchgeführt. Rekombinantes Histidin-markiertes *Xenopus*-CRM1 wurde auf eine Nitrozellulose transferiert und mit GST-XAPRIL inkubiert. Weil GST (Glutathion-S-Transferase) für unspezifische Bindungen bekannt ist, wurde als Kontrolle CRM1 mit GST inkubiert. Das gebundene GST bzw. GST-XAPRIL wurde immunologisch durch GST-Antikörper nachgewiesen. Wie in Abb. 4.1.10. zu sehen, trat zwar eine unspezifische Bindung von GST an CRM1 auf (Spur 1 und 3). Allerdings band deutlich mehr GST-XAPRIL (Spur 2 und 3) als Kontroll-GST an CRM1. Somit kann von einer Interaktion von XAPRIL mit CRM1 ausgegangen werden.

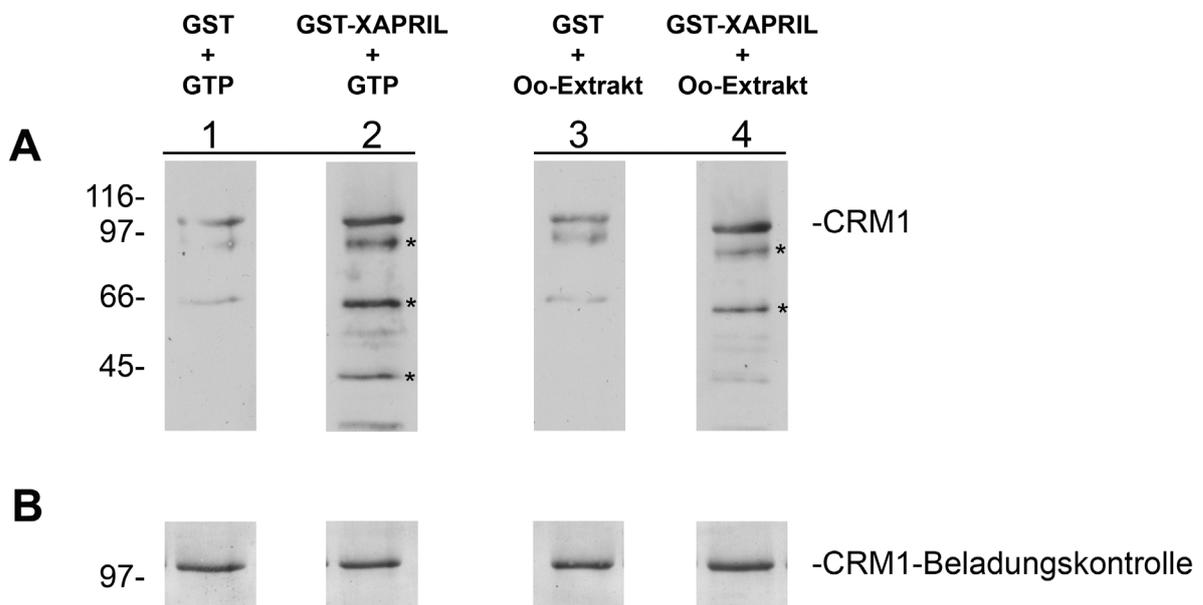


Abb. 4.1.10.: XAPRIL interagiert mit CRM1.

Das aufgereinigte Fusionsprotein CRM1-His6 wurde nach SDS-PAGE auf eine Nitrozellulose transferiert. Die Nitrozellulose wurde mit rekombinantem GST (Spur 1 und 3) oder GST-XAPRIL (Spur 2 und 4) mit Zusatz von Energie (GTP) (Spur 1 und 2) oder Oozytenextrakt (Spur 3 und 4) inkubiert. Anschließend wurde gebundenes GST bzw. GST-XAPRIL durch spezifische Antikörper nachgewiesen (A). Es band deutlich mehr GST-XAPRIL als Kontroll-GST an CRM1. GST-APRIL hat auch an Degradationsprodukte (*) von CRM1 gebunden. Zur Beladungskontrolle wurde die Nitrozellulose mit dem CRM1 mit Ponceau S angefärbt (B). Am linken Rand ist der Molekulargewichtsmarker in kDa gezeigt.

4.1.6. ElrA ist ein Interaktionspartner von eIF5A

Es ist bekannt, dass beim Export von HIV-RNA das Shuttelprotein Rev einerseits an das Rev-Response-Element der HIV-RNA, andererseits an das Protein eIF5A bindet (Ruhl et al., 1993; Liu et al., 1997). Wie in 4.1.2. dargestellt, wurden sowohl eIF5A als auch das HuR-Homolog ElrA als essentielle Faktoren beim Export der CD83-HRE-RNA identifiziert. Da ElrA an das HuR-Response-

Element der CD83 mRNA bindet und eIF5A ebenfalls bei dessen Export beteiligt ist, sollte nun geprüft werden, ob ElrA und eIF5A miteinander interagieren können.

Hierzu wurde wiederum ein Overlay-Blot-Assay durchgeführt. Rekombinantes GST-eIF5A oder GST alleine wurde mit ElrA auf der Nitrozellulose inkubiert. Wie in Abb. 4.1.11. zu sehen, band mehr GST-eIF5A (Spur 2 und 4) als Kontroll-GST (Spur 1 und 3) an ElrA.

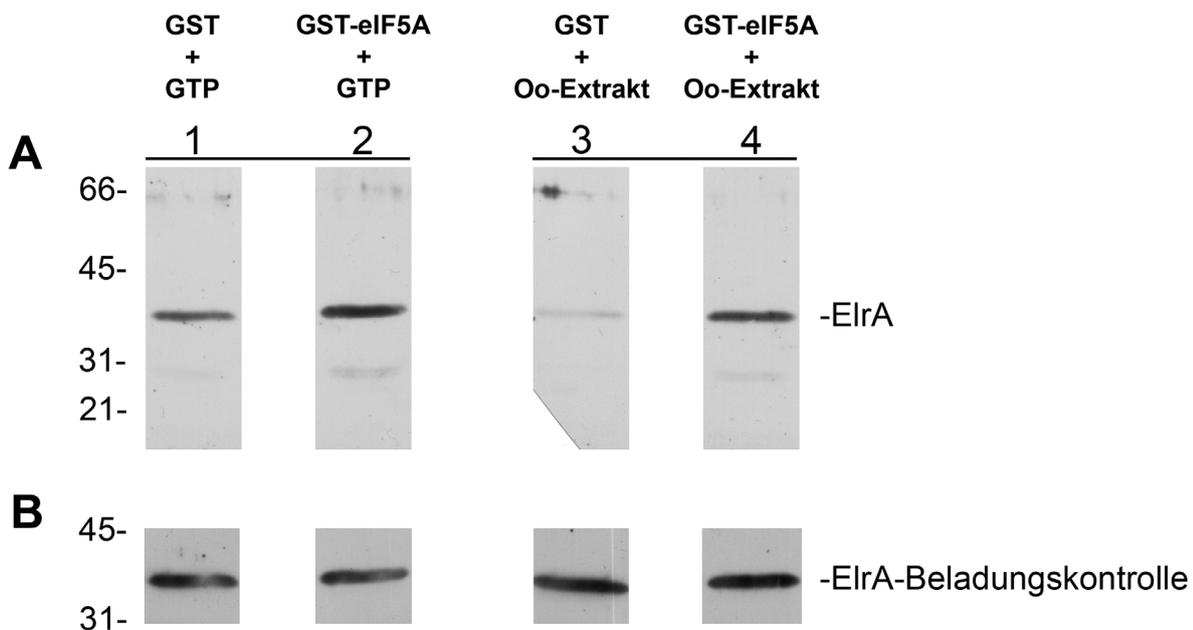


Abb. 4.1.11.: ElrA interagiert mit eIF5A.

Das aufgereinigte Fusionsprotein ElrA-His6 wurde nach SDS-PAGE auf eine Nitrozellulose transferiert. Die Nitrozellulose wurde mit rekombinantem GST (Spur 1 und 3) oder GST-eIF5A (Spur 2 und 4) mit Zusatz von Energie (GTP) (Spur 1 und 2) oder Oozytenextrakt (Spur 3 und 4) inkubiert. Anschließend wurde gebundenes GST bzw. GST-eIF5A durch spezifische Antikörper nachgewiesen (A). Es band mehr GST-eIF5A als Kontroll-GST an ElrA-His6. Zur Beladungskontrolle wurde das ElrA-His6 durch einen Immunblot mit ELAV 065-Antikörper detektiert (B). Am linken Rand ist der Molekulargewichtsmarker in kDa gezeigt.

Es wurde beschrieben, dass eIF5A eine tausendfach höhere Affinität für den Exportrezeptor Exportin 4 im Vergleich zu CRM1 besitzen soll. Allerdings soll für den Export von eIF5A via Exportin 4 die Hypusinmodifikation eine essentielle Rolle spielen (Lipowsky et al., 2000). Im Gegensatz dazu ist die Interaktion mit dem Exportrezeptor CRM1 nicht abhängig von der Hypusinmodifikation (Rosorius et al., 1999; Hoffmann et al., 2001). Daher sollte nochmals überprüft werden, ob im *Xenopus*-System eine Interaktion von nicht hypusinyliertem eIF5A und CRM1 möglich ist. Im Overlay-Blot-Assay wurde rekombinantes GST-eIF5A oder GST alleine mit CRM1 auf der Nitrozellulose inkubiert. Wie in Abb. 4.1.12. zu sehen, band mehr GST-eIF5A als Kontroll-GST an CRM1. Eine Interaktion von nicht hypusinyliertem eIF5A mit CRM1 kann daher angenommen werden.

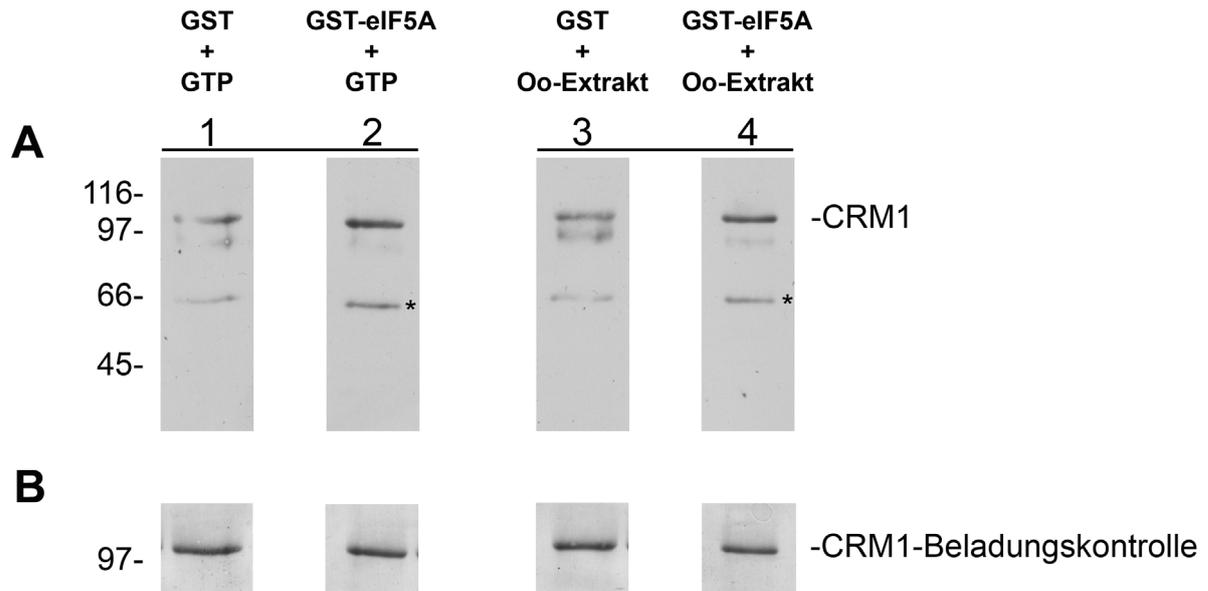


Abb. 4.1.12.: eIF5A interagiert mit CRM1.

Das aufgereinigte Fusionsprotein CRM1-His6 wurde nach SDS-PAGE auf eine Nitrozellulose transferiert. Die Nitrozellulose wurde mit rekombinantem GST (Spur 1 und 3) oder GST-eIF5A (Spur 2 und 4) mit Zusatz von Energie (GTP) (Spur 1 und 2) oder Oozytenextrakt (Spur 3 und 4) inkubiert. Anschließend wurde gebundenes GST bzw. GST-eIF5A durch spezifische Antikörper nachgewiesen (A). Es band mehr GST-eIF5A als das Kontroll-GST an CRM1. GST-eIF5A hat auch an ein Degradationsprodukt (*) von CRM1 gebunden. Zur Beladungskontrolle wurde die Nitrozellulose mit dem CRM1 mit Ponceau S angefärbt (B). Am linken Rand ist der Molekulargewichtsmarker in kDa gezeigt.

4.1.7. Die CD83 mRNA enthält kein putatives eIF5A-Erkennungsmotiv

eIF5A kann direkt an RNA binden. Neben der hyposinabhängigen Interaktion mit dem HIV-Rev-Response-Element und der U6 RNA *in vitro* (Liu et al., 1997) wurden Interaktionen mit RNAs mit den Sequenzmotiven UAACCA und AAAUGU als putative Interaktionselemente beschrieben (Xu und Chen, 2001; Xu et al., 2004). Die CD83 mRNA (siehe Anhang Abb. 5.1.) wurde daraufhin auf diese Sequenzmotive durchsucht. Weder in der 5'-UTR oder der 3'-UTR, noch in der kodierenden Sequenz konnte eines dieser beiden Konsensussequenzen gefunden werden. eIF5A ist zwar am Export der CD83 mRNA beteiligt. Die Interaktion von eIF5A und CD83 mRNA erfolgt jedoch nicht über die eIF5A-Erkennungsmotive UAACCA oder AAAUGU, da diese in den CD83-Transkripten nicht vorliegen.

4.2. Export von oozytentypischem Transkriptionsfaktor IIIA (TFIIIA) in Oozyten von

Xenopus laevis

Als Bindungspartner von eIF5A wurde in *Xenopus*-Oozyten der oozytentypische Transkriptionsfaktor TFIIIA identifiziert (Doktorarbeit W. Hofmann, 2002). TFIIIA weist Ähnlichkeiten mit dem HIV-1-Rev-Protein auf. Beide sind in den RNA-Export involviert und besitzen ein leucinreiches Exportsignal. Das Exportsignal von TFIIIA war in der Lage, das Exportsignal von Rev funktionell zu ersetzen (Fridell et al., 1996). Es kann daher von einem gemeinsamen Exportweg ausgegangen werden. TFIIIA existiert bei *Xenopus laevis* in zwei Varianten, einem somatischen TFIIIA und einem in den Oozyten exprimierten TFIIIA (Kim et al., 1990; Ogilvie und Hanas, 1997). Während HIV-1-RNA mithilfe von Rev exportiert wird, ist TFIIIA in frühen Oozytenstadien an der Transkription und dem Export von 5S rRNA beteiligt. Gemeinsam mit 5S rRNA bildet es den 7S rRNA-Komplex, der im Zytoplasma gelagert wird. Durch die Interaktion von 5S rRNA an TFIIIA wird nämlich das Importsignal des TFIIIA maskiert (Wischnewski et al., 2004). Nach Expression des Proteins L5 und dessen Export in das Zytoplasma wird TFIIIA zunehmend aus der Bindung an 5S rRNA verdrängt und 5S rRNA zusammen mit L5 in den Kern importiert (Rudt und Pieler, 2001). Der schematische Aufbau von TFIIIA mit Lage von Exportsignal und Zinkfingermotiven ist im Anhang in Abb. 5.7. gezeigt. Weil eIF5A beim Rev-vermittelten HIV-1-RNA-Export als Kofaktor essentiell beteiligt ist, sollte die zelluläre Funktion von eIF5A beim TFIIIA-vermittelten Export analysiert werden.

4.2.1. TFIIIA ist an der Kernhülle lokalisiert

Exportrelevante Proteine sind an der Kernhülle lokalisiert. Zunächst sollte daher die Lokalisation von oozytentypischem TFIIIA überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden spezifische monoklonale Antikörper gegen *Xenopus*-TFIIIA hergestellt (Diplomarbeit H. Schneider, 2004). In einer Doppelimmunfluoreszenz auf Oozytengefrierschnitten wurde die Lokalisation von TFIIIA und dem Kernporenprotein Nup62 dargestellt. Wie in Abb. 4.2.1. zu sehen, lokalisieren TFIIIA und Nup62 an der Kernhülle von Oozyten.

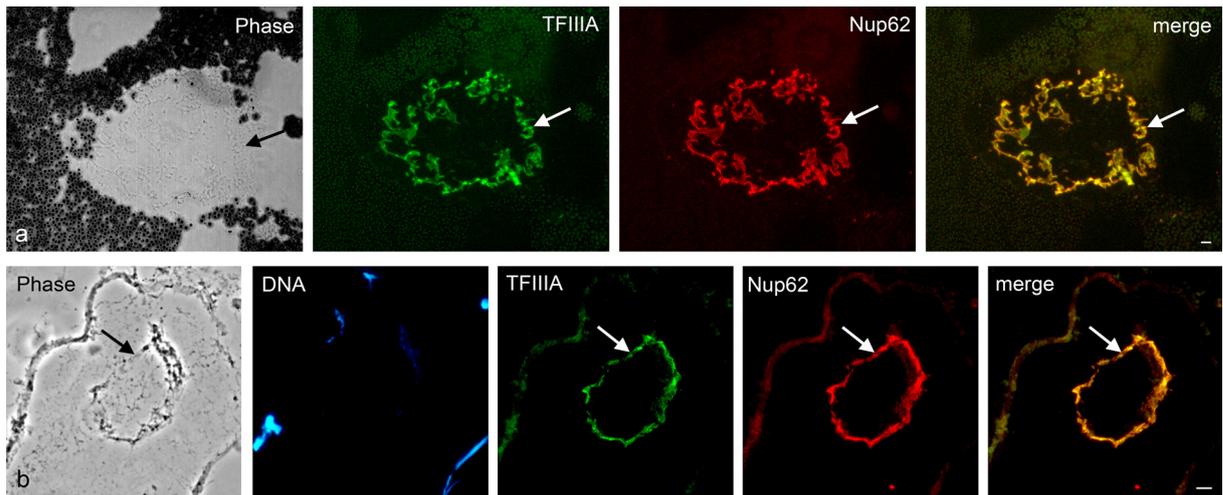


Abb. 4.2.1.: Lokalisation von TFIIIA und Nup62 in *Xenopus*-Oozyten.

Von *Xenopus*-Ovar wurden Gefrierschnitte hergestellt und eine indirekte Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen TFIIIA und Nup62 durchgeführt. In a ist eine reife Oozyte, in b eine junge Oozyte gezeigt. Die Lokalisation von TFIIIA ist in grün, von Nup62 in rot dargestellt, die Kolokalisation in gelb. Die Kernhülle ist mit einem Pfeil markiert. Antikörper gegen TFIIIA und Nup62 binden an der Kernhülle. Eichstrich 10 μ m.

Die Lokalisation von TFIIIA in Oozyten wurde auch im Immunblot überprüft. Hierzu wurden die Proteine aus Zytoplasma, Zellkern und Kernhülle gefällt, mit einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose übertragen. TFIIIA konnte im Zytoplasma und im Zellkern nachgewiesen werden (Abb. 4.2.2. C und N). Darüber hinaus wurde TFIIIA in der Fraktion der Kernhüllenproteine detektiert (Abb. 4.2.2. NE).

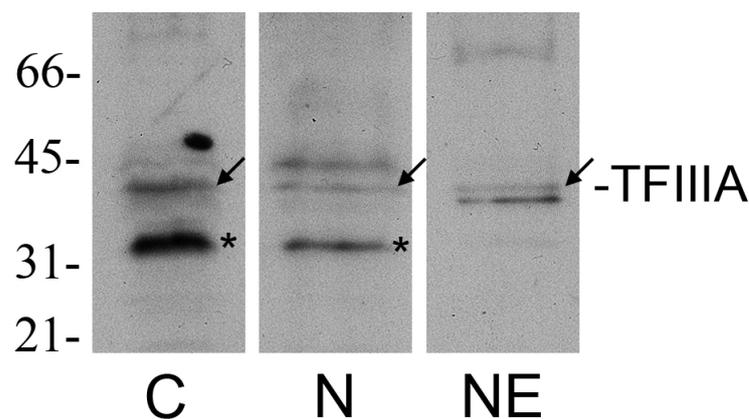


Abb. 4.2.2.: Der monoklonale TFIIIA-Antikörper erkennt ein 38 kDa großes Protein in der Zytoplasma-, Kern- und Kernhüllenfraktion.

Aus defollikulierten Oozyten wurden Zytoplasma, Kerne und Kernhüllen manuell isoliert und die Proteine gefällt. Die Proteine wurden auf ein 18 %iges Acrylamidgel aufgetragen und mit einer SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrozellulose wurde ein Immunblot mit einem monoklonalen TFIIIA-Antikörper durchgeführt. TFIIIA, markiert mit einem Pfeil, konnte in der Zytoplasma-, Kern- und Kernhüllenfraktion nachgewiesen werden (C: Zytoplasma; N: Kerne; NE: Kernhüllen). Die mit einem * gekennzeichnete Bande

stellt vermutlich ein Degradationsprodukt dar. Am linken Rand sind die Molekulargewichtsmarker in kDa angegeben.

Aus der Immunfluoreszenz und dem Immunblot konnte die Lokalisation von TFIIIA an der Kernhülle abgeleitet werden. Eine genauere Beschreibung der Lokalisation ermöglicht jedoch die Immungoldlokalisation von TFIIIA auf handisolierten Kernhüllen. Die Kernhüllen wurden vor der Fixierung und Einbettung in Epon für die Elektronenmikroskopie mit einem monoklonalen TFIIIA-Antikörper und einem sekundären goldgekoppelten Antikörper inkubiert. Wie in Abb. 4.2.3. dargestellt, akkumuliert TFIIIA an den nukleoplasmatischen Filamenten der Kernporenkomplexe.

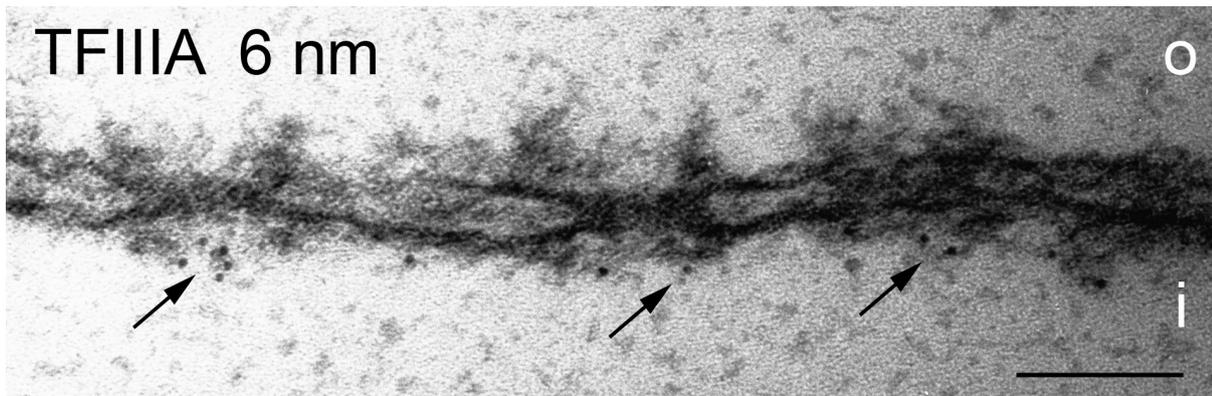


Abb. 4.2.3.: Lokalisation von TFIIIA an den nukleoplasmatischen Filamenten der Kernporenkomplexe von *Xenopus laevis*-Oozyten.

Handisolierte Kernhüllen wurden vor der Einbettung für die Elektronenmikroskopie mit einem monoklonalen Antikörper gegen TFIIIA und anschließend mit einem an 6 nm-Kolloidgold-gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert. Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt einen Querschnitt durch eine handisolierte Oozyten-Kernhülle. Ein Teil der Goldpartikel ist mit einem Pfeil markiert. o: äußere Kernhüllenmembran; i: innere Kernhüllenmembran. TFIIIA lokalisiert an den nukleoplasmatischen Filamenten der Kernporenkomplexe. Eichstrich 1 μ m.

4.2.2. TFIIIA wird mithilfe des Exportrezeptors CRM1 exportiert

Ob der Export von TFIIIA wie vermutet mittels CRM1-Exportrezeptor verläuft, sollte im Folgenden überprüft werden. Zunächst wurde in einer Doppelimmunfluoreszenz auf Oozytengefrierschnitten die Lokalisation von TFIIIA und dem Exportfaktor CRM1 dargestellt. Wie in Abb. 4.2.4. zu sehen, kolokalisieren TFIIIA und CRM1 an der Kernhülle von Oozyten. Ergänzend hierzu wurde aufgrund der besseren Diskriminierung eine Immungoldlokalisation von TFIIIA und CRM1 auf handisolierten Kernhüllen von *Xenopus*-Oozyten durchgeführt. Die Kernhüllen wurden vor der Fixierung und Einbettung in Epon für die Elektronenmikroskopie mit primären Antikörpern gegen TFIIIA und CRM1 und sekundären goldgekoppelten Antikörpern inkubiert. Sowohl TFIIIA als auch CRM1 waren an den nukleozytoplasmatischen Filamenten der Kernporenkomplexe lokalisiert (Abb. 4.2.5.).

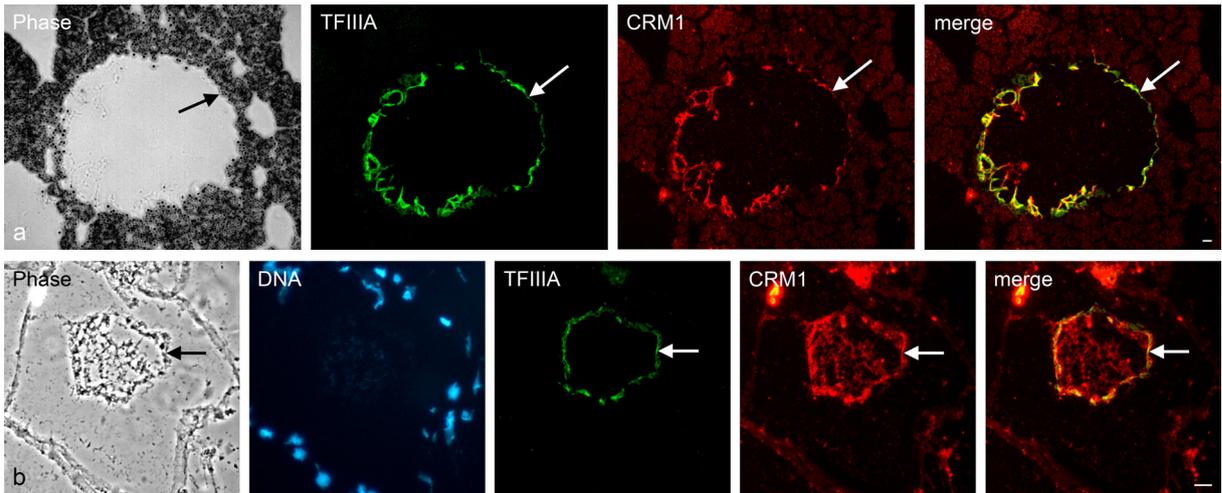


Abb. 4.2.4.: Lokalisation von TFIIIA und CRM1 in *Xenopus*-Oozyten.

Von *Xenopus*-Ovar wurden Gefrierschnitte hergestellt und eine indirekte Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen TFIIIA und CRM1 durchgeführt. In a ist eine reife Oozyte, in b eine junge Oozyte gezeigt. Die Lokalisation von TFIIIA ist in grün, von CRM1 in rot, die Kolo-kalisation in gelb dargestellt. Die Kernhülle ist mit einem Pfeil markiert. Antikörper gegen TFIIIA und CRM1 binden an der Kernhülle. Eichstrich 10 μ m.

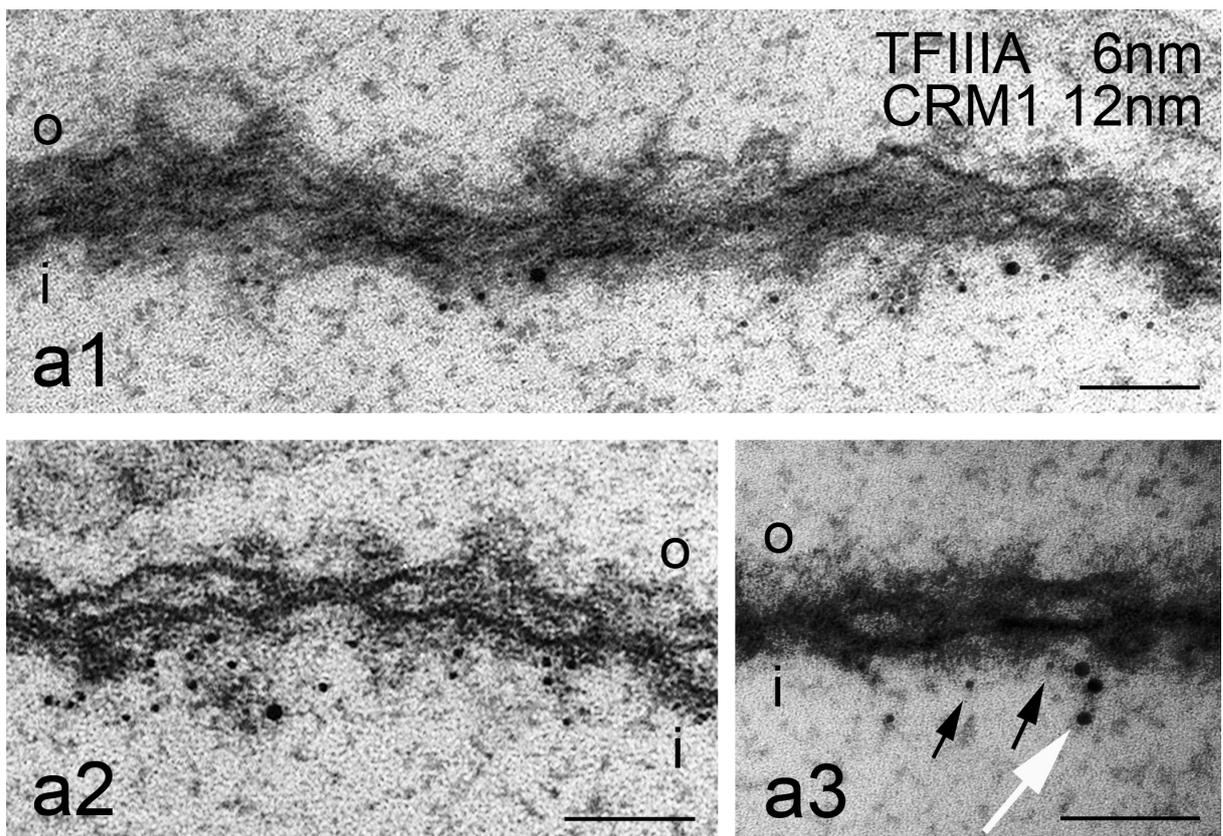


Abb. 4.2.5.: Lokalisation von TFIIIA und CRM1 an Kernporenkomplexen von *Xenopus laevis*-Oozyten.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen a1, a2 und a3 zeigen Querschnitte durch eine handisolierte Oozyten-Kernhülle. Vor der Einbettung wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit TFIIIA- und CRM1-Antikörpern durchgeführt. Die sekundären Antikörper waren an 6 nm-Kolloidgold (TFIIIA; schwarzer Pfeil) oder 12nm-Kolloidgold (CRM1; weißer Pfeil) gekoppelt. o: äußere Kernhüllenmembran; i: innere Kernhüllenmembran. TFIIIA und CRM1 lokalisieren an den nukleoplasmatischen Filamenten der Kernporenkomplexe.

Eichstrich 1 μm .

Anschließend wurden Mikroinjektionsversuche durchgeführt. Hierzu wurde rekombinantes GST-HIV-1-Rev-NES-Fusionsprotein als Kontrolle oder GST-TFIIIA-NES-Fusionsprotein in Kerne von *Xenopus*-Oozyten injiziert. Zur Hemmung des CRM1-vermittelten Exportes wurde ein Teil der Oozyten in Leptomycin B inkubiert. Die Proteine aus Kern- und Zytoplasmafraktion wurden getrennt gefällt und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Übertragen auf eine Nitrozellulose wurde eine Immundetektion der Fusionsproteine mit GST-Antikörpern durchgeführt. Als Injektionskontrolle wurde der Injektionslösung BSA zugesetzt, welches ebenfalls durch Immundetektion nachgewiesen wurde. Sowohl GST-HIV-1-Rev-NES (Abb. 4.2.6. A: Spur 1 und 2) als auch GST-TFIIIA-NES (Abb. 4.2.6. Spur 5 und 6) konnten ohne Leptomycin B-Behandlung im Zytoplasma nachgewiesen werden. Nach Inkubation der Oozyten mit dem CRM1-Inhibitor Leptomycin B hingegen konnte nur wenig bzw. kein Fusionsprotein im Zytoplasma nachgewiesen werden (Abb. 4.2.6. A: Spur 3 und 4; B: Spur 7 und 8). Dies ließ darauf schließen, dass der Export der Fusionsproteine GST-HIV-1-Rev-NES bzw. GST-TFIIIA-NES in das Zytoplasma durch den spezifischen CRM1-Inhibitor Leptomycin inhibiert werden konnte.

Weil hieraus noch keine Schlussfolgerungen über den Export von TFIIIA in seiner vollen Länge gezogen werden konnte, wurden Oozyten in Barth-Medium mit und ohne Leptomycin B inkubiert. Die Kerne wurden manuell aus den Oozyten isoliert, die Kernproteine gefällt und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte der Nachweis des endogenen TFIIIA mit einem monoklonalen TFIIIA-Antikörper. Wie in Abb. 4.2.6. C zu sehen, reicherte sich endogener TFIIIA nach Behandlung der Oozyten mit LMB in den Zellkernen von *Xenopus*-Oozyten an. Dies deutete darauf ebenfalls daraufhin, dass endogener TFIIIA mittels CRM1 aus dem Zellkern exportiert wird. Aufgrund der Anreicherung von TFIIIA im Zytoplasma von Oozyten und des starken Signals im Immunblot im Sättigungsbereich konnte keine quantitative Aussage bezüglich des TFIIIA im Zytoplasma von Oozyten mit und ohne Leptomycinbehandlung getroffen werden.

In einem nächsten Schritt sollte der Export von rekombinanten TFIIIA-His6 untersucht werden. Zunächst wurde getestet, ob rekombinantes TFIIIA-His6 exportkompetent ist. Hierzu wurde TFIIIA-His6-Fusionsprotein aus Bakterien aufgereinigt und in den Kern beziehungsweise in das Zytoplasma von *Xenopus*-Oozyten injiziert. Nach manueller Trennung von Zellkernen und Zytoplasmafraktion wurde das injizierte TFIIIA-His6-Fusionsprotein durch einen Immunblot mit monoklonalen Histidin-Antikörpern nachgewiesen (Abb. 4.2.7.). Nach der Injektion von TFIIIA-His6 in den Zellkern erfolgte ein Export in das Zytoplasma. Dagegen kam es nach Injektion des Proteins in das Zytoplasma nicht zu einem Import. Die Gesamtmenge des jeweils in die Zellkerne oder Zytoplasma injizierten TFIIIA-His6 war identisch. Erstaunlicherweise war im Immunblot aber nur noch ein geringer Teil des in das Zytoplasma injizierten TFIIIA nachzuweisen. Es ist zu vermuten, dass TFIIIA-His6 im Zytoplasma degradiert ist.

Anschließend wurden Oozyten mit und ohne Leptomycin B inkubiert und exportkompetentes TFIIIA-His6 mittels Mikroinjektion in den Zellkern eingebracht. Nach manueller Trennung von Zellkernen und Zytoplasmafraktion wurde ein Immunblot zum Nachweis des TFIIIA-His6 durchgeführt. Der Nachweis von TFIIIA-His6 im Zytoplasma der Kontrolloozyten ohne LMB-Behandlung gelang hier jedoch nicht, weshalb der Versuch nicht ausgewertet werden konnte. Möglicherweise spielte hier eine Degradation des zytoplasmatischen TFIIIA-His6 eine Rolle.

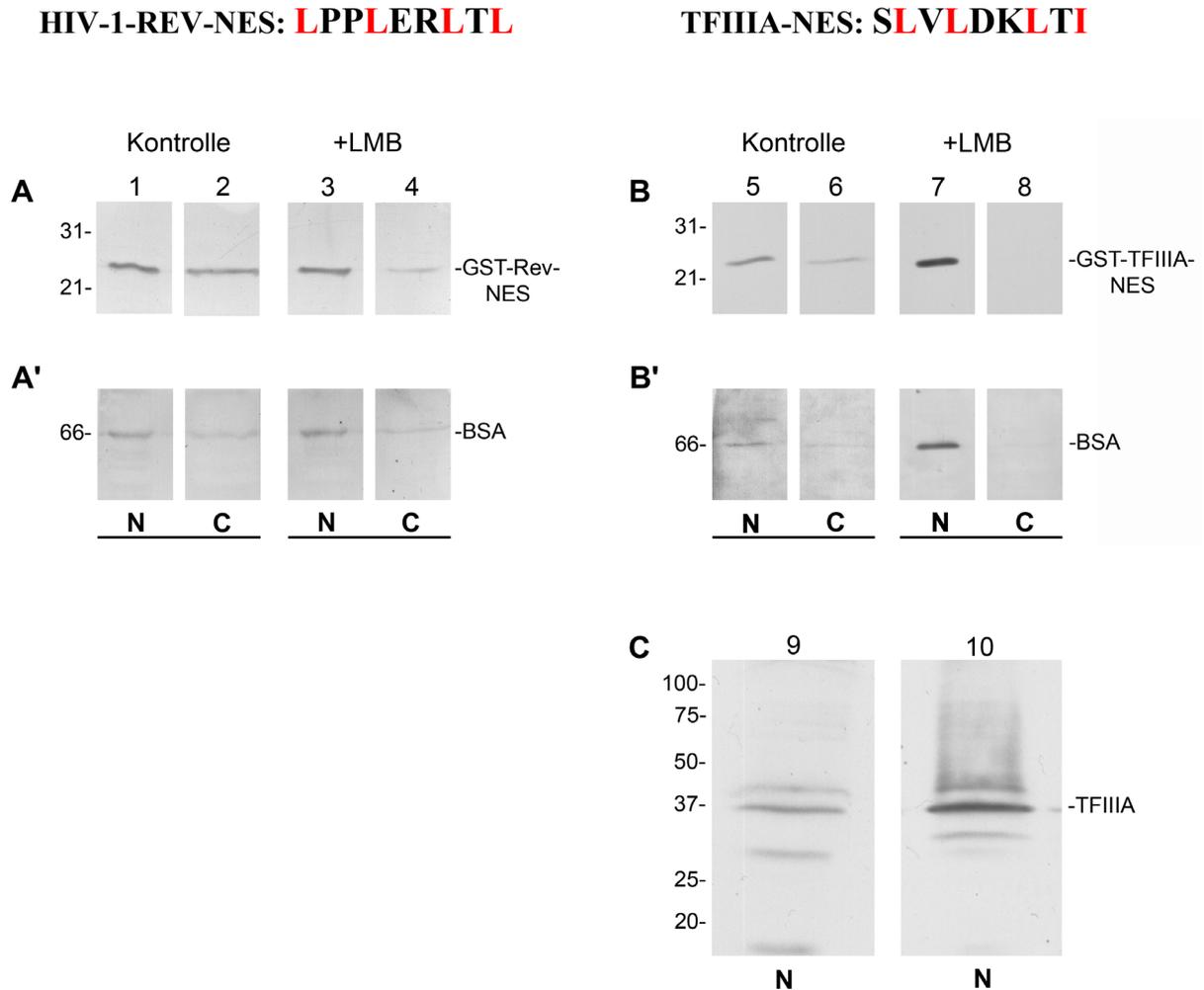


Abb. 4.2.6.: Der Export von rekombinantem GST-TFIIIA-NES und endogenem TFIIIA ist durch Leptomycin B (LMB) hemmbar.

Zehn manuell defollikulierte *Xenopus*-Oozyten wurden eine Stunde lang in Barth-Medium ohne (Spuren 1, 2, 5, 6 und 9) und mit Leptomycin B (200nM) (Spuren 3, 4, 7, 8 und 10) inkubiert. Rekombinantes GST-HIV-1-Rev-NES (A) oder GST-TFIIIA-NES (B) wurde in Oozytenkerne injiziert. Die leucinreichen Kernexportsignale von HIV-1-Rev und TFIIIA (*Xenopus laevis*) sind zum Vergleich gezeigt. Nach 2 Stunden (HIV-1-Rev-NES) bzw. 18 Stunden (TFIIIA-NES) wurde die Kern- und Zytoplasmafraktion isoliert, die Proteine gefällt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde ein Immunblot mit GST-Antikörpern (A und B) oder TFIIIA-Antikörpern (C) durchgeführt. Der Export von GST-TFIIIA-NES (A) konnte wie der Export von GST-HIV-1-Rev-NES (B) durch den CRM1-Inhibitor LMB gehemmt werden. Endogenes TFIIIA (C) reichert sich nach LMB-Inkubation im Zellkern an.

Bei der Mikroinjektion von GST-HIV-1-Rev-NES und GST-TFIIIA-NES wurde BSA zur Injektionskontrolle zugesetzt. Der Nachweis erfolgte mittels Immunblot mit BSA-Antikörpern (A' und B').

N: Kernfraktion; C: Zytoplasmafraktion. Jeweils am linken Rand sind die Molekulargewichtsmarker in kDa angegeben.

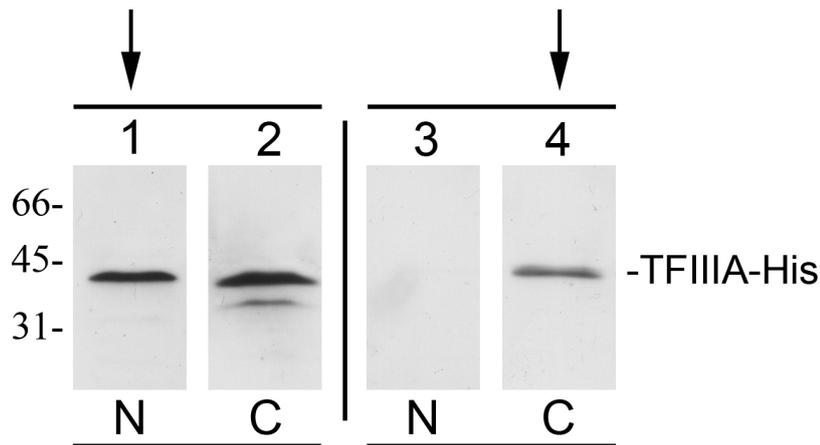


Abb. 4.2.7.: Das rekombinante TFIIIA-His6-Fusionsprotein ist exportkompetent.

Rekombinantes TFIIIA-His6-Fusionsprotein wurde in manuell defollikulierte *Xenopus*-Oozyten injiziert. Dabei wurden je 25 nl in 20 Zellkerne (Spur 1 und 2) und je 50 nl in 10 Zytoplasma (Spur 3 und 4) appliziert. Nach 16 Stunden wurde die Kern- und Zytoplasmafraktion isoliert, die Proteine gefällt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurde ein Immunblot mit einem monoklonalen Histidin-Antikörper durchgeführt. Das in den Zellkern injizierte TFIIIA-His6-Fusionsprotein wurde in das Zytoplasma exportiert (Spur 1 und 2). Dagegen konnte nach Injektion des Proteins in das Zytoplasma kein Import beobachtet werden (Spur 3 und 4). Als optische Injektionskontrolle wurde dem Injektionsansatz Dextranblau zugesetzt. N: Kernfraktion; C: Zytoplasmafraktion. Am linken Rand ist der Molekulargewichtsmarker in kDa gezeigt.

4.2.3. eIF5A ist am Export von TFIIIA beteiligt

TFIIIA wurde als Interaktionspartner von eIF5A identifiziert (Doktorarbeit W. Hofmann, 2002). Inwiefern eIF5A jedoch nicht nur beim HIV-1-Rev-vermittelten Export, sondern auch beim TFIIIA-vermittelten 5S rRNA-Export beteiligt ist, ist noch nicht bekannt. Daher wurde zunächst die Lokalisation von TFIIIA und eIF5A mittels Immunfluoreszenz auf Oozytengefrierschnitten analysiert. Wie erwartet zeigte sich eine Kolokalisation von TFIIIA und eIF5A an der Kernhülle (Abb. 4.2.8.).

Um aber den Einfluss von eIF5A beim Export zu ermitteln, wurden einerseits die Interaktion von TFIIIA mit eIF5A im Overlay-Blot-Assay überprüft und andererseits Mikroinjektionsexperimente mit eIF5A-Antikörpern durchgeführt.

TFIIIA-His6 wurde für den Overlay-Blot-Assay nach SDS-Gelelektrophorese auf eine Nitrozellulose transferiert und mit GST-eIF5A oder GST inkubiert. Gebundenes GST-eIF5A oder GST wurde anschließend durch GST-Antikörper nachgewiesen (Abb. 4.2.9.). Im Gegensatz zu Kontroll-GST hat GST-eIF5A an TFIIIA-His6 gebunden. Auffällig war außerdem, dass eIF5A bei Inkubation bei Zugabe von Oozytenextrakt besser an TFIIIA-His6 gebunden hat als nur bei Zugabe von GTP. Dies ist ein Hinweis darauf hin, dass im Oozytenextrakt enthaltene Faktoren die Bindung von eIF5A an TFIIIA fördern können.

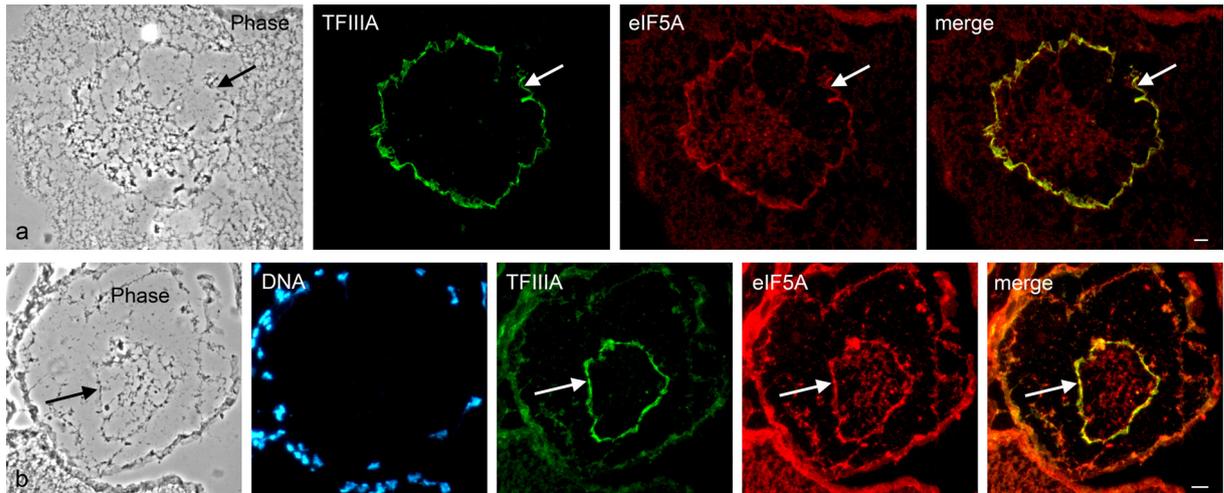


Abb. 4.2.8.: Lokalisation von TFIIIA und eIF5A in *Xenopus*-Oozyten.

Von *Xenopus*-Ovar wurden Gefrierschnitte hergestellt und eine indirekte Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen TFIIIA und eIF5A durchgeführt. In a ist eine reife Oozyte, in b eine junge Oozyte gezeigt. Die Lokalisation von TFIIIA ist in grün, von eIF5A in rot, die Kolokalisation in gelb dargestellt. Die Kernhülle ist mit einem Pfeil markiert. Antikörper gegen TFIIIA und eIF5A binden an der Kernhülle. Eichstrich 10 μ m.

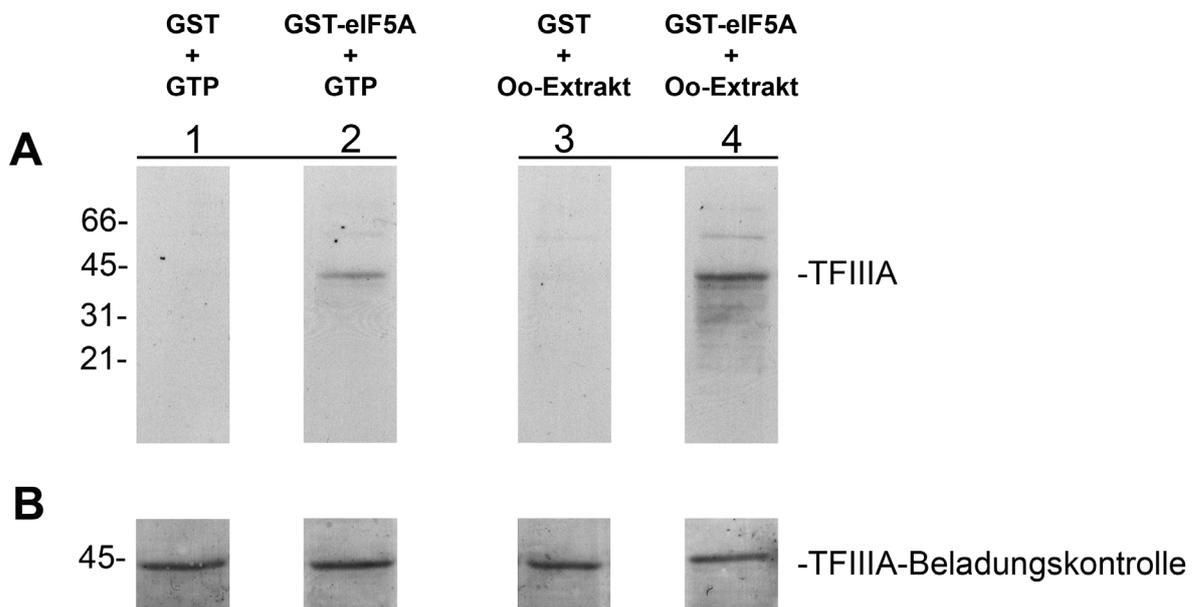


Abb. 4.2.9.: TFIIIA interagiert mit eIF5A.

Das aufgereinigte Fusionsprotein TFIIIA-His6 wurde nach SDS-PAGE auf eine Nitrozellulose transferiert. Die Nitrozellulose wurde mit GST (Spur 1 und 3) oder GST-eIF5A (Spur 2 und 4) mit Zusatz von Energie (GTP) (Spur 1 und 2) oder Oozytenextrakt (Spur 3 und 4) inkubiert. Anschließend wurde gebundenes GST oder GST-eIF5A durch spezifische Antikörper nachgewiesen (A). GST-eIF5A bindet im Gegensatz zu Kontroll-GST an TFIIIA-His6. GST-eIF5A bindet in Anwesenheit von Oozytenextrakt (Spur 4) besser an TFIIIA als nur mit Energiezusatz in Form von GTP. Zur Beladungskontrolle wurde die Nitrozellulose mit dem TFIIIA-His6 mit Ponceau S angefärbt (B). Am linken Rand ist der Molekulargewichtsmarker in kDa gezeigt.

Schließlich wurde noch die Rolle von eIF5A beim Export von GST-TFIIIA-NES und endogenem TFIIIA durch Mikroinjektionsexperimente getestet. Hierzu wurde zunächst ein eIF5A- oder IgG-Kontrollantikörper in den Zellkern vorinjiziert. Nach einer Stunde Inkubation erfolgte die Injektion von GST-TFIIIA-NES. Zwölf Stunden später wurden Zellkern- und Zytoplasmafraktionen getrennt gesammelt und nach Gelelektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis des GST-TFIIIA-NES erfolgte durch einen GST-Antikörper (4.2.10. A). Im Vergleich zur Kontrollinjektion mit IgG wurde der Export von GST-TFIIIA-NES durch eIF5A-Antikörper teilweise inhibiert (vergleiche Abb. 4.2.10. A: Spur 1 und 2 mit Spur 3 und 4). Daraus ließ sich ableiten, dass eIF5A nicht nur beim Rev-vermittelten Export, sondern auch beim Export von TFIIIA in *Xenopus*-Oozyten als essentieller Kofaktor wirkt.

Um den Einfluss von eIF5A beim Export von endogenem TFIIIA zu ermitteln, wurden ebenfalls eIF5A- oder IgG-Kontrollantikörper in den Zellkern vorinjiziert. Nach 3 Stunden wurden die Kerne isoliert und die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis des endogenen TFIIIA erfolgte mit TFIIIA-Antikörpern (4.2.10. B). Endogener TFIIIA ließ sich durch die Injektion von eIF5A-Antikörpern geringfügig im Zellkern anreichern (Abb. 4.2.10. B: Spur 6). Die Molekulargewichtsmarker sind am linken Rand in kDa angegeben.

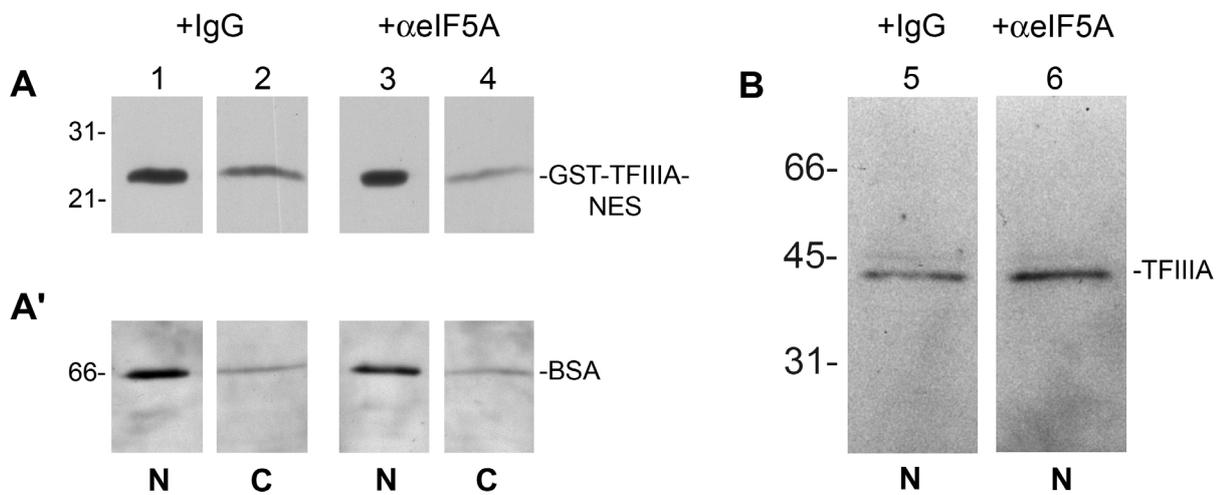


Abb. 4.2.10.: Der Export von GST-TFIIIA-NES und endogenem TFIIIA wird durch eIF5A-Antikörper inhibiert.

A: Manuell defollikulierte Oozyten wurden mit rekombinantem GST-TFIIIA-NES und BSA in den Zellkern injiziert. Eine Stunde zuvor wurden Isotypkontrollantikörper (Spur 1 und 2) oder eIF5A-Antikörper (Spur 3 und 4) in den Zellkern injiziert. Nach 18 Stunden wurden die Oozyten in Kern- und Zytoplasmafraktion getrennt, die Proteine gefällt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose transferiert. Im Immunblot mit GST-Antikörpern zeigte sich eine Hemmung des Exports von GST-TFIIIA-NES durch eIF5A-Antikörper (Spur 3 und 4). Nach der Entfernung der Antikörper wurde ein Immunblot mit BSA-Antikörpern zur Injektionskontrolle durchgeführt. N: Kernfraktion; C: Zytoplasmafraktion. Die Molekulargewichtsmarker sind am linken Rand in kDa angegeben.

B: Manuell defollikulierte Oozyten wurden mit IgG oder eIF5A-Antikörper in den Zellkern injiziert. Nach 3 Stunden wurden die Zellkerne manuell aus den Oozyten isoliert und die Kernproteine gefällt. Nach SDS-PAGE und Westernblot wurde eine Immundetektion mit TFIIIA-Antikörpern durchgeführt. Endogener TFIIIA ließ sich durch die Injektion von eIF5A-Antikörpern im Zellkern anreichern (Spur 6). N: Kernfraktion. Die Molekulargewichtsmarker sind am linken Rand in kDa angegeben.

4.3. Funktion von Kernmyosin IC bei Export und Transkription

Als weiterer Interaktionspartner von eIF5A wurde Kernaktin beschrieben (Hofmann et al., 2001). Kernaktin ist sowohl an Transkriptions- als auch an nukleozytoplasmatischen Exportprozessen beteiligt (Hofmann et al., 2001; Hofmann et al., 2004). Im Gegensatz zu Kernaktin ist Kernmyosin erst seit kurzem bekannt (Nowak et al., 1997; Pestic-Dragovich et al., 2000) und in seinen Aufgaben im Kern daher weniger gut charakterisiert. Weil Amphibienoozyten entscheidende Erkenntnisse zur Aufklärung von Kernaktinfunktionen geliefert haben (Scheer et al., 1984; Rungger et al., 1979), bietet sich daher das Modellsystem *Xenopus*-Oozyte für die Analyse von Kernmyosinaufgaben an. Weil nicht bekannt war, ob bei *Xenopus laevis* ein Kernmyosin IC existiert, sollte das Protein zunächst bioinformatisch aus Gen- und Proteindatenbanken identifiziert werden. Neben der besonderen Eignung für Exportstudien kann in *Xenopus*-Oozyten an den amplifizierten Nukleolen und den Lampenbürstenchromosomen die Transkription sichtbar gemacht werden. Nach der Bereitstellung geeigneter Antikörper gegen das *Xenopus*-Kernmyosin sollte eine Beteiligung von Kernmyosin bei Transkriptions- und Exportprozessen überprüft werden.

4.3.1. Identifikation von Kernmyosin IC im Modellorganismus *Xenopus laevis*

Mittlerweile umfasst die Myosinfamilie 18 Myosinklassen, basierend auf der Sequenz ihrer katalytischen Domänen (Berg et al., 2001). Beim Menschen gehören sieben Mitglieder zur der Myosinklasse I (Myosin IA-IG). Der Sequenzvergleich von Myosin IC des Menschen mit den Sequenzen der anderen Mitgliedern der Myosin I-Familie ist im Anhang in Abb. 5.9. dargestellt. Bei der Betrachtung dieses Sequenzvergleiches fiel auf, dass sich Bereiche mit identischen oder ähnlichen Aminosäuren auf die Kopfdomäne konzentrieren. Während das erste IQ-Motiv der Halsdomäne noch in allen sieben Vertretern der Myosin-I-Familie auftrat, waren die weiteren zwei IQ-Motive nur teilweise vorhanden. Die Schwanzregion differierte bei allen Myosin-I-Mitgliedern. Der Anteil identischer Aminosäuren von humanem Myosin IC mit Myosin IA, IB, ID, IE und IG ist in Tab. 4.3.1. zusammengestellt.

Myosin IC <i>Homo sapiens</i> verglichen mit	identische Aminosäuren
Myosin IA	41 %
Myosin IB	43 %
Myosin ID	38 %
Myosin IE	35 %
Myosin IF	35 %
Myosin IG	38 %

Tab. 4.3.1.: Sequenzvergleich des humanen Myosin IC mit den Mitgliedern der Myosin I-Familie.

Nur 35 bis 43 Prozent der Aminosäuren des Myosin IC sind mit den anderen Vertretern der Myosinfamilie identisch. Der Sequenzvergleich wurde mit clustalW durchgeführt.

Bislang war nur humanes und murines Kernmyosin IC bekannt. Der Nachweis von Kernmyosin IC in weiteren Organismen und die Abschätzung der evolutionären Konservierung kann Aufschluss über die Relevanz des Proteins geben. Findet es sich in einer Vielzahl von Spezies unterschiedlicher Klassen und ist ein Protein evolutionär hoch konserviert, deutet dies auf eine frühe Entstehung sowie eine grundlegende Funktion hin.

Die Analyse sollte aus der Klasse der Mammalier einen Primaten (*Homo sapiens*), die Nager-Modellorganismen *Mus musculus* und *Rattus norvegicus* und eine weitere Spezies *Bos taurus* (Paarhufer) umfassen. Darüber hinaus war die Identifikation des Proteins bei den Amphibien *Xenopus laevis* und *Xenopus tropicalis* sowie bei einem Vertreter der Vögel (*Gallus gallus*) interessant. Des Weiteren wurden die Modellorganismen *Drosophila melanogaster* (Insekt) und *Arabidopsis thaliana* (Pflanze) mit eingeschlossen. Grundlage für die Datenbanksuche war die murine kodierende Sequenz für das Kernmyosin IC (Pestic-Dragovich et al., 2000).

Bei der Maus stellt das Kernmyosin IC eine Spleißvariante von Myosin IC dar. Exon 1 beinhaltet die Translationsstartstelle für das zytoplasmatische Myosin IC, das Exon -2 findet sich in der 5'-untranslatierten Region. Als Spleißvariante stellt bei Kernmyosin IC jedoch das Exon -1 eine zusätzliche Translationsstartstelle *upstream* des Startkodons für das zytoplasmatische Myosin IC bereit. Die dadurch resultierenden zusätzlichen 16 Aminosäuren am Aminoterminus werden teilweise von Exon -1 (Aminosäure 1 bis 6) und von Exon 1 (Aminosäure 7 bis 16) kodiert (Pestic-Dragovich et al., 2000). Ein Alignment unter Verwendung der aminoterminalen 48 Nukleotide des murinen Kernmyosin IC, die für diesen Aminoterminus aus 16 Aminosäuren kodieren, erbrachte für die meisten untersuchten Organismen kein Ergebnis. Daher wurden zunächst für diese Organismen per DNA-Sequenzanalyse potentielle Myosin IC-Äquivalente gesucht. Anschließend wurde die Sequenz *upstream* des Startkodons für das Myosin IC analysiert. Gegebenenfalls wurde eine weitere Sequenzanalyse mit den 30 *upstream* des Startkodons für das Myosin IC liegenden Aminosäuren durchgeführt.

Auf diese Weise wurden die Kernmyosinkandidaten für *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Bos taurus*, *Gallus gallus*, *Xenopus laevis* und *Xenopus tropicalis* identifiziert (Abb. 4.3.1.). Es zeigte sich ein zum murinen Gen ähnlicher Aufbau. Die Myosin IC-Kandidaten existierten in zwei Variationen, wobei eine Variante zusätzliche 16 Aminosäuren am Aminoterminus aufwies (Abb. 4.3.1 und 4.3.3.) Diese 16 Aminosäuren wurden wie bei der Maus von zwei verschiedenen Exons kodiert. Für *Drosophila melanogaster* und *Arabidopsis thaliana* blieb die Suche nach einem Myosin IC- oder Kernmyosin IC-Kandidaten erfolglos.



	Exon X-1						Exon 1												
<i>Mus musculus</i>	<u>atg</u>	cg	c	tac	cg	gca	tcg	gcc	ctg	ggc	agt	gac	ggg	g	gtt	cga	gtg	acc	<u>atg</u>
<i>Homo sapiens</i>	---	---	---	---	---	g	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	g	---	---
<i>Rattus norvegicus</i>	---	---	---	---	---	g	---	---	---	---	---	---	---	---	---	a	---	---	---
<i>Bos tauris</i>	---	---	---	---	---	g	---	---	---	---	---	---	---	---	---	g	g	c	---
<i>Gallus gallus</i>	---	aag	---	a-a	g-	g--	---	-ga	gca	--g	-c-	a--	--t	---	--t	t--	---	---	---
<i>Xenopus laevis</i>	---	aag	---	a-a	---	g--	---	--t	--a	-ca	-tc	---	---	a-c	-g	--c	---	---	---
<i>Xenopus tropicalis</i>	---	aat	---	a-a	---	g--	---	--t	-c-	-ca	-tc	---	---	a-c	--t	--c	---	---	---
<i>Mus musculus</i>	<u>M</u>	R	Y	R	A	S		A	L	G	S	D	G	V	R	V	T	<u>M</u>	
<i>Homo sapiens</i>	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Rattus norvegicus</i>	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Bos tauris</i>	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Gallus gallus</i>	-	K	-	-	G	A		G	A	-	T	N	-	-	-	L	-	-	
<i>Xenopus laevis</i>	-	K	-	-	-	A		-	P	A	I	-	-	I	-	-	-	-	
<i>Xenopus tropicalis</i>	-	K	-	-	-	A		-	P	A	I	-	-	I	-	-	-	-	

Abb. 4.3.1.: Multiples Alignment der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen des Kernmyosin IC-Aminoterminus verschiedener Spezies zeigt die evolutionäre Konservierung.

Ausgewählt wurden Vertreter der Säugetiere (Maus, Mensch, Ratte, Rind), Vögel (Huhn) und Amphibien (zwei Krallenfroscharten). Grundlegend waren die bereits bekannten murinen Sequenzen. Abweichungen bei den anderen Spezies wurden unter dem jeweiligen Nukleotid oder der Aminosäure angegeben und fett gekennzeichnet. Die rot geschriebenen Aminosäuren stellen die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin dar. Der Aminoterminus wird von zwei Exons, dem Exon 1 und einem *upstream* liegenden Exon X-1 kodiert. Das Startkodon für das Kernmyosin IC sowie für das Myosin IC ist durch Unterstreichung hervorgehoben. Der ähnliche Aufbau des Aminoterminus deutet auf seine besondere Bedeutung hin.

XMIC	tggagctgcacatcaacttttactcagggtccagcaatcgacgggatccgggtcacc atg	60
	W S C T S T F T Q A P A I D G I R V T M	
XNMIC	aaagtgcag atga agtacagagcagcgggtccagcaatcgacgggatccgggtcaccatg	60
	K V T M K Y R A A A P A I D G I R V T M	
XMIC	gaaagtgccttaacggcccgggatcgggtcggcgtccaggactttgttctggttgaaaac	120
	E S A L T A R D R V G V Q D F V L L E N	
XNMIC	gaaagtgccttaacggcccgggatcgggtcggcgtccaggactttgttctggttgaaaac	120
	E S A L T A R D R V G V Q D F V L L E N	
XMIC	tatacaagtgaagcagcattcatagaaaacctaaggaaacgatttaaggagaacttaatt	180
	Y T S E A A F I E N L R K R F K E N L I	
XNMIC	tatacaagtgaagcagcattcatagaaaacctaaggaaacgatttaaggagaacttaatt	180
	Y T S E A A F I E N L R K R F K E N L I	

Abb. 4.3.2.: Alignment (clustalW) von Myosin IC und Kernmyosin IC bei *Xenopus laevis* (X.l.).

Der dargestellte Bereich umfasst einen Teil der 3'UTR, das Startkodon und einen Ausschnitt der aminoterminalen kodierende Sequenz der Kandidaten für Myosin IC (XMIC, rot) und Kernmyosin IC (XNMIC, schwarz) bei *Xenopus laevis*. Gleiche Nukleotide sind durch einen schwarzen Strich gekennzeichnet. Zu dem vermuteten Kernmyosin IC bei *Xenopus laevis* konnte eine Sequenz gefunden werden, welche nicht für den Aminoterminus aus 16 Aminosäuren kodiert. In der Sequenz für den Kernmyosin IC-Kandidaten liegt ein Startkodon upstream des Startkodons des Myosin IC-Kandidaten (fett gekennzeichnet).

Nachdem nun der *Xenopus*-Kandidat für das Kernmyosin IC gefunden wurde, erfolgte die bioinformatische Analyse der Domänen (Abb. 4.3.3. und Abb. 4.3.4.). Aminoterminal befindet sich eine im Vergleich zum Myosin IC zusätzliche Sequenz von 16 Aminosäuren. Daran schließt sich die Myosinkopfdomäne mit einer ATP-Bindungsstelle und einer Aktinbindungsstelle an. In der Halsregion können drei so genannte IQ-Motive abgegrenzt werden. Der Myosinschwanz enthält kein bekanntes Motiv. Rechnerisch wurde das Molekulargewicht für das *Xenopus laevis*-Kernmyosin IC auf 120 kDa bestimmt.

Der Sequenzvergleich der Aminosäuren von Kernmyosin IC des glatten Krallenfrosches mit dem humanen und murinen Protein erbrachte jeweils 78 Prozent identische bzw. 95 Prozent ähnliche Aminosäuren (Abb. 4.3.2.). Es kann daher von einer evolutionären Konservierung ausgegangen werden.

Multiples Alignment von Kernmyosin IC von *Mus musculus*, *Homo sapiens* und *Xenopus laevis*

M. m.	MRYRASALGSDGVRVT MESALTARDRVGVQDFVLLLENFTSEAAFIENLRRRFRENLIYTY	60
H. s.	MRYRASALGSDGVRVT MESALTARDRVGVQDFVLLLENFTSEAAFIENLRRRFRENLIYTY	60
X. l.	MKYRAAAFAIDGIRVT MESALTARDRVGVQDFVLLENYITSEAAFIENLRKRFKENLIYTY	60
	*:***:* . **:*****:*****:*****:*****:*****:*****:	
M. m.	IGPVLVSVNPYRDLQIYSRQHMERIRYGVSFYEVPPHLFAVADTVYRALRTERRDQAVMIS	120
H. s.	IGPVLVSVNPYRDLQIYSRQHMERIRYGVSFYEVPPHLFAVADTVYRALRTERRDQAVMIS	120
X. l.	IGSVLVSVNPYKELIYISKQHMERIRYGVSFYEVSPHIYAIADNSYRSLRTERKDQCILIS	120
	** . *****: : *:***:*****.***:***. **:*****:*****:***	
	ATP	
M. m.	GESGAGKTE ATKRLQLFYAETCPAPERGGAVRDRLQLSNPVLEAFGNAKTLRNDSSRFG	180
H. s.	GESGAGKTE ATKRLQLFYAETCPAPERGGAVRDRLQLSNPVLEAFGNAKTLRNDSSRFG	180
X. l.	GESGSGKTE ASKKILOYAVTTPASDQVETVKDRLLQSNPVLEAFGNAKTLRNDSSRFG	180
	****:*****:***:*** *****.***:***:***:*****:*****:*****:	
M. m.	KYMDVQDFDFKAPVGGHILSYLLEKSRVVHQNHGERNFHFVYQLLEGGEETLRRLGLER	240
H. s.	KYMDVQDFDFKAPVGGHILSYLLEKSRVVHQNHGERNFHFVYQLLEGGEETLRRLGLER	240
X. l.	KYMDVQDFDYKAPVGGHILNYLLEKSRVVHQNHGERNFHFVYQLLEGGEELLRRLGLDK	240
	*****:***** . *****:*****:*****:***** *****:*	
M. m.	NPOSYLYLVKGQCAKVSSINDKSDWKVVRKALSVIDFTEDEVEDLLSIVASVLHLGNLHF	300
H. s.	NPOSYLYLVKGQCAKVSSINDKSDWKVVRKALTVIDFTEDEVEDLLSIVASVLHLGNLHF	300
X. l.	NAQNYQYLVKGQCARVSSINDKNEWKTVRRALSIIINFNEDDVEELLSIVASVLHLGNVQF	300
	* . * *****:*****.***:***:***:***:***:*****:*****:***	
M. m.	AAEDSNAQVTTENQLKYLTRLLGVEGTTREALTHRKIIAKGEELLSPLNLEQAAYARD	360
H. s.	AANESNAQVTTENQLKYLTRLLSVEGSTLREALTHRKIIAKGEELLSPLNLEQAAYARD	360
X. l.	ASDDHSHAQVTTENQIKYLARLLAVDATVLRSLIHKKI IAKGEELNSPLNLEQAAYARD	360
	*: : . *:*****:***:***.***:***:***:***:***:***** *****:***	
M. m.	ALAKAVYSRTFTWLVRKINRSLASKDAESPWSRSTTVLGLLDIYGFVVFQHSFEQFCIN	420
H. s.	ALAKAVYSRTFTWLVGKINRSLASKDVESPWSRSTTVLGLLDIYGFVVFQHSFEQFCIN	420
X. l.	ALAKAIYGRTEFWLVSINKSLTYKGSDIHNSIGNASVIGLLDIYGFVVFQHSFEQFCIN	420
	****:* . ***:*** *****:***.***:***.***:***:***:*****:*****:***	
M. m.	YCNEKLQQLFIELTLKSEQEYEAEGIAWEPVQYFNKKIICDLVEEKFKGIISILDEECL	480
H. s.	YCNEKLQQLFIELTLKSEQEYEAEGIAWEPVQYFNKKIICDLVEEKFKGIISILDEECL	480
X. l.	YCNEKLQQLFIELTLKSEQEYEAEGIAWEPVQYFNKKIICDLVEEKFKGIISILDEECL	480

```

*****:*****:*****
M.m.  RPGEATDLTFLEKLEDTVKPHPHFLTHKLADQKTRKSLDRGEFRLHYAGEVTVSVTGFL 540
H.s.  RPGEATDLTFLEKLEDTVKHHPHFLTHKLADQKTRKSLGRGEFRLHYAGEVTVSVTGFL 540
X.l.  RPGEATDMTFLEKLEDTVKNHPHVTHKLGDKLRLKSLGRDEFRLHYAGEVNVYSVAGFL 540
*****:*****:*****

M.m.  DKNNDLLFRNLKETMCSMNPIMAQCFDKSELSDKKRPEVTVATQFKMSLLQLVEILRSKE 600
H.s.  DKNNDLLFRNLKETMCSKNPIMSQCDFRSELSDKKRPEVTVATQFKMSLLQLVEILQSKE 600
X.l.  DKNNDLLFRNLKEVMCDSGNPVHQCDFRAELTDKKRPEVTVATQFKNSLSKLMELMSKE 600
*****:*****:*****

Aktin
M.m.  FAYVRCIKPNDAKQPGRFDEVLRHQVKYLGIMENLRVRRAGFAYRRKYEAFQLQRYKSLC 660
H.s.  FAYVRCIKPNDAKQPGRFDEVLRHQVKYLGILENLRVRRAGFAYRRKYEAFQLQRYKSLC 660
X.l.  ESVVRICKPNDAKQAARFDEVLRHQVKYGLIENVRVRRAGFAYRRKYEIFLQRYKSLC 660
*:*:*****:*****:*****

M.m.  PETWPMWAGRPQDGVAVLVRHLGYKPEEYKMGRTKIFIRFPKTLFATEDSLEVRRQSLAT 720
H.s.  PETWPTWAGRPQDGVAVLVRHLGYKPEEYKMGRTKIFIRFPKTLFATEDALEVRRQSLAT 720
X.l.  PETWPTWNGRAQDGVAVLVKSLGYKPEEYKMGRTKIFIRFPKTLFATEDALERQSIAT 720
*****:*****:*****

IQxxxRGxxxR          IQxxxRGxxxR          RGxxxR
M.m.  KIQAAWRGFHWRQKFLRVKRSALCIQSWWRGTLGRRKAAKRKWAQTIRRLIRGFILRHS 780
H.s.  KIQAAWRGFHWRQKFLRVKRSALCIQSWWRGTLGRRKAAKRKWAQTIRRLIRGFILRHA 780
X.l.  FLQARWKGYVQRKSFVLMKYSAIHIQSWWRGNIGRKAAKRKWAQVDVIRRFIRGFIYRNY 780
*:*:*****:*****:*****

M.m.  PRCPENAFFLDHVRSFLLNLRRLQPRNVLDTSWPTPPPALREASELLRELCMKNMVWKY 840
H.s.  PRCPENAFFLDHVRTSFLNLRRLQPRNVLDTSWPTPPPALREASELLRELCIKNMVWKY 840
X.l.  DRCPENEYFLDYIRYSFLMNLRRNMPKSVLDKSWPVPVPPSLQEASELLREMCNMNVWAY 840
*****:*****:*****

M.m.  CRSISP EWKQQLQOKAVASEIFKGGKKNYPQSVPRLFISTR LGTEEISPRVLOSLGSEPI 900
H.s.  CRSISP EWKQQLQOKAVASEIFKGGKKNYPQSVPRLFISTR LGTEEISPRVLOALGSEPI 900
X.l.  CRRI SP EMKQQLQOKVAVASEIFKEKKDNYPQSVPRLFINTRLGIEEINAKILO TMENQTL 900
** *****:*****:*****

M.m.  QYAVPVVKYDRKGYKPRPRQLLLTPSAVVIVEDAKVKQRIDYANLTGISVSSLSDSL FVL 960
H.s.  QYAVPVVKYDRKGYKPRSRQLLLTPNAVIVEDAKVKQRIDYANLTGISVSSLSDSL FVL 960
X.l.  TYAVPVVKYDRKGYKPRRQQLLLTHNTAYIVVEAKLKQRIDYANLTGISVSSLSDSL NLFVI 960
*****:*****:*****

M.m.  HVQREDNKQKGDVVLQSDHVIETLTKTALSADRVNNININQGSITFAGGPGRDGIIDFTS 1020
H.s.  HVQRADNKQKGDVVLQSDHVIETLTKTALSANRVNSININQGSITFAGGPGRDGTIDFTP 1020
X.l.  HVKCEDNKQKGDVVLQSDHVIETLTKIAISAEKIHNINI IQGSIKFTVGHGKEGIIDFTP 1020
** *****:*****:*****

M.m.  GSELLITKAKNGHLAVVAPRLNSR 1044
H.s.  GSELLITKAKNGHLAVVAPRLNSR 1044
X.l.  GSELLIAKAKNGHLSVVAPRLNSR 1044
*****:*****:*****

```

Abb. 4.3.3.: Multiples Alignment (clustalW) von Kernmyosin IC bei Maus (M.m.), Mensch (H.s.) und *Xenopus laevis* (X.l.).

Identische Aminosäuren sind jeweils grau unterlegt. Rot gekennzeichnet sind der 16-AS-Aminotermius des Kernmyosins und die ATP- und Aktinbindungsstelle in der Kopfdomäne. Fett gekennzeichnet ist die Halsregion mit den drei IQ-Motiven (IQ-Motiv 1: 717-739 IQ-Motiv; 2: 740-762; IQ-Motiv 3: 763-785). Die Konsensusnukleotide sind rot gekennzeichnet. Die rot markierte 240 kennzeichnet das carboxyterminale Ende eines verkürzten Kernmyosins, welches im Folgenden zur Immunisierung von Mäusen verwandt wurde. In orange ist die Glutaminsäure in Position 407 gekennzeichnet, deren Austausch (E407V) *in vitro* in einer starken Aktinbindung und folglich einer verminderten ATP-Hydrolyseaktivität resultierte. Dies beeinträchtigte die Motorfunktion von Myosin, wodurch Aktinfilamente nicht mehr bewegt werden konnten (Kad et al., 2003; Chuang et al., 2006).

Kernmyosin IC von	verglichen mit	identische AS	ähnliche AS
<i>Mus musculus</i>	<i>Homo sapiens</i>	96 %	99 %
<i>Mus musculus</i>	<i>Xenopus laevis</i>	78 %	95 %
<i>Homo sapiens</i>	<i>Xenopus laevis</i>	78 %	95 %

Tab. 4.3.2.: Sequenzvergleich des Kernmyosin IC von Mensch, Maus und glattem Krallenfrosch.

Das Kernmyosin IC des glatten Krallenfrosches *Xenopus laevis* ist dem murinen und dem humanen Protein sehr ähnlich. Das Kernmyosin IC von *Xenopus laevis* weist 78 Prozent identische und 95 Prozent ähnliche Aminosäuren zum murinen und humanen Protein auf. Der Sequenzvergleich wurde mit clustalW durchgeführt.

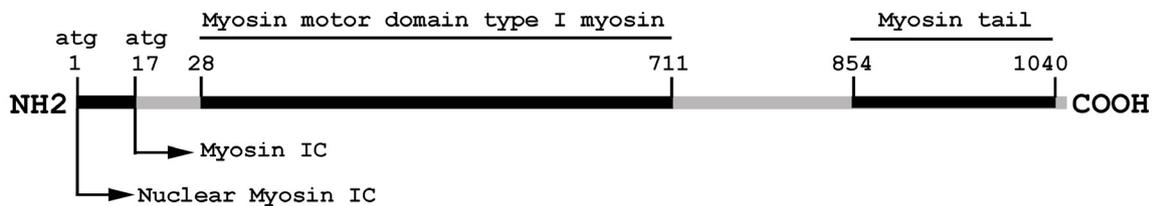


Abb. 4.3.4.: Schematische Darstellung des Kernmyosin IC und Myosin IC von *Xenopus laevis*.

Das Kernmyosin IC besitzt im Vergleich zum Myosin IC am Aminoterminus (NH2) zusätzliche 16 Aminosäuren. Gezeigt ist ebenfalls die Myosin-Motordomäne (*Myosin motor domain type I myosin*) und die Schwanzdomäne (*Myosin tail*).

4.3.2. Der Aminoterminus von Kernmyosin IC ist für die Kernlokalisierung verantwortlich

Im Vergleich zu Myosin IC weist das Kernmyosin IC am Aminoterminus zusätzliche 16 Aminosäuren auf. Diese Sequenz enthält jedoch kein bisher bekanntes Kernlokalisierungssignal. Allerdings sind drei basische Residuen zu finden (drei Arginine bei Mensch, Maus, Ratte und Rind sowie zwei Arginine und ein Lysin bei Krallenfröschen und Huhn; siehe Abb. 4.3.1). Um die Kernlokalisationskapazität des 16-Aminosäuren langen Aminoterminus zu überprüfen, wurde die Sequenz in einen eukaryotischen EGFP-Expressionsvektor inkloniert und somatische *Xenopus*-Zellen mit diesem Plasmid transfiziert. Als Kontrollversuch wurde ein EGFP-Vektor ohne diese Sequenz transfiziert. Während das Kontroll-EGFP sowohl im Kern als auch im Zytoplasma lokalisierte (Abb. 4.3.5.a), war das Fusionsprotein aus Aminoterminus und EGFP hauptsächlich im Zellkern zu sehen (Abb. 4.3.5.b). Daraus konnte geschlossen werden, dass der 16-Aminosäuren lange Aminoterminus des Kernmyosin IC tatsächlich als Kernlokalisierungssignal fungiert.

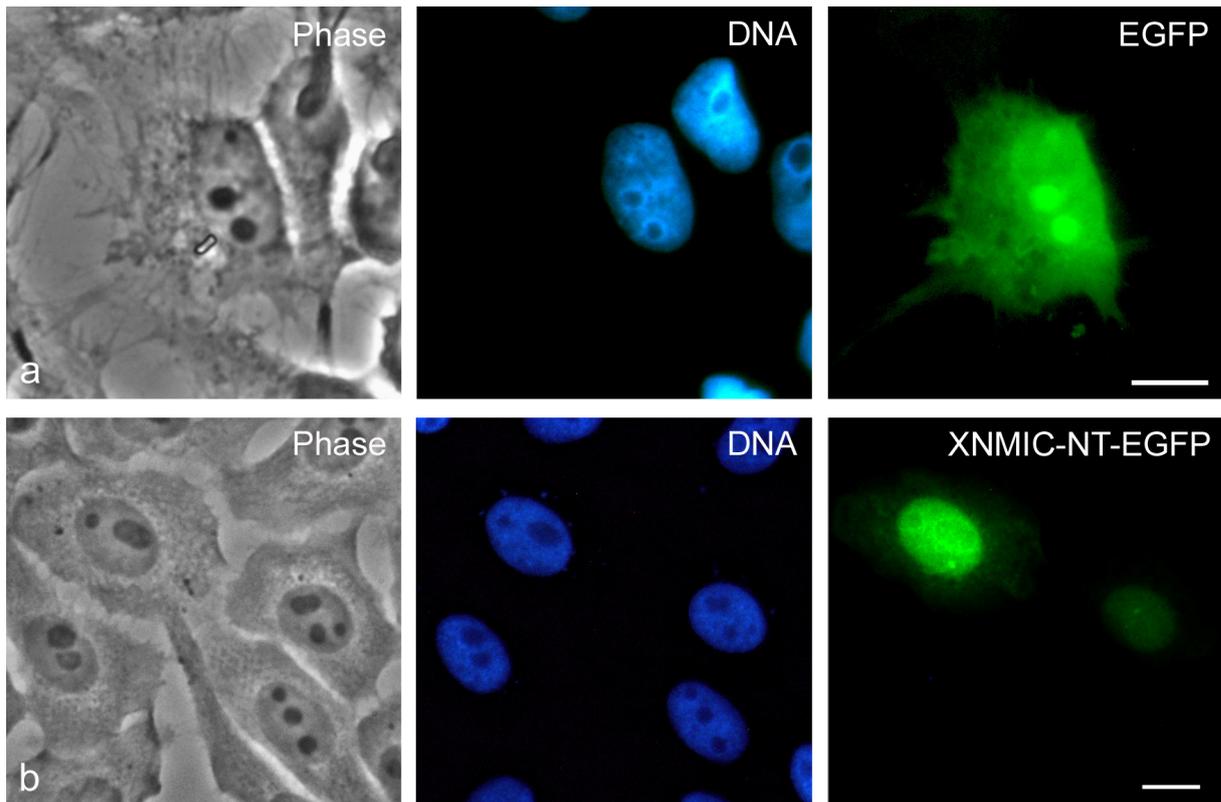


Abb. 4.3.5.: Der Aminoterminus von Kernmyosin IC ist für die nukleäre Lokalisation verantwortlich.

Eukaryotische EGFP-Expressionsvektoren ohne Insert (a) oder mit der kodierenden Sequenz für den charakteristischen Aminoterminus aus 16 Aminosäuren des *Xenopus*-Kernmyosins IC (XNMIC-NT) wurden in somatische XTC-Zellen durch Transfektion eingebracht. Nach Expression eines fluoreszierenden Proteins wurden die Zellen fixiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Während EGFP alleine (a) sowohl in Kern als auch Zytoplasma zu finden war, zeigte sich das EGFP-Fusionsprotein mit dem Aminoterminus des XNMIC im Zellkern (b). Eichstrich 10 μm .

4.3.3. Lokalisation des *Xenopus laevis*-Kernmyosins IC in somatischen Zellen und Oozyten

Als nächstes sollte endogenes Kernmyosin IC bei *Xenopus* mit Antikörpern nachgewiesen werden. Hierzu stand zunächst ein polyklonales Serum gegen den Aminoterminus MRYRASALGSDGVRVT des humanen Kernmyosins IC zur Verfügung (NM IC; freundlicherweise von P. de Lanerolle, Chicago, zur Verfügung gestellt; Nowak et al., 1997; Pestic-Dragovich et al., 2000). Dieser Antikörper wurde mittels Immunfluoreszenz (Abb. 4.3.6.) bzw. Immunblot (Abb. 4.3.7.) mit humanen HeLa-Zellen bzw. HeLa-Zell-extrakt getestet.

Wie erwartet zeigte sich in der Immunfluoreszenz eine Lokalisation des humanen Kernmyosin IC im Zellkern (Abb. 4.3.6. a). Im Zytoplasma trat kein Filamentmuster auf. Im Immunblot wurde neben Degradationsprodukten ein 120 kDa großes Protein sowohl im Zellkern als auch Zytoplasma detektiert (Abb. 4.3.7.).

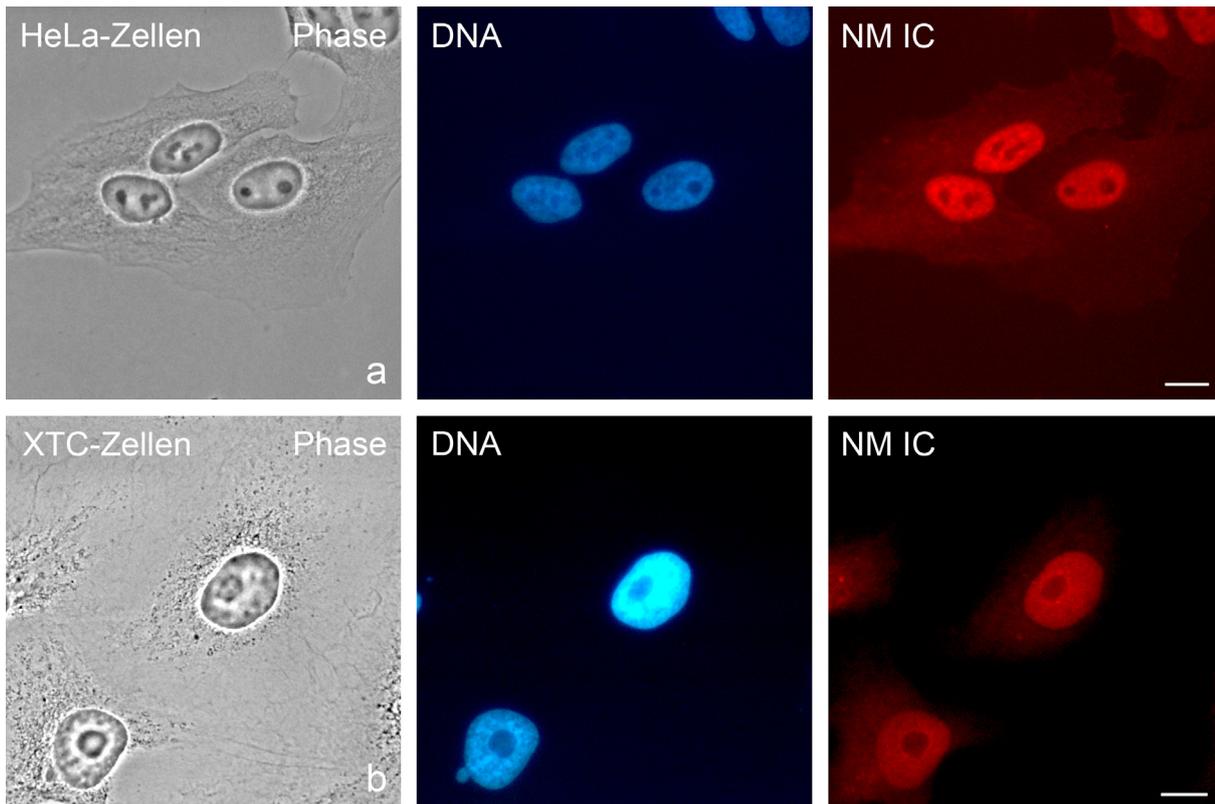


Abb. 4.3.6.: Immunfluoreszenz mit dem polyklonalen Serum NM IC in somatischen humanen Zellen und *Xenopus*-Zellen.

Somatische humane (HeLa-Zellen) und *Xenopus*-Zellen (XTC-Zelllinie) wurden mit Paraformaldehyd fixiert und eine indirekte Immunfluoreszenz mit dem polyklonalen Antikörper NM IC gegen den Aminoterminus des humanen Kernmyosins IC (MRYRASALGSDGVRVT) durchgeführt. In a ist die Färbung der Zellkerne in humanen Zellen, in b in *Xenopus*-Zellen zu sehen. Eichstrich 10 μm .

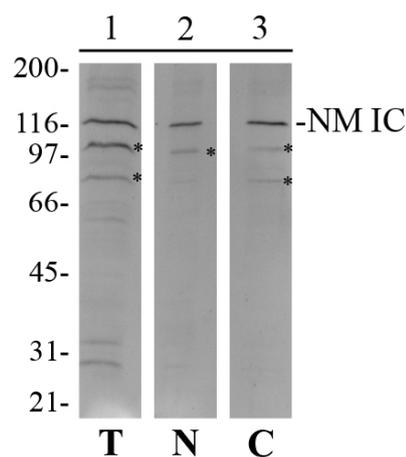


Abb.: 4.3.7.: Der polyklonale Antikörper NM IC erkennt ein 120 kDa großes Protein in der Kern- und Zytoplasmafraktion humaner Zellen.

Aus humanen HeLa-Zellen wurden Zellkerne vom Zytoplasma getrennt und die Proteine gefällt. Anschließend wurden die Proteine auf ein zwölfprozentiges Acrylamidgel aufgetragen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde ein Immunblot mit dem polyklonalen Kernmyosin-Antikörper NM IC durchgeführt. Kernmyosin IC konnte in der Kern- und Zytoplasmafraktion nachgewiesen werden (T: Proteinextrakt aus HeLa-Zellen; N: Proteinfraction aus Zellkernen; C: Proteinfraction aus dem Zytoplasma). Die mit einem * gekennzeichneten Banden stellen Degradationsprodukte dar. Am linken Rand ist der Molekulargewichtsmarker in kDa angegeben.

Zwar konnte in der Immunfluoreszenz unter Verwendung desselben Antikörpers in somatischen *Xenopus*-Zellen eine Kernfluoreszenz beobachtet werden (4.3.6. b.), an Oozytengefrierschnitten gelang jedoch keine Darstellung. Da auch im Immunblot mit Zellkernproteinen aus somatischen *Xenopus*-Zellen oder aus Oozyten ebenfalls kein Protein entsprechender Größe nachgewiesen werden konnte, war folglich die Herstellung von spezifischen Antikörpern gegen *Xenopus*-Kernmyosin IC notwendig. Zur Detektion von *Xenopus*-Kernmyosin IC sollten nun sowohl polyklonale als auch monoklonale Antikörper generiert werden. Für die Herstellung polyklonaler Antikörper wurde ein synthetisiertes Peptid mit dem Aminoterminus des Proteins (CMKYRAPAAAIDGIRVT) zur Injektion in Meerschweinchen in Auftrag gegeben (Firma SeqLab, Göttingen, Deutschland). Zur Gewinnung monoklonaler Antikörper wurde ein verkürztes Histidin-markiertes Kernmyosin in Bakterien hergestellt. Hierfür wurde die RNA aus somatischen XTC-Zellen gewonnen. Nach Umschreiben in eine cDNA wurde mit spezifischen Primern die Sequenz für die aminoterminalen 240 Aminosäuren amplifiziert (siehe Abb. 4.3.3. und 4.3.8.). Diese Sequenz enthält auch die Information für den Kernmyosin-spezifischen Aminoterminus.

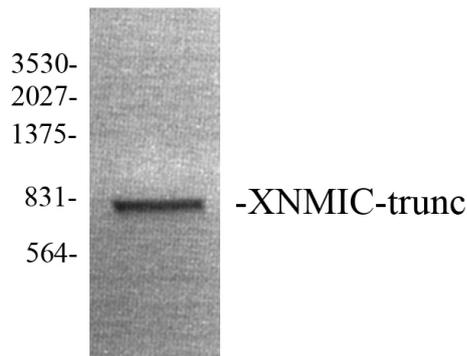


Abb. 4.3.8.: Amplifikat von XNMIC-trunc aus der cDNA von XTC-Zellen.

Aus XTC-Zellen wurde die RNA isoliert und mit reverser Transkription in eine cDNA umgeschrieben. Mit spezifischen Primern wurde die DNA für ein verkürztes 240 kDa großes aminoterminales Kernmyosin-Protein amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde auf ein einprozentiges DNA-Agarosegel aufgetragen. Am linken Rand ist der DNA-Längenmarker in bp gezeigt.

Nach Ligation mit einem prokaryotischen Histidin-Fusionsvektor und Transformation des Plasmids in einen Bakterienstamm wurde die Proteinexpression induziert (Abb 4.3.9. Spur 1). Das aufgereinigte verkürzte 25 kDa große Kernmyosin IC- trunc-His6 (Abb. 4.3.9. Spur 2) wurde in eine Maus zur Antikörperproduktion injiziert (Prof. H. Zentgraf, DKFZ Heidelberg). Nach Generierung von Hybridomazellen konnten monoklonale Antikörper im Zellkulturüberstand abgeerntet werden. Zunächst wurden die monoklonalen (Abb. 4.3.9. Spur 3 bis 5) und polyklonalen Antikörper (Abb. 4.3.9. Spur 6 und 7) im Immunblot auf rekombinanten Proteinen getestet.

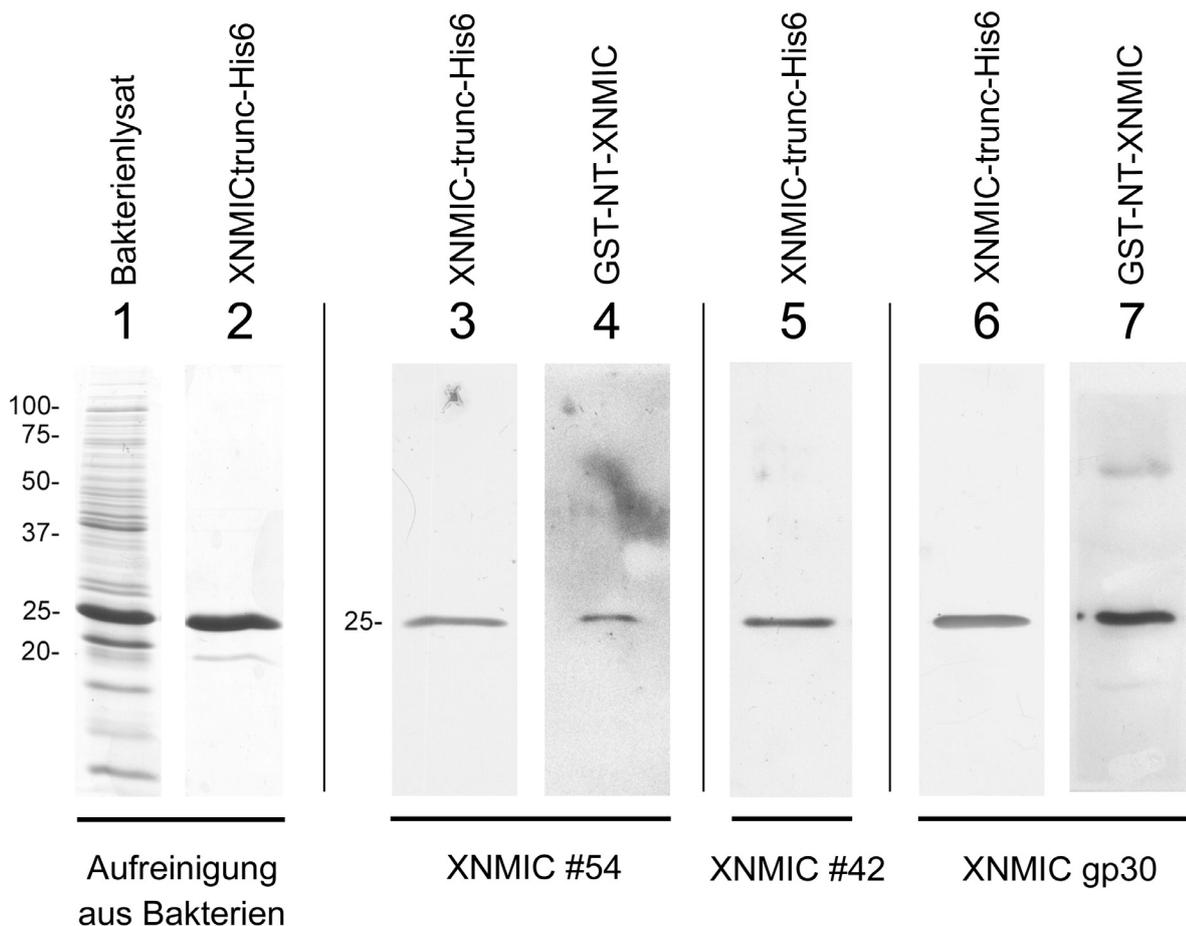


Abb. 4.3.9.: Monoklonale und polyklonale Antikörper gegen *Xenopus laevis*-Kernmyosin IC (XNMIC). Die generierten Antikörper erkennen rekombinantes XNMIC-trunc-His6.

Ein 25 kDa großes aminoterminales Teilstück des XNMIC mit einem His6-Tag wurde in Bakterien nach Induktion mit IPTG exprimiert (Spur 1), über eine Nickel-NTA-Agarosesäule aufgereinigt (XNMIC-trunc-His6; Spur 2) und zur Immunisierung von Mäusen verwandt. Die daraus resultierenden Hybridomazellen lieferten die monoklonalen Antikörper XNMIC #54 und XNMIC #42, die das XNMIC-trunc-His6 erkennen (Spur 3 und 5). Der Antikörper XNMIC #54 erkennt auch das Fusionsprotein aus GST und den aminoterminalen 16 Aminosäuren (GST-NT-XNMIC) (Spur 4).

Außerdem wurden polyklonale Antikörper generiert. Meerschweinchen wurden mit dem Peptid aus den aminoterminalen 16 Aminosäuren des XNMIC, gekoppelt an ein Zystein, immunisiert. Die polyklonalen Meerschweinchenantikörper (XNMIC gp30) erkennen sowohl das XNMIC-trunc-His6 (Spur 6) als auch das GST-NT-XNMIC (Spur 7).

Mit dem monoklonalen Antikörper XNMIC #42 konnte das 25 kDa große XNMIC-trunc-His6 detektiert werden (Abb. 4.3.9. Spur 5). Monoklonale Antikörper XNMIC #54 (Abb. 4.3.9. Spur 3 und 4) und polyklonale Antikörper XNMIC gp30 (Abb. 4.3.9. Spur 6 und 7) erkannten sowohl das verkürzte 25 kDa große XNMIC-trunc-His6 (Abb. 4.3.9. Spur 3 bzw. 6) als auch ein rekombinantes Fusionsprotein aus GST und den aminoterminalen 16 Aminosäuren des Kernmyosins (GST-NT-XNMIC) (Abb. 4.3.9. Spur 4 bzw. Spur 7). Somit liegt das Epitop, das von den monoklonalen Antikörpern XNMIC #54 oder von polyklonalen Antikörpern XNMIC gp30 erkannt wird, innerhalb

der 16 aminoterminalen Aminosäuren. Dagegen befindet sich das Epitop, an das der monoklonale Antikörper XNMIC #42 bindet, außerhalb des kernmyosinspezifischen Aminoterminus in der Kopfdomäne.

Die monoklonalen und polyklonalen Antikörper konnten nun für die Immunfluoreszenz in XTC-Zellen und auf Oozytengefrierschnitten eingesetzt werden. In der indirekten Immunfluoreszenz zum Nachweis des Kernmyosins IC mit dem monoklonalen Antikörper XNMIC #54 stellte sich in somatischen *Xenopus* XTC-Zellen eine Fluoreszenz im Zellkern dar (Abb. 4.3.10. a). Die Fluoreszenz im Kern zeigte dabei keine homogene, sondern eine punktuelle Verteilung. In einigen Zellen fielen außerdem einzelne Signale im Nukleolus auf. Während der Mitose schien das Kernmyosin IC nicht mit den Chromosomen zu assoziieren und sich nicht in der Teilungsfurche anzureichern (Abb. 4.3.10. b).

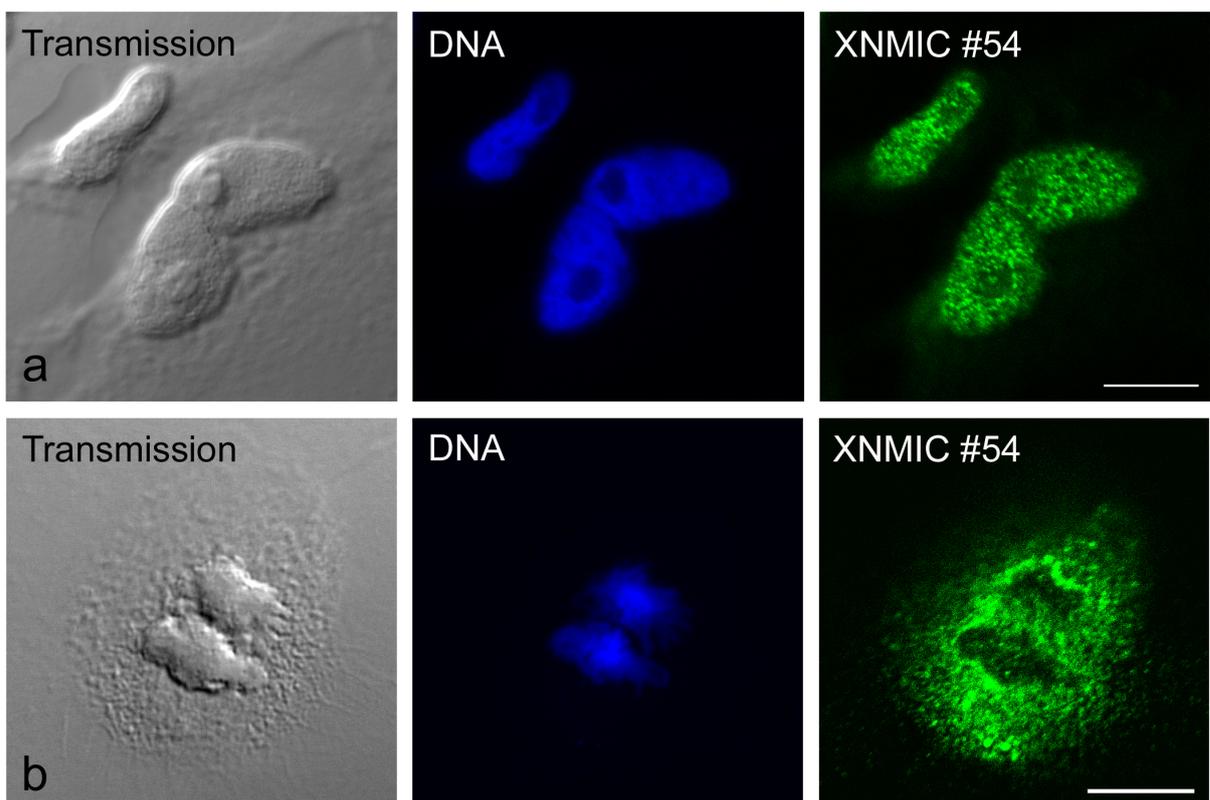


Abb. 4.3.10.: Lokalisation von *Xenopus*-Kernmyosin IC in somatischen XTC-Zellen mit dem monoklonalen Antikörper XNMIC #54.

Nach Fixierung von somatischen *Xenopus*-Zellen (XTC-Zelllinie) mit Paraformaldehyd wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit dem monoklonalen Antikörper XNMIC #54 durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit der konfokalen Laserscan-Mikroskopie analysiert. In a ist die punktförmige Färbung der Zellkerne dargestellt. Weiterhin konnten einzelne Signale im Nukleolus detektiert werden. In b ist eine Mitose abgebildet. Eichstrich 10 μm .

Auf Oozytengefrierschnitten zeigte sich eine schwache Färbung der Kernhülle (Abb. 4.3.10. a und b) und ein stärkeres Signal des Balbiani-Körpers (Abb. 4.3.11. b). Der Balbiani-Körper ist ein zytoplasmatisches Organell in prävitellogenen *Xenopus*-Oozyten, das neben Mitochondrien auch sogenannte Keimgranula und einige lokalisierte RNAs enthält (siehe auch 1.4.1.3.).

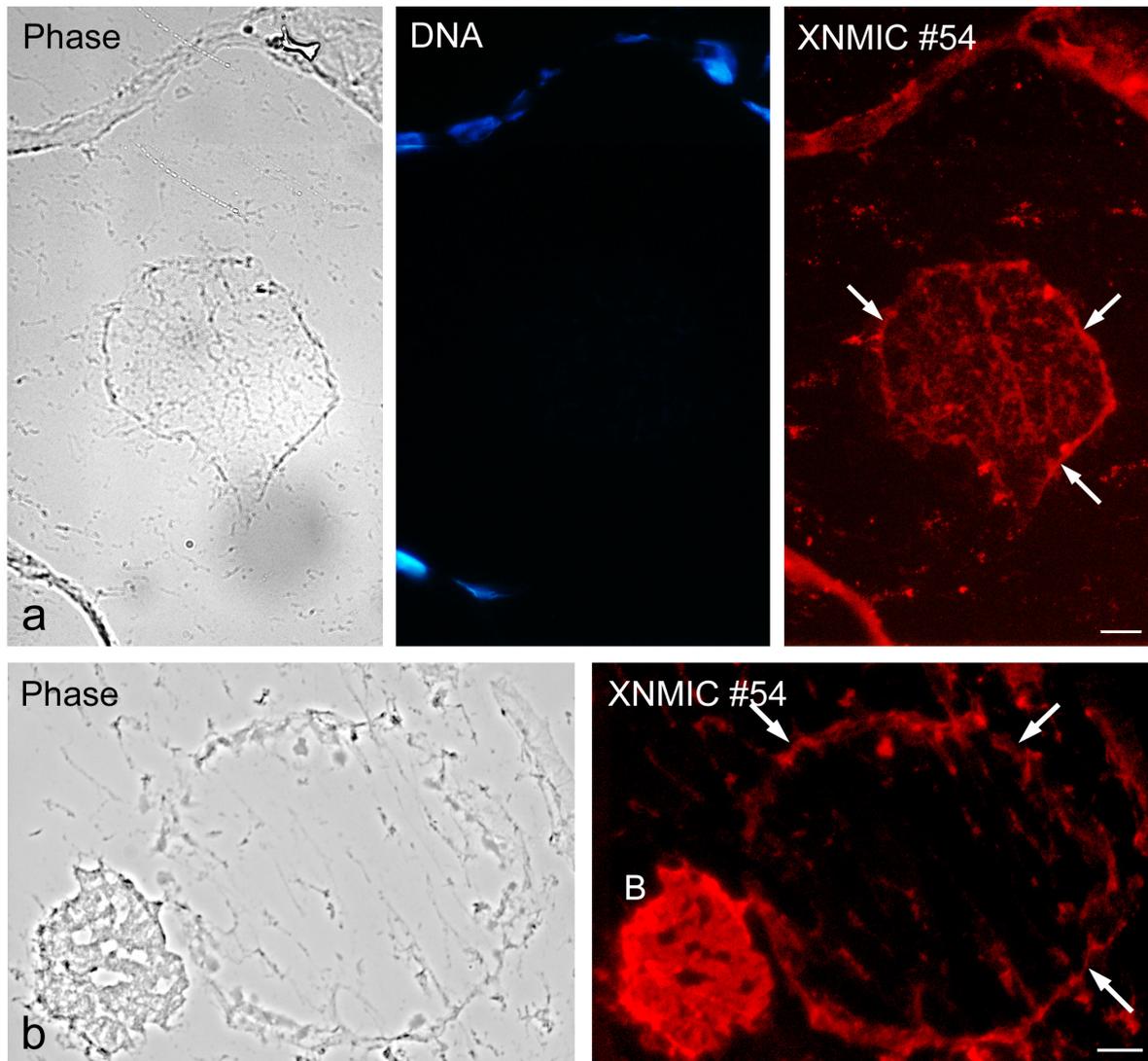


Abb. 4.3.11.: Lokalisation von *Xenopus*-Kernmyosin IC durch den monoklonalen Antikörper XNMIC #54 an der Kernhülle und im Balbiani-Körper auf Gefrierschnitten von *Xenopus*-Oozyten.

Von *Xenopus*-Ovar wurden Gefrierschnitte hergestellt und nach Acetonfixierung eine indirekte Immunfluoreszenz mit dem monoklonalen Antikörper XNMIC #54 durchgeführt. Es zeigte sich eine Fluoreszenz an der Kernhülle (Pfeile) und am Balbiani Körper (B). Eichstrich 10 μ m.

Da in Oozyten eine Lokalisation des Kernmyosins IC an der Kernhülle beobachtet werden konnte (Abb. 4.3.11.), sollte in somatischen Zellen die Lokalisation von Kernmyosin IC mit einem Nukleoporin getestet werden.

In somatischen *Xenopus*-Zellen wurde daher eine Doppelimmunfluoreszenz mit den Antikörpern gegen das Kernmyosin IC (XNMIC #54) und gegen das Nukleoporin Nup62 (gp62) durchgeführt. Mittels konfokaler Laserscan-Mikroskopie wurde das Fluoreszenzmuster analysiert. Es konnte nur eine diskrete partielle Kolokalisation von Kernmyosin IC und dem Nukleoporin Nup62 an der Kernhülle gesehen werden (Abb. 4.3.12.).

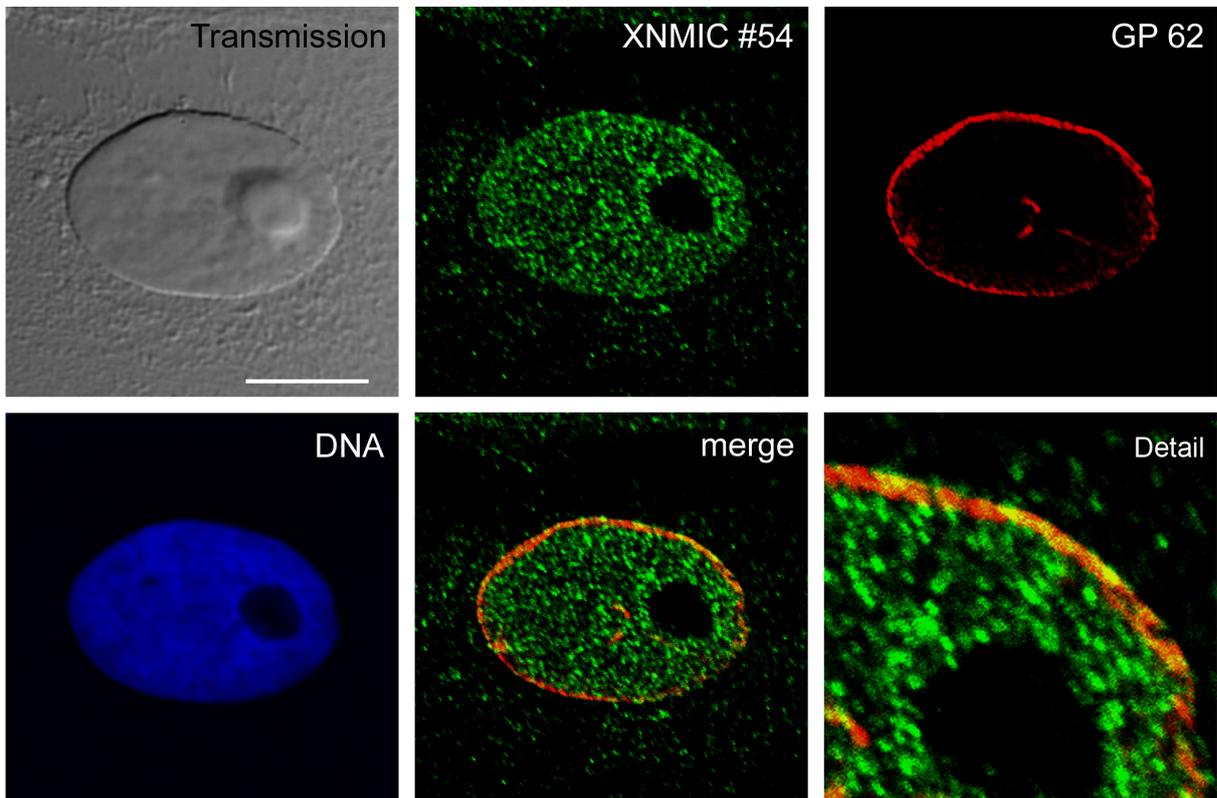


Abb. 4.3.12.: Lokalisation von *Xenopus*-Kernmyosin IC und dem Kernhüllenprotein Nup62 in somatischen XTC-Zellen.

An somatischen XTC-Zellen wurde nach Fixierung mit Paraformaldehyd eine Doppelimmunfluoreszenz mit dem Kernmyosin IC-Antikörper XNMIC #54 und dem Antikörper gp62 gegen das Nukleoporin Nup62 durchgeführt. Die Zellen wurden mithilfe der Laserscan-Mikroskopie analysiert. Das Kernmyosin IC ist in grün, das Nukleoporin Nup62 in rot dargestellt. Partiiell trat eine Kolokalisation der Proteine (gelb) an der Kernhülle auf. Eichstrich 10 μ m.

Die Immunfluoreszenz mit dem polyklonalen Antikörper XNMIC gp30 zeigte eine feinpunktige Anfärbung des Zellkerns (Abb. 4.3.13. a). Darüber hinaus wurden Zellen detektiert, die neben einer schwachen Kernfluoreszenz eine perinukleäre Anreicherung sowie eine Färbung der Zellperipherie aufwiesen (Abb. 4.3.13. b). Das Muster zeigte aber keine Filamentstruktur, sondern gestaltet sich ebenfalls punktförmig.

In der Mitose (Abb. 4.3.13. c) konnte unter Verwendung des Antikörpers XNMIC gp30 ebenfalls keine Anreicherung des Kernmyosins IC in der Teilungsfurche beobachtet werden. Der Antikörper erkannte auf Oozytenschnitten die Kernhülle und die mitochondriale Wolke (Abb.4.3.14.).

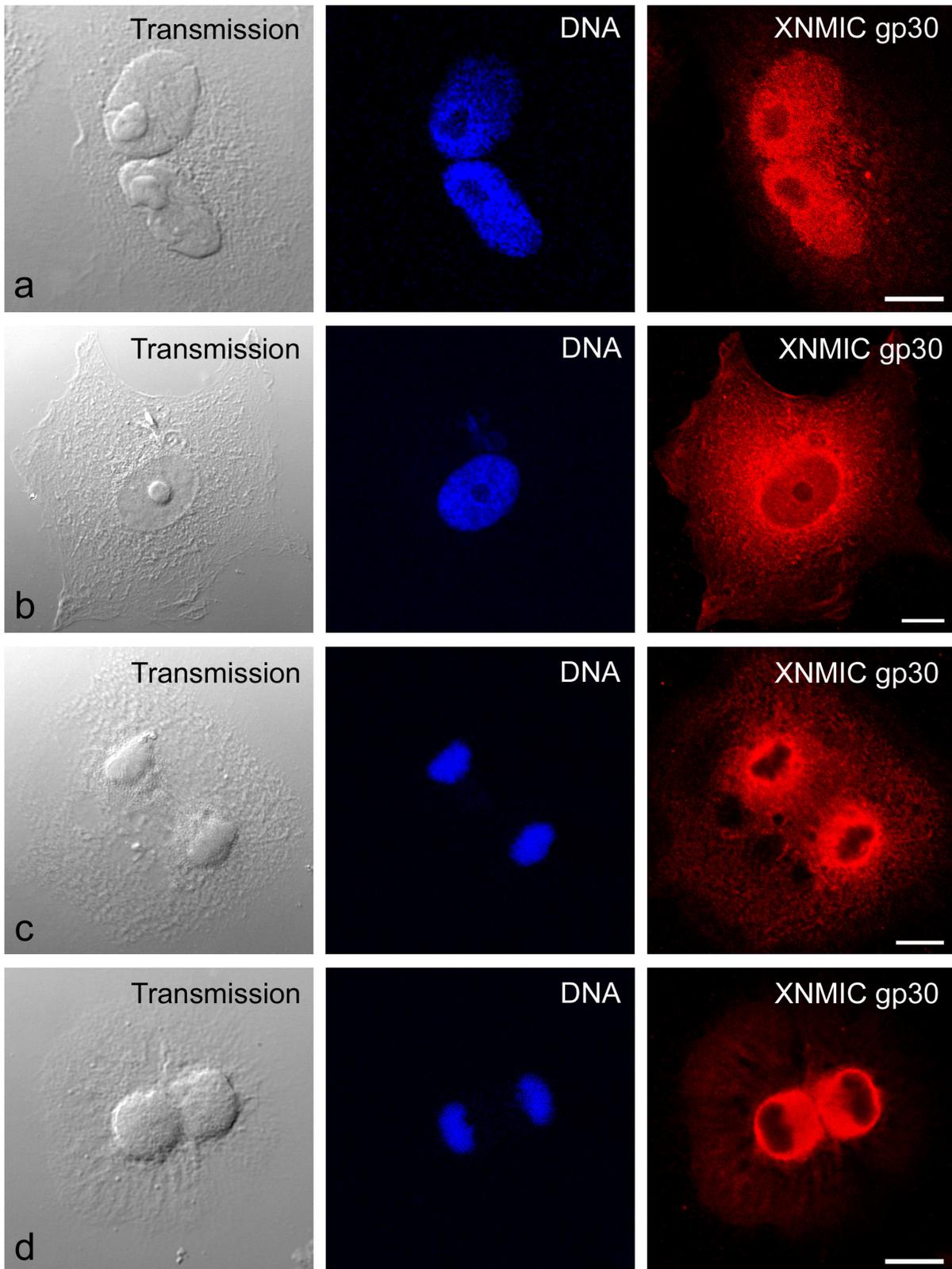


Abb. 4.3.13.: Lokalisation von *Xenopus*-Kernmyosin IC in somatischen XTC-Zellen mit dem polyklonalen Antikörper XNMIC gp30.

Somatische *Xenopus*-Zellen (XTC-Zelllinie) wurden mit Methanol/Aceton (a) oder Paraformaldehyd (b-c) fixiert und eine indirekte Immunfluoreszenz mit dem monoklonalen Antikörper XNMIC gp30 durchgeführt. In a ist die feinpunktige Färbung der Zellkerne in der konfokalen Lasescan-Mikroskopie zu sehen. In b ist eine Zelle zu sehen, die neben einer Kernfärbung eine perinukleäre Anreicherung und eine Darstellung des Proteins in der Zellperipherie zeigt. Das Muster ist aber nicht filamentös, sondern punktförmig. In Reihe c und d sind Mitosen zu sehen. Eichstrich 10 μ m.

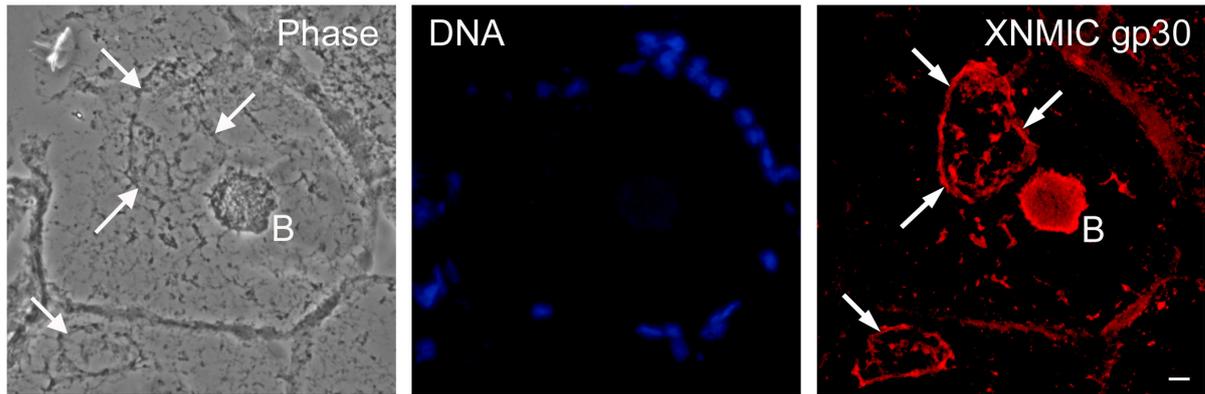


Abb. 4.3.14.: Lokalisation von *Xenopus*-Kernmyosin IC durch den polyklonalen Antikörper XNMIC gp30 an der Kernhülle und der mitochondrialen Wolke auf Gefrierschnitten von Oozyten.

Von *Xenopus*-Ovar wurden Gefrierschnitte hergestellt und nach Acetonfixierung eine indirekte Immunfluoreszenz mit XNMIC gp30 durchgeführt. Die Kernhülle ist mit Pfeilen, die mitochondriale Wolke, der so genannte Balbiani-Körper, mit einem B markiert. Eichstrich 10 μm

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Antikörpern XNMIC #54 und XNMIC gp30 erkennt der monoklonale Antikörper XNMIC #42 nicht den kernmyosinspezifischen Aminoterminus, sondern ein anderes Epitop im aminoterminalen Myosinkopf (siehe auch Abb. 4.3.9.). Die indirekte Immunfluoreszenz in somatischen Zellen ließ daher neben einer schwach ausgeprägten Kernfärbung vor allem eine filamentartige Fluoreszenz im Zytoplasma erkennen (Abb. 4.3.15.). Bei den Oozyten-Gefrierschnitten konnte die Kernhülle und ein kleiner Abschnitt der mitochondrialen Wolke dargestellt werden (Abb. 4.3.16.).

Wie in Abb. 4.3.2. zu erkennen, liegt im Myosinkopf unter anderem die konservierte ATP-Bindungsstelle. Aus dem Sequenzvergleich von Proteinen der Myosin I-Familie ist zu sehen, dass sich die einzelnen Isoformen wenig im Myosinkopf, jedoch stark in ihrer Schwanzdomäne unterscheiden (Abb. 5.8.). Zwar sind bei *Xenopus laevis* außer dem Myosin IC bislang noch keine weiteren Isoformen identifiziert, aufgrund des Fluoreszenzmusters muss aber davon ausgegangen werden, dass der Antikörper XNMIC #42 neben dem Kernmyosin IC weitere Myosine erkennen kann.

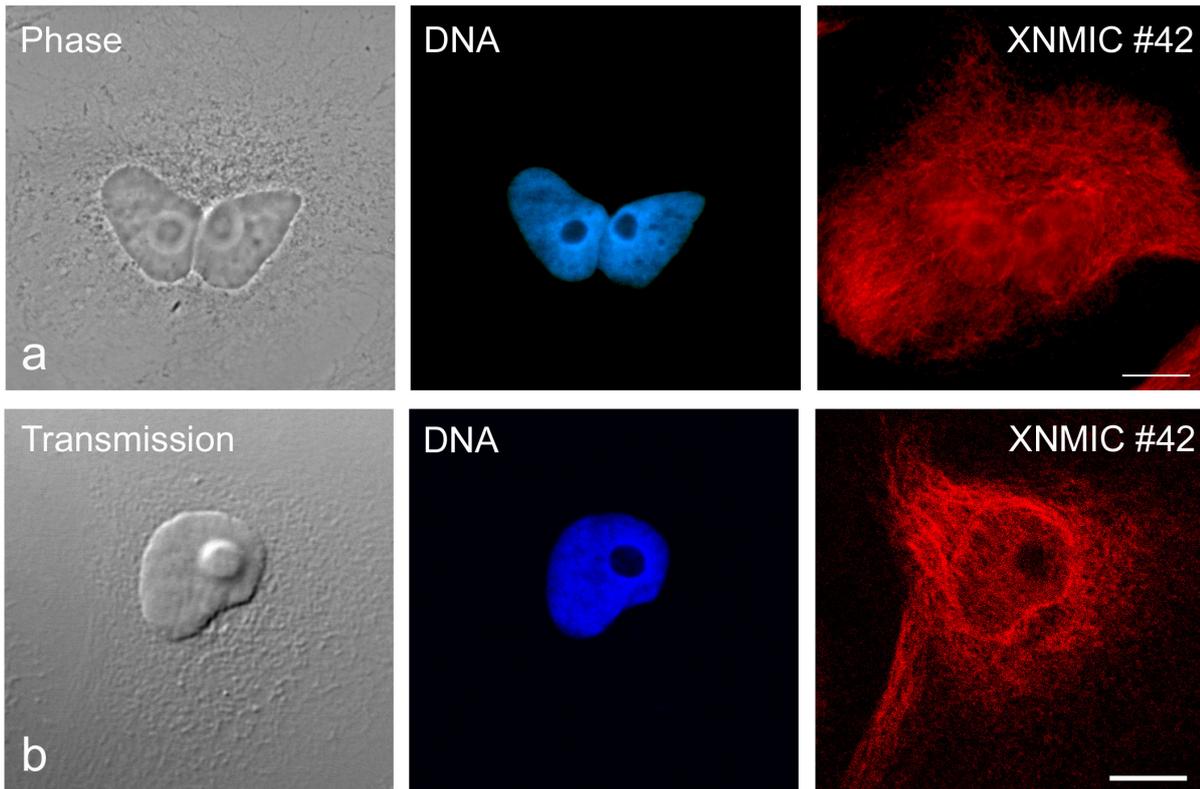


Abb. 4.3.15.: Lokalisation von *Xenopus*-Kernmyosin IC in somatischen XTC-Zellen mit dem monoklonalen Antikörper XNMIC #42.

Nach Fixierung von somatischen *Xenopus*-Zellen (XTC-Zelllinie) mit Paraformaldehyd wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit dem monoklonalen Antikörper XNMIC #42 durchgeführt. In a ist eine Zelle in der Fluoreszenzmikroskopie, in b bei Verwendung von konfokaler Laserscan-Mikroskopie gezeigt. Der Antikörper erkennt filamentäre Strukturen im Zytoplasma. Eichstrich 10 μm .

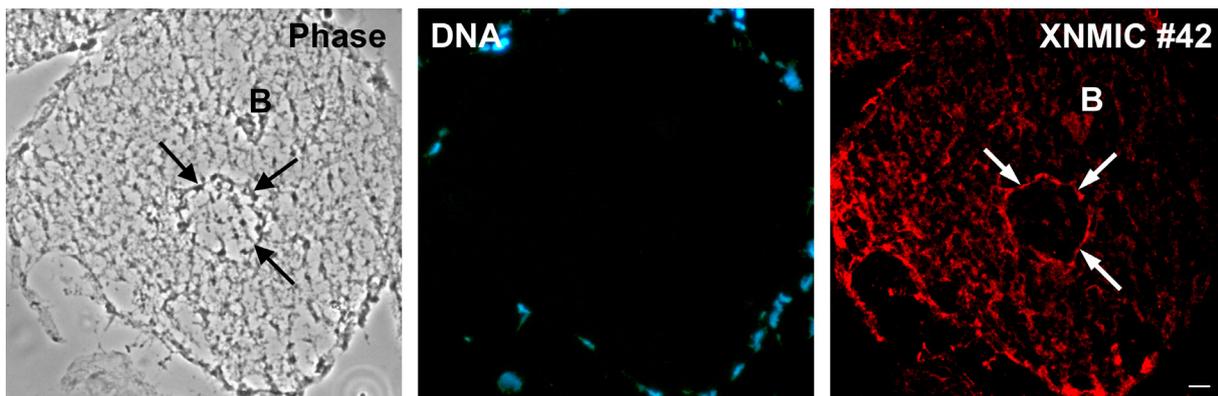


Abb. 4.3.16.: Lokalisation von *Xenopus*-Kernmyosin IC durch den monoklonalen Antikörper XNMIC #42 an der Kernhülle und der mitochondrialen Wolke auf Gefrierschnitten von Oozyten.

Von *Xenopus*-Ovar wurden Gefrierschnitte hergestellt und nach Paraformaldehydfixierung eine indirekte Immunfluoreszenz mit dem monoklonalen Antikörper XNMIC #42 durchgeführt. Die Kernhülle ist mit Pfeilen markiert, die mitochondriale Wolke, der so genannte Balbiani-Körper, mit einem B gekennzeichnet. Eichstrich 10 μm .

Aus der Immunfluoreszenz ergaben sich bereits Hinweise auf eine Lokalisation des *Xenopus*-Kernmyosins IC im Zellkern bzw. an der Kernhülle. Dies sollte nun mittels Immunblot verifiziert werden. Hierfür wurden manuell Zytoplasma, Zellkerne, Kernhülle und Kerninhalt aus *Xenopus*-Oozyten isoliert und die Proteine gefällt. Nach SDS-Gelelektrophorese wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Mit einer Immundetektion durch den polyklonalen Kernmyosin-Antikörper wurde sowohl in der Kernfraktion als auch in der Kernhüllen- und Nukleoplasmafraktion ein etwa 120 kDa großes Protein detektiert (Abb. 4.3.17.).

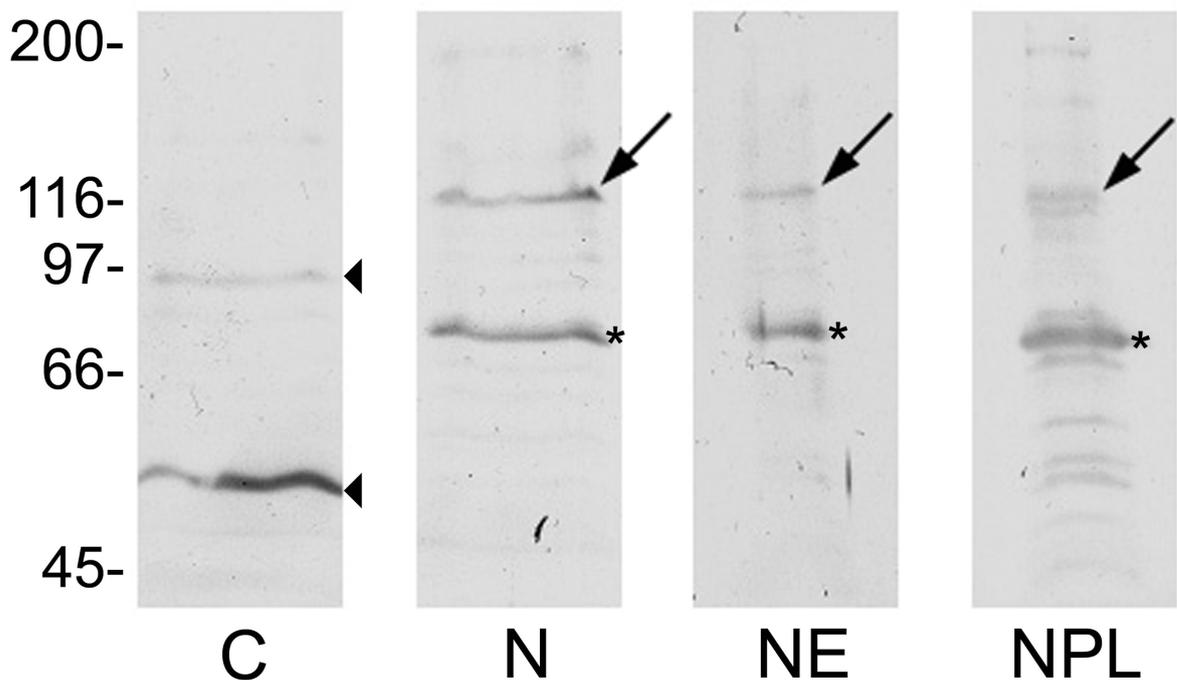


Abb. 4.3.17.: Der polyklonale Kernmyosin-Antikörper XNMIC gp30 erkennt ein 120 kDa großes Protein in der Kern-, Kernhüllen- und Kerninhaltfraktion.

Manuell defollikulierte Oozyten wurden in einzelne Fraktionen getrennt (C: Zytoplasma; N: Kerne; NE: Kernhüllen; NPL: Kerninhalt). Nach Fällung der Proteine erfolgten die Proteingelelektrophorese und der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran. Die Membran wurde mit dem polyklonalen Kernmyosin-Antikörper XNMIC gp30 inkubiert. In der Kern-, der Kernhüllen und der Kerninhaltfraktion wurde das Kernmyosin IC als ein etwa 120 kDa großes Protein erkannt. Die Bande bei etwa 80 kDa (*) stellt vermutlich ein Degradationsprodukt dar. Im Zytoplasma wurden weitere Proteine erkannt (□). Der Molekulargewichtsmarker ist am linken Rand in kDa angegeben.

Nachdem nun sowohl in der Immunfluoreszenz als auch im Immunblot Kernmyosin an der Kernhülle detektiert werden konnte, interessierte die genaue Lokalisation von Kernmyosin IC an der Kernhülle. Zu diesem Zweck wurden manuell isolierte Kernhüllen von *Xenopus*-Oozyten vor der Einbettung in Epon mit dem monoklonalen Kernmyosin-Antikörper XNMIC #54 und einem goldgekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Elektronenmikroskopisch konnte so Kernmyosin IC an den nukleozytoplasmatischen Filamenten der Kernporenkomplexe nachgewiesen werden (Abb. 4.3.18.).

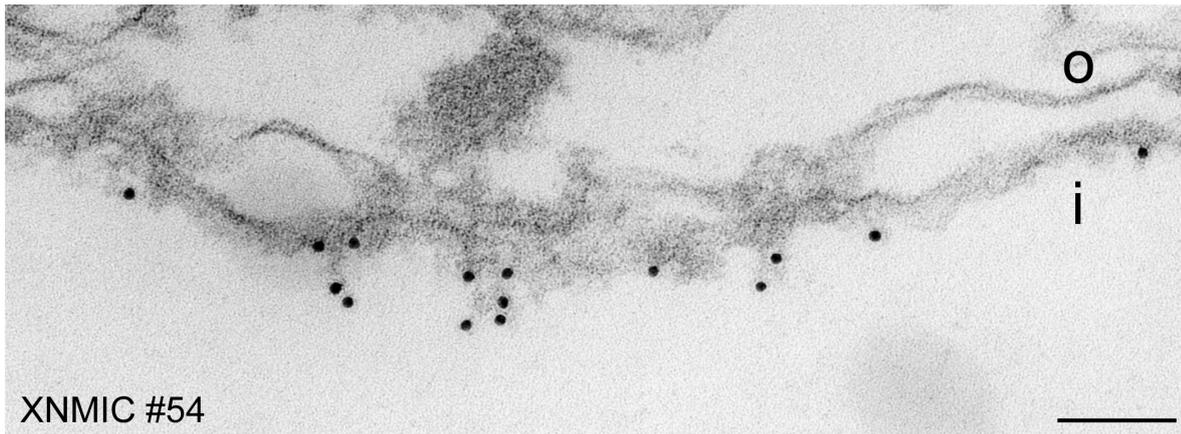


Abb. 4.3.18.: *Xenopus laevis*-Kernmyosin IC ist an den nukleoplasmatischen Filamenten der Kernporenkomplexe lokalisiert.

Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt einen Querschnitt durch eine handisolierte Kernhülle einer *Xenopus*-Oozyte. Die Kernhülle wurde vor der Einbettung in Epon mit dem Kernmyosin-Antikörper XNMIC #54 inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ein an 12 nm-Kolloidgold gekoppelter Antikörper verwendet. Das Kernmyosin IC lokalisiert an den nukleoplasmatischen Filamenten der Kernporenkomplexe. o: äußere Kernhüllenmembran; i: innere Kernhüllenmembran. Eichstrich 100 nm.

4.3.4. Kernmyosin ist an Exportprozessen beteiligt

Es wurde bereits gezeigt, dass auch Kernaktin an den nukleoplasmatischen Filamenten der Kernporenkomplexe lokalisiert ist. Des Weiteren war Aktin als essentielle Komponente an diversen Exportprozessen beteiligt (Hofmann et al., 2001). Kernmyosin konnte bei *Xenopus laevis* ebenfalls an der Kernhülle, und zwar an den nukleozytoplasmatischen Filamenten, dargestellt werden (siehe Abb. 4.3.18.). Deshalb sollte nun die Beteiligung des Kernmyosins an Exportprozessen untersucht werden. Hierzu wurden Mikroinjektionsversuche in *Xenopus*-Oozyten durchgeführt. Ein Ouchterlony-Test erbrachte für die monoklonalen Antikörper XNMIC #54 und #42 die Antikörpersubklasse IgM. Zunächst wurden die monoklonalen Kernmyosin-Antikörper XNMIC #54 und #42 oder eine Isotypkontrolle mit unspezifischen IgM-Antikörpern in manuell defollikulierte Oozyten vorinjiziert. Nach einer Stunde wurde das Fusionsprotein GST-TFIIIA-NES injiziert.

Aufgrund des leucinreichen Kernexportsignals wird das Fusionsprotein GST-TFIIIA-NES CRM1-vermittelt exportiert (siehe 4.2.2.). Während IgM-Antikörper und der Kernmyosin-Antikörper gegen den spezifischen Aminoterminus (XNMIC #54) den nukleozytoplasmatischen Export von GST-TFIIIA-NES nicht verhindern konnten, inhibierten Antikörper gegen die aminoterminalen Kopfdomäne (XNMIC #42) den Export dieses Fusionsproteins in das Zytoplasma.

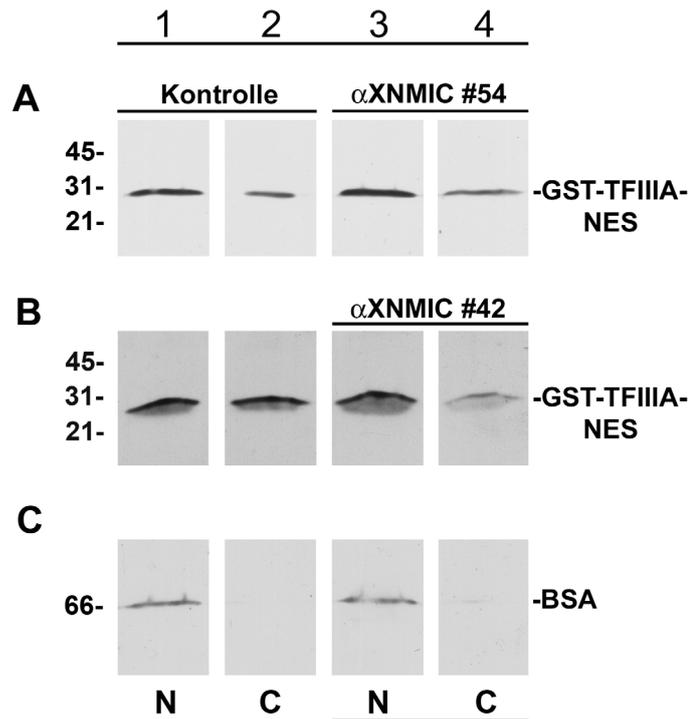


Abb. 4.3.19.: Der Export von rekombinantem GST-TFIIIA-NES ist durch den Myosinantikörper XNMIC #42, nicht aber durch den Antikörper XNMIC #54 hemmbar.

Manuell defollikulierte *Xenopus*-Oozyten wurden mit 0,07 mg Myosinantikörper XNMIC #54 (Spur A3 und A4) und XNMIC #42 (Spur B3 und B4) oder Isotypkontrollantikörper (Spuren A1, A2, B1 und B2) vorinjiziert. Nach einer Stunde wurde GST-TFIIIA-NES zusammen mit Dextranblau und BSA zur Injektionskontrolle injiziert und nach weiteren 15 Stunden die Kern- und Zytoplasmafraktion isoliert, die Proteine gefällt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und ein Immunblot mit GST-Antikörpern (A und B) und BSA-Antikörpern (C) durchgeführt. Der Export von GST-TFIIIA-NES konnte durch den Myosinantikörper XNMIC #54 nicht gehemmt werden (A3 und A4). Die Mikroinjektion des Myosinantikörpers XNMIC #42 führte jedoch zu einer Retention von GST-TFIIIA-NES im Zellkern (B3 und B4). N: Kernfraktion; C: Zytoplasmafraktion. Die Molekulargewichtsmarker sind am linken Rand in kDa angegeben.

4.3.5. Kernmyosin ist bei der Transkription beteiligt

Kernmyosin IC konnte sowohl in der Immunfluoreszenz als auch im Immunblot im Nukleoplasma detektiert werden. Kurz nach der Entdeckung des Kernmyosin IC (Nowak et al., 1997) wurde bereits eine Beteiligung des Kernmyosins bei Transkriptionsprozessen angenommen (Pestic-Dragovich et al., 2000). Kernmyosin IC kolokalisierte in somatischen Zellen in Immunfluoreszenzexperimenten mit der RNA-Polymerase II und ließ sich durch Immunpräzipitation zusammen mit der großen Untereinheit der RNA-Polymerase II aus Zellkernen aufreinen. Des Weiteren konnten Kernmyosin-Antikörper die *in-vitro*-Transkription (Pestic-Dragovich et al., 2000). Daher sollte im *Xenopus*-System ebenfalls die Rolle des Kernmyosin IC analysiert werden, da mit den amplifizierten Nukleolen und den Lampenbürstenchromosomen in die Transkription *Xenopus*-Oozyten gut abzubilden ist.

4.3.5.1. Kernmyosin IC ist an der RNA-Polymerase I-abhängigen Transkription im Nukleolus beteiligt

Die RNA-Polymerase I-abhängige Transkription sowie der Zusammenbau der Ribosomenuntereinheiten findet im Nukleolus statt. Kernmyosin IC konnte in der Immunfluoreszenz im Nukleolus somatischer Zellen beobachtet werden (Abb.4.3.10.). Daher sollte nun zunächst an somatischen Zellen versucht werden, das Kernmyosin innerhalb des Nukleolus durch Immunfluoreszenz genauer zu lokalisieren.

Der Nukleolus besteht aus dem fibrillären Zentrum (FC), der dichten fibrillären Komponente (DFC) und der granulären Komponente (GC). RNA-Polymerase I kann im FC, Fibrillarin im DFC nachgewiesen werden. Kernmyosin IC kolokalisiert partiell mit der RNA-Polymerase I im Nukleolus (Abb. 4.3.20. a).

Actinomycin D blockiert die Transkription, indem es an die DNA bindet. Diese Transkriptionshemmung äußert sich in Umbauprozessen, die zu einer Segregation von FC, DFC und GC in drei Domänen führen, die viele ihrer originären Proteine und RNA-Komponenten beinhalten (Shav-Tal et al., 2005). Nach Transkriptionshemmung mit Actinomycin D (AMD) segregierte Kernmyosin partiell zusammen mit der Polymerase I (Abb. 4.3.20. b und c).

Eine Kolokalisation von Kernmyosin IC mit Fibrillarin konnte nicht beobachtet werden (Abb. 4.3.20. d und e).

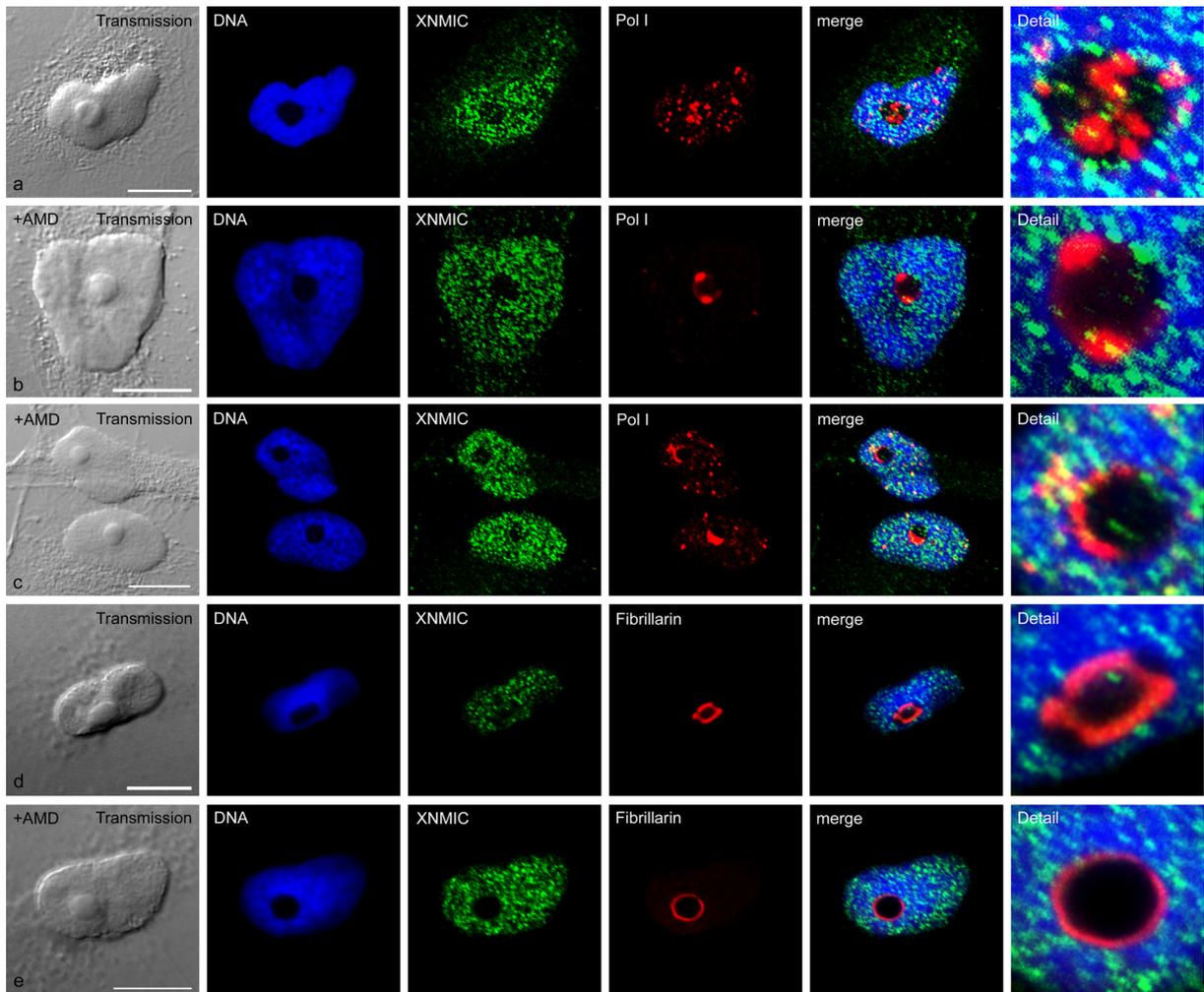


Abb. 4.3.20.: Doppelimmunfluoreszenz von *Xenopus*-Kernmyosin IC und nukleolären Proteinen in somatischen XTC-Zellen. Die RNA-Polymerase I kolokalisiert partiell im Nukleolus mit Kernmyosin.

Nach Fixierung von somatischen *Xenopus*-Zellen (XTC-Zelllinie) mit Paraformaldehyd wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit dem monoklonalen Antikörper XNMIC #54 und Antikörpern gegen RNA-Polymerase I (FC) (a, b und c) oder Fibrillarin (DFC)(d und e) durchgeführt. Ein Teil der Zellen wurde mit Actinomycin D (AMD) vorbehandelt (b, d und e). Kernmyosin IC ist in grün, RNA-Polymerase I und Fibrillarin sind in rot dargestellt. Bei Kolokalisation ergibt sich eine gelbe Farbe. RNA-Polymerase I kolokalisiert mit und ohne AMD-Behandlung partiell mit Kernmyosin IC im Nukleolus (a, b und c). Fibrillarin dagegen lokalisiert nicht mit Kernmyosin IC im Nucleolus (d und e). Die Aufnahmen wurden mit konfokaler Laserscan-Mikroskopie angefertigt. Eichstrich 10 μm .

Bestimmte RNA-Polymeraseuntereinheiten und manche Bestandteile der Transkriptionsmaschinerie bleiben auch während der Mitose mit den Nukleolus-Organisator-Regionen (NORs) assoziiert (Olson und Dundr, 2005). Die Verteilung von RNA-Polymerase I und Kernmyosin IC wurde daher in mitotischen *Xenopus*-Zellen untersucht. Während RNA-Polymerase I in vier Regionen, entsprechend den vier NORs der *Xenopus*-Zellen, nachgewiesen werden konnte, wurde im Gegensatz dazu Kernmyosin IC nicht in diesen Regionen NORs beobachtet (Abb. 4.3.21.).

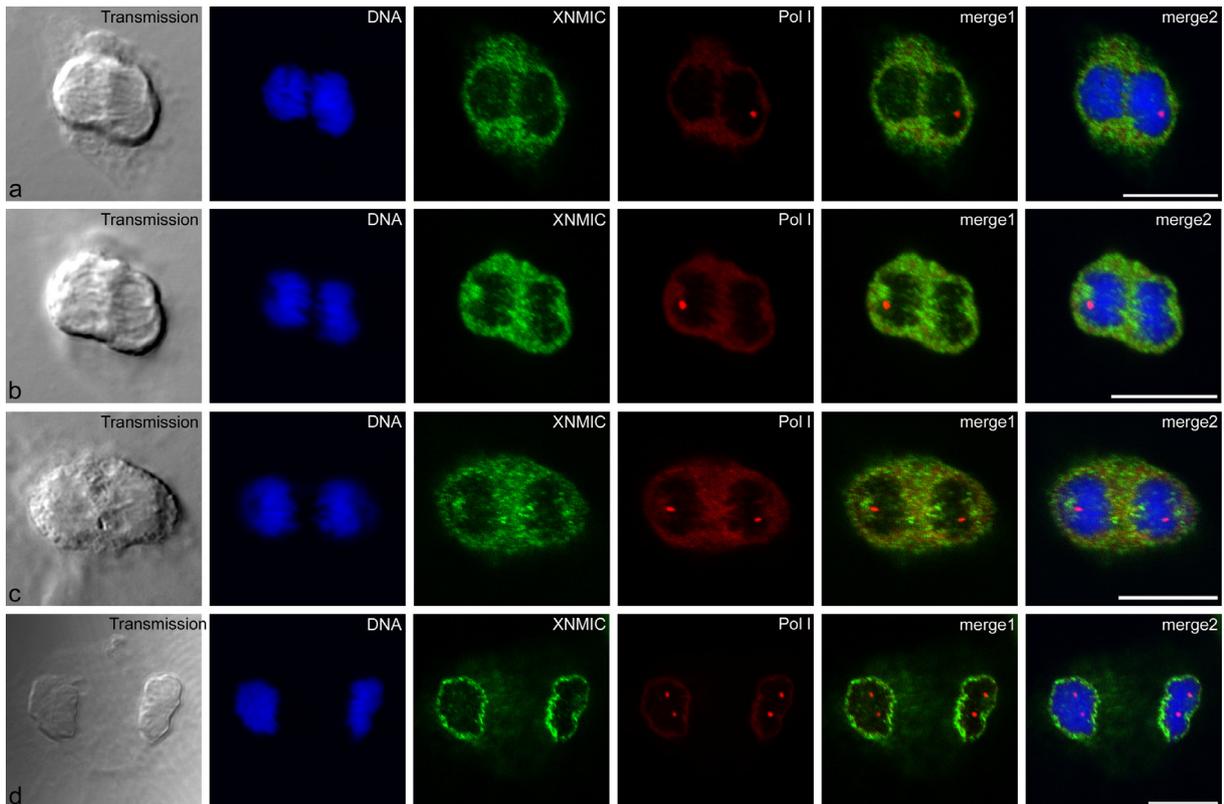


Abb. 4.3.21.: Doppelimmunfluoreszenz von *Xenopus*-Kernmyosin IC und RNA-Polymerase I in Mitosezellen. Kernmyosin ist während der Mitose nicht mit Nukleolus-Organisator-Regionen assoziiert. Nach Fixierung von somatischen *Xenopus*-Zellen (XTC-Zelllinie) mit Paraformaldehyd wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit dem monoklonalen Antikörper XNMIC #54 und Antikörpern gegen RNA-Polymerase I (a bis d) durchgeführt. Kernmyosin IC ist in grün, RNA-Polymerase I in rot dargestellt. Bei Kolo-kalisation ergäbe sich eine gelbe Farbe. Die Aufnahmen wurden mit konfokaler Laserscan-Mikroskopie angefertigt. Eichstrich 10 μ m.

Die amplifizierte Nukleolen der *Xenopus*-Oozyten zeichnen sich in ihrer Größe, dem hohen rDNA-Gehalt und ihrer hohen transkriptionellen Aktivität aus. Die Struktur ist dennoch vergleichbar mit der Struktur somatischer Nukleolen (Mais und Scheer, 2001). Nach Spreitung des Kerninhalts von Oozyten sind zahlreiche amplifizierte Nukleolen mit einer so genannten Halskettenstruktur zu sehen, die in den Kortex eingebettet ist (siehe auch 1.4.1.2.). Nachdem Kernmyosin IC in den Nukleolen somatischer Zellen detektiert werden konnte, wurde nun die Lokalisation von Kernmyosin IC in amplifizierten Nukleolen untersucht. Kernmyosin IC befand sich in den amplifizierten Nukleolen hauptsächlich in der Kernregion, wenngleich es geringfügig auch im Kortex nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.3.22. a bis c). Kernmyosin IC zeigte in der Kernregion eine Kolo-kalisation sowohl mit der RNA-Polymerase I (Abb. 4.3.22. a), den durch Bromuridintriphosphat gekennzeichneten naszierenden Transkripten (Abb. 4.3.22. b) als auch mit Fibrillarin (Abb. 4.3.22. c). Kernmyosin scheint sich sowohl im FC als auch im DFC zu befinden.

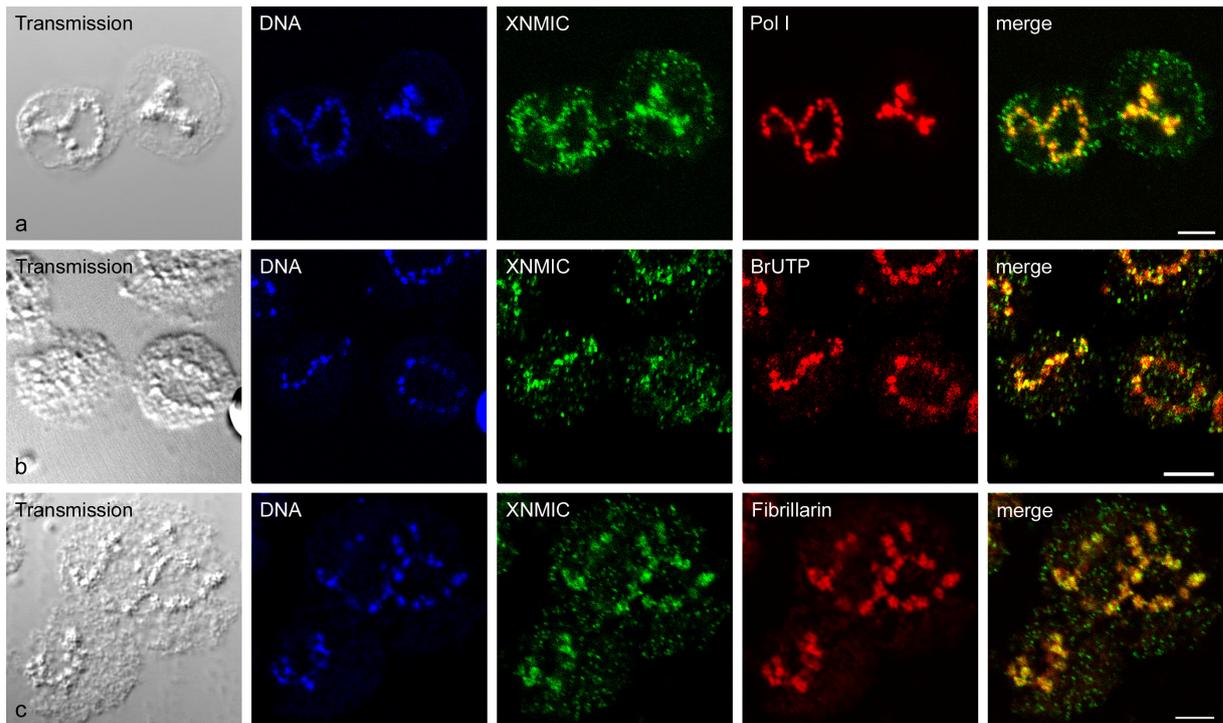


Abb. 4.3.22.: Doppelimmunfluoreszenz von *Xenopus*-Kernmyosin IC und nukleolären Proteinen in amplifizierten Nucleolen. Kernmyosin kolokalisiert partiell mit RNA-Polymerase I, BrUTP-Einbau und Fibrillarin.

Aus manuell defollikulierten Oozyten wurden die Zellkerne gewonnen und der Kerninhalt gespreitet. Nach Fixierung mit Paraformaldehyd wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit dem monoklonalen Antikörper XNMIC #54 und Antikörpern gegen RNA-Polymerase I (a) oder Fibrillarin (c) durchgeführt. Ein Teil der Oozyten wurde mit Bromuridintriphosphat (BrUTP) mikroinjiziert. Nach Spreitung des Kerninhaltes wurden die Zellen fixiert und Kernmyosin und BrUTP nachgewiesen (b). Kernmyosin IC (a bis c) ist in grün, RNA-Polymerase I (a), BrUTP (b) und Fibrillarin (c) sind in rot dargestellt. In der Transmissionsaufnahme (a bis c) sind Nucleolen mit der typischen halskettenartigen Darstellung der Kernregion (FC und DFC) zu sehen, die in den Kortex (GC) eingebettet ist. Die Kolokalisation von Kernmyosin IC mit RNA-Polymerase I, BrUTP-Einbau in naszierende Transkripte und Fibrillarin zeigte sich als gelbe Farbe. Die Aufnahmen wurden mit konfokaler Laserscan-Mikroskopie angefertigt. Eichstrich 5 μm .

Da die Transkriptionshemmung mit Actinomycin D Umbauprozesse verursacht, die zu einer Segregation von FC, DFC und GC in drei Domänen führen, die viele ihrer originären Proteine und RNA-Komponenten beinhalten (Shav-Tal et al., 2005), war von Interesse, in welches Kompartiment Kernmyosin umgelagert wird. Hierzu wurden Oozyten mit Actinomycin D inkubiert und anschließend die Nucleolen dieser Oozyten präpariert. Mittels Immunfluoreszenz wurden Kernmyosin IC, RNA-Polymerase I und Fibrillarin dargestellt. Hier zeigte sich eine Umverteilung von Kernmyosin IC mit der RNA-Polymerase I und der rDNA (Abb. 4.3.23.).

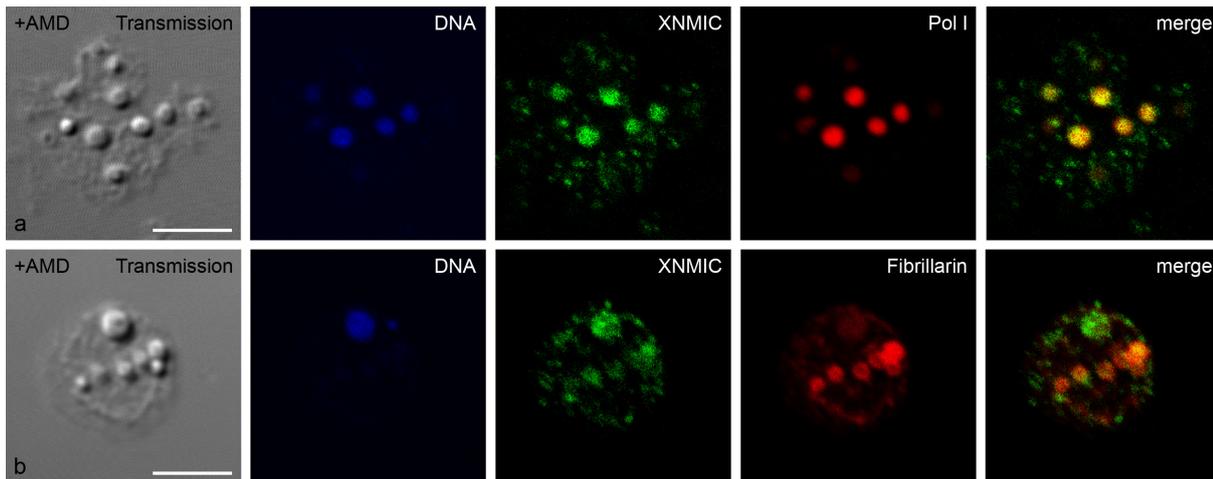


Abb. 4.3.23.: Doppelimmunfluoreszenz von Kernmyosin IC und nukleolären Proteinen in Actinomycin D-behandelten amplifizierten Nucleolen. Kernmyosin kolokalisiert mit der DNA und der RNA-Polymerase I nach Transkriptionshemmung.

Manuell defolikulierte Oozyten wurden für zwei Stunden mit Actinomycin D (AMD) inkubiert. Anschließend wurden die Zellkerne gewonnen und der Kerninhalt gespreitet. Nach Fixierung mit Paraformaldehyd wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit dem monoklonalen Antikörper XNMIC #54 und Antikörpern gegen RNA-Polymerase I (a) oder Fibrillarin (b) durchgeführt. Kernmyosin IC (a und b) ist in grün, RNA-Polymerase I (a) und Fibrillarin (c) sind in rot dargestellt. Die DNA ist mit Hoechst (blau) gefärbt. Bei Kolokalisation ergab sich eine gelbe Farbe. Nach Transkriptionshemmung mit AMD kolokalisiert Kernmyosin IC mit der RNA-Polymerase I und der DNA. Die Aufnahmen wurden mit konfokaler Laserscan-Mikroskopie angefertigt. Eichstrich 5 μm .

Die räumliche Nähe zur Transkriptionsmaschinerie warf nun die Frage auf, welche Auswirkung die Depletion des Kernmyosin IC auf die Transkription und die Architektur des Nucleolus zeigt. Die Injektion von Kernmyosin-Antikörper sollte hierüber Aufschluss geben. Amplifizierte Nucleolen, die nach Injektion von unspezifischen Isotypantikörpern präpariert wurden (Abb. 4.3.24. a und Abb. 4.3.25. a), zeigten wie Nucleolen aus unbehandelten Oozyten (Abb. 4.3.22. und 4.3.26. a) die typische Kern- und Kortextstruktur. Fibrillarin (DFC) war um die rDNA (FC) lokalisiert und in den Kortext (GC) eingebettet.

Zum Vergleich wurde eine Transkriptionshemmung mit Actinomycin D durchgeführt (Abb. 4.3.24. e und Abb. 4.3.26. b und c). Zu sehen war hier eine Segregation, wobei die so genannte FC-haltige Kappe die rDNA und die DFC-haltige Kappe das Protein Fibrillarin enthielt. Teilweise konnte auch der GC-Körper dargestellt werden (Abb. 4.3.24. e und Abb. 4.3.26. b). Die Inhibition der Transkription spiegelte sich im fehlenden Bromuridintriphosphat (BrUTP)-Einbau wider (Abb. 4.3.26. c).

Die Injektion der Kernmyosin IC-Antikörper XNMIC #54 (Abb. 4.3.24. b, c und Abb. 4.3.25. b, c) und #42 (Abb. 4.3.24. d und Abb. 4.3.25. d und e) verursachte einen massiven Umbau der Nukleolen. Die Architektur der Nukleolen ähnelte jedoch nur teilweise der von actinomycinbehandelten Nukleolen. Während die DFCs kondensiert wirkten, erschienen die FC-Regionen oftmals noch aufgelockert (Abb. 4.3.24. und 4.3.25. jeweils b, c und d) und umgaben die DFCs teilweise ringförmig (Abb. 4.3.24. b und d [rechter Nukleolus] und Abb. 4.3.25. b und d). Einige Nukleolen erinnerten jedoch an die Segregation transkriptionsgehemmter Nukleolen (Abb. 4.3.24. c und 4.3.25. c und e). Aufgefallen war außerdem ein Ablösen des GC, das bei einigen Nukleolen beobachtet werden konnte (Abb. 4.3.24. c).

Um sicherzugehen, dass es sich hierbei tatsächlich um eine sich ablösende GC-Region handelt, wurde das nukleoläre Protein B23 fluoreszenzmikroskopisch dargestellt. B23 fungiert als Markerprotein für das granuläre Zentrum (GC). Vor der immunfluoreszenzmikroskopischen Darstellung von B23 in amplifizierten Nukleolen wurden die Antikörper bei somatischen A6- und XTC-Zellen getestet. In Abb. 4.3.27. a und c ist die Verteilung von B23 in den somatischen Nukleolen gezeigt. Nach Transkriptionshemmung durch Actinomycin D kam es zur Umverteilung des Proteins B23 (Abb. 4.3.27. b und d).

Anschließend wurde die Immunfluoreszenz bei amplifizierten Nukleolen durchgeführt. Hierfür wurden Nukleolen aus Kontrolloozyten und mit Kernmyosin-Antikörpern injizierten Oozyten isoliert. Die GC-Region wurde durch den Nachweis des Markerproteins B23 markiert. In der Tat fanden sich Nukleolen, die einen schmalen GC-Saum aufwiesen (Abb. 4.3.28. b und c). Wie in Abb. 4.3.28. c zu sehen, löste sich dieser gerade von dem abgebildeten Nukleolus ab.

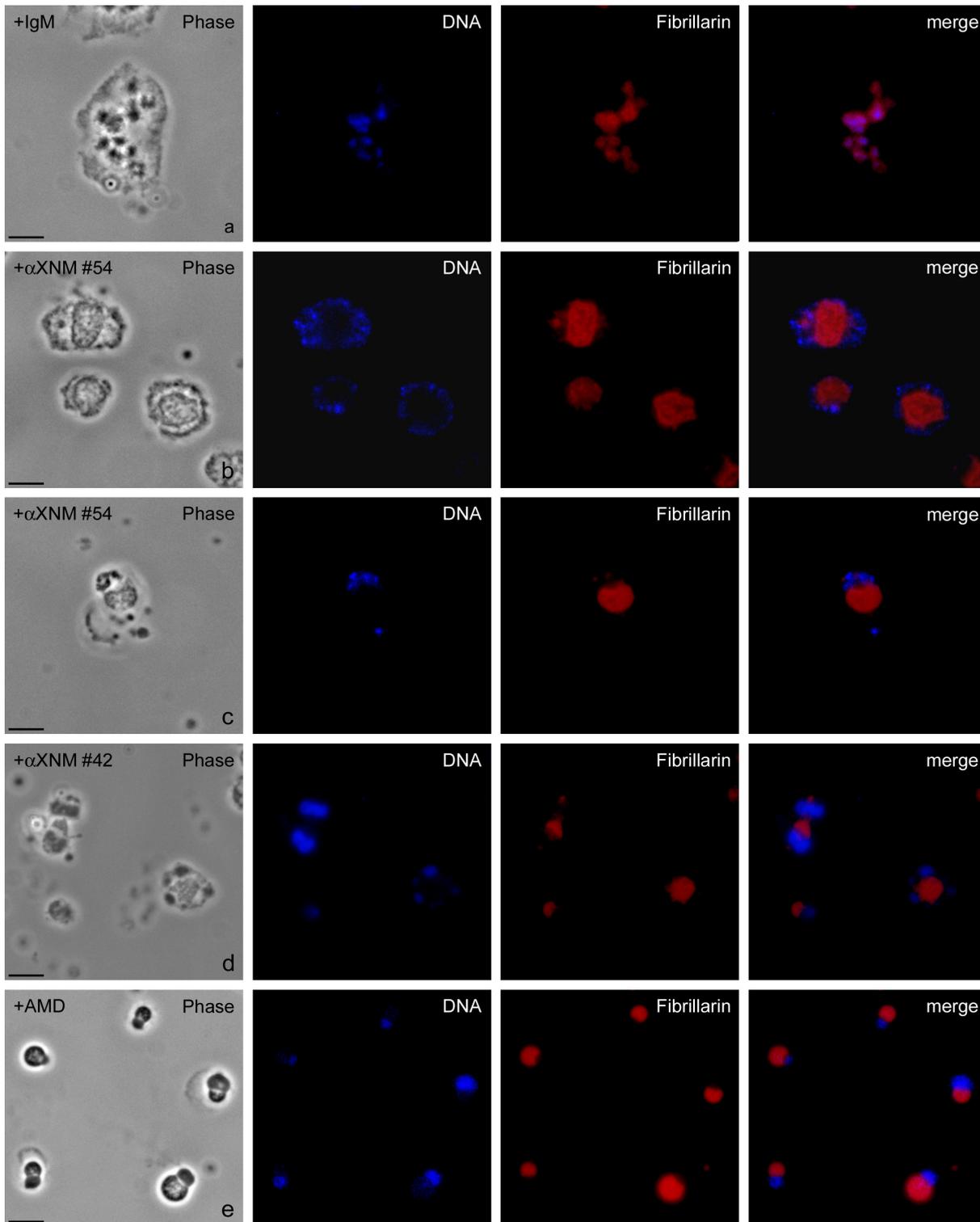


Abb. 4.3.24.: Die Mikroinjektion von Kernmyosin-IC-Antikörpern führte zu massivem Umbau der amplifizierten Nukleolen. Manuell defollikulierte *Xenopus*-Oozyten wurden mit den Antikörpern XNMIC #54 (b und c) und #42 (d) oder Isotypkontrollantikörper (a) injiziert. Nach drei Stunden wurden die Zellkerne gewonnen und der Kerninhalt gespreitet. Ein Teil der Zellen wurde nicht injiziert, sondern mit Actinomycin D (AMD) (e) zur Hemmung der Transkription und der daraus resultierenden Segregation der Nukleolen inkubiert. Nach Fixierung mit Paraformaldehyd wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit Fibrillarantikörpern durchgeführt. Der Kontrollnukleolus (a) zeigt das typische Bild mit Kernregion (FC und DFC) und Kortex (GC). Fibrillar (DFC) lokalisiert um die DNA (FC). Nach Transkriptionshemmung durch AMD (e) kam es zur Segregation. Zu sehen ist in der Phasenaufnahme das FC (DNA), die DFC (Fibrillar) und bei zwei Nukleolen auch die GC. Die Kernmyosindepletion führte bei zu massivem Umbau der Nukleolen. Die Aufnahmen zeigen Phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopische Ansichten. Eichstrich 5 μm .

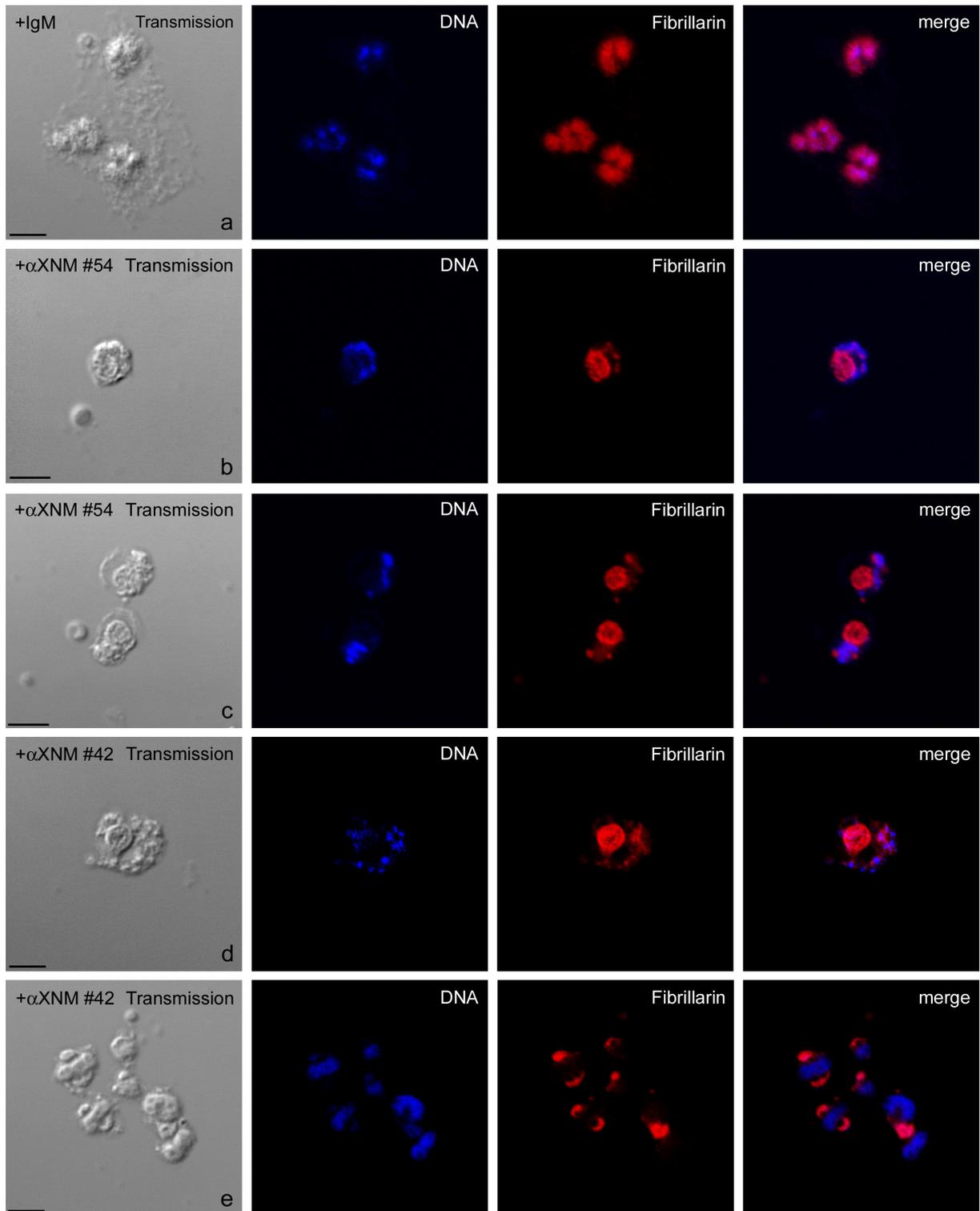


Abb. 4.3.25.: Die Mikroinjektion von *Xenopus*-Kernmyosin IC-Antikörper führt zu massivem Umbau der amplifizierten Nukleolen.

Manuell defollikulierte *Xenopus*-Oozyten wurden mit den Antikörpern XNMIC #54 (b und c) und XNMIC #42 (d und e) oder Isotypkontrollantikörper (a) injiziert. Nach drei Stunden wurden die Zellkerne gewonnen und der Kerninhalt gespreitet. Nach Fixierung mit Paraformaldehyd wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit Fibrillarantikörper durchgeführt. Der Kontrollnukleolus (a) zeigt das typische Bild mit Kernregion (FC und DFC) und Kortex (GC). Fibrillar (DFC) lokalisiert um die DNA (FC). Die Kernmyosindepletion führte zu massivem Umbau der Nukleolen. Die Aufnahmen wurden mit konfokaler Laserscan-Mikroskopie angefertigt. Eichstrich 5 μm .

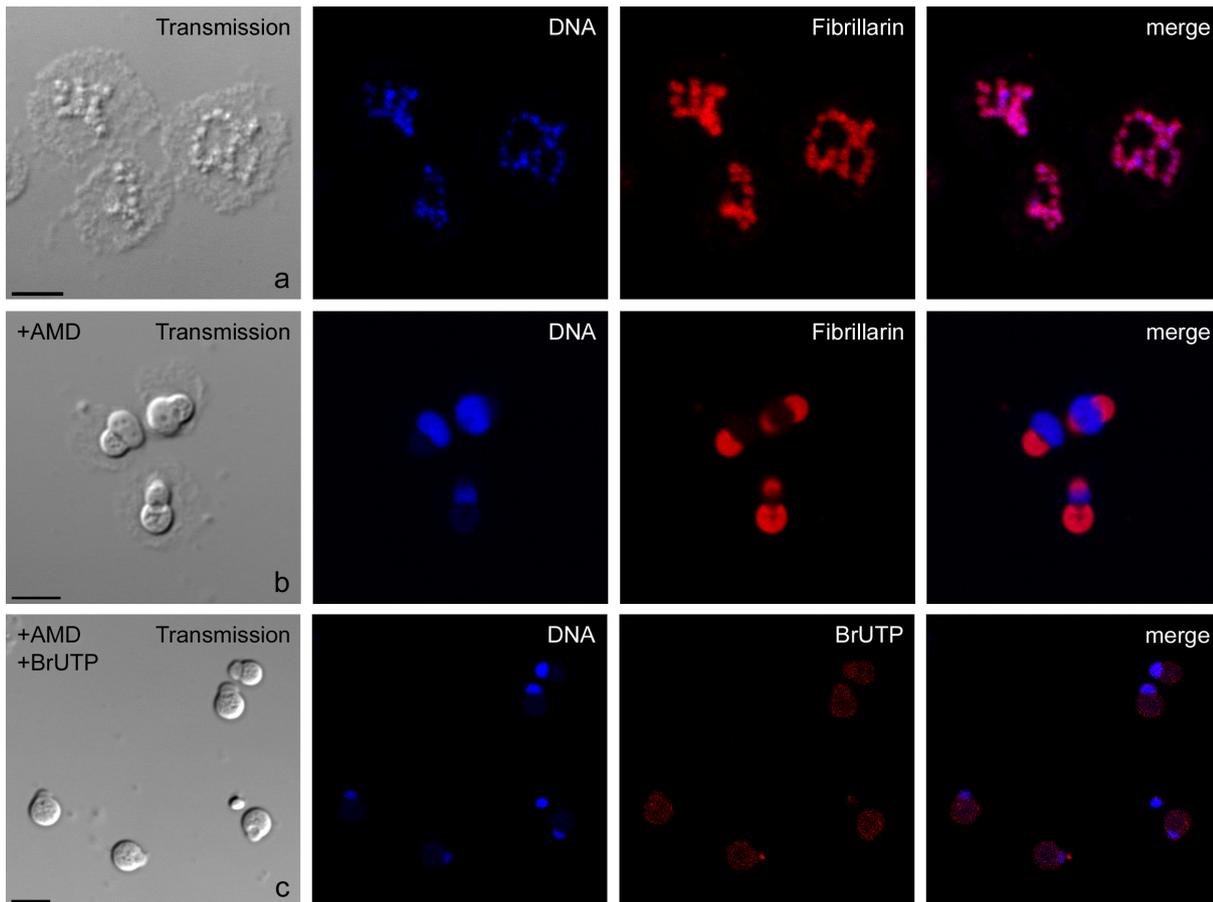
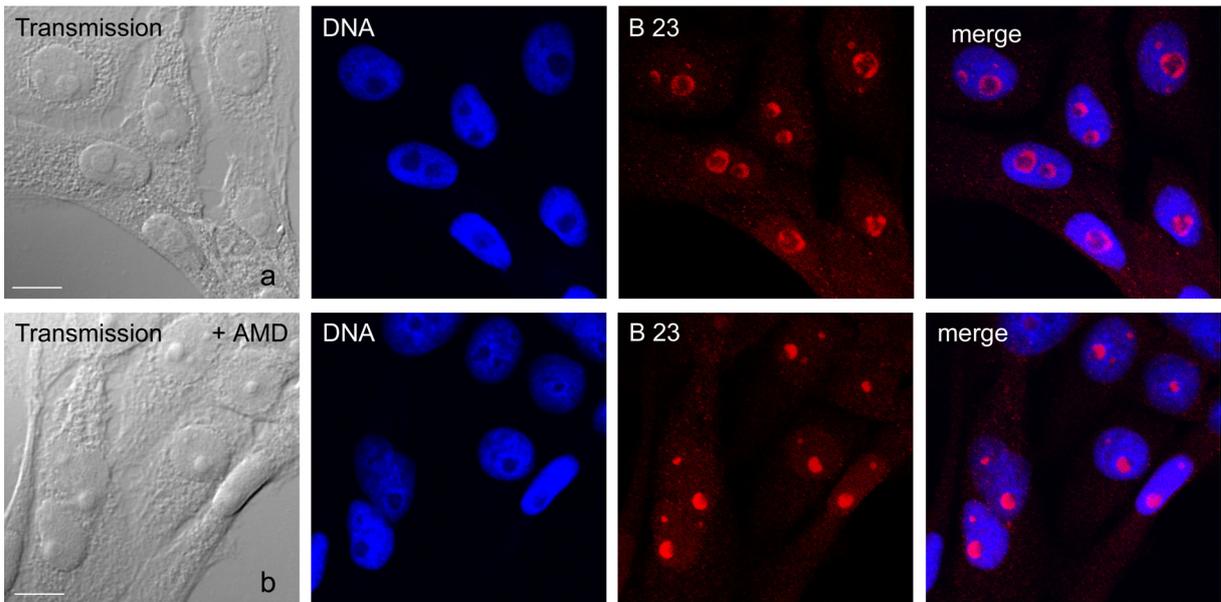


Abb. 4.3.26.: Actinomycin D-Behandlung führt zur Hemmung der Transkription und zur Segregation der Nukleolen.

Manuell defollikulierte *Xenopus*-Oozyten wurden ohne (a) oder mit Actinomycin D (AMD) (b und c) zur Hemmung der Transkription sowie der daraus resultierenden Segregation der Nukleolen inkubiert. Ein Teil der AMD-behandelten Oozyten wurden mit BrUTP mikroinjiziert (c). Nach drei Stunden wurden die Zellkerne gewonnen und der Kerninhalt gespreitet. Nach Fixierung mit Paraformaldehyd wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit Fibrillarin- (a und b) oder BrUTP-Antikörper (c) durchgeführt. Die Kontrollnukleolen (a) zeigten das typische Bild mit Kernregion (FC und DFC) und Kortex (GC). Fibrillarin (DFC) lokalisiert um die DNA (FC). Nach Transkriptionshemmung durch AMD (b) kam es zur Segregation. Zu sehen ist das FC (DNA), die DFC (Fibrillarin) und die darumliegende GC. Ein BrUTP-Einbau konnte nicht nachgewiesen (c). Die Aufnahmen wurden mit konfokaler Laserscan-Mikroskopie angefertigt. Eichstrich 5 μm .

A6-Zellen



XTC-Zellen

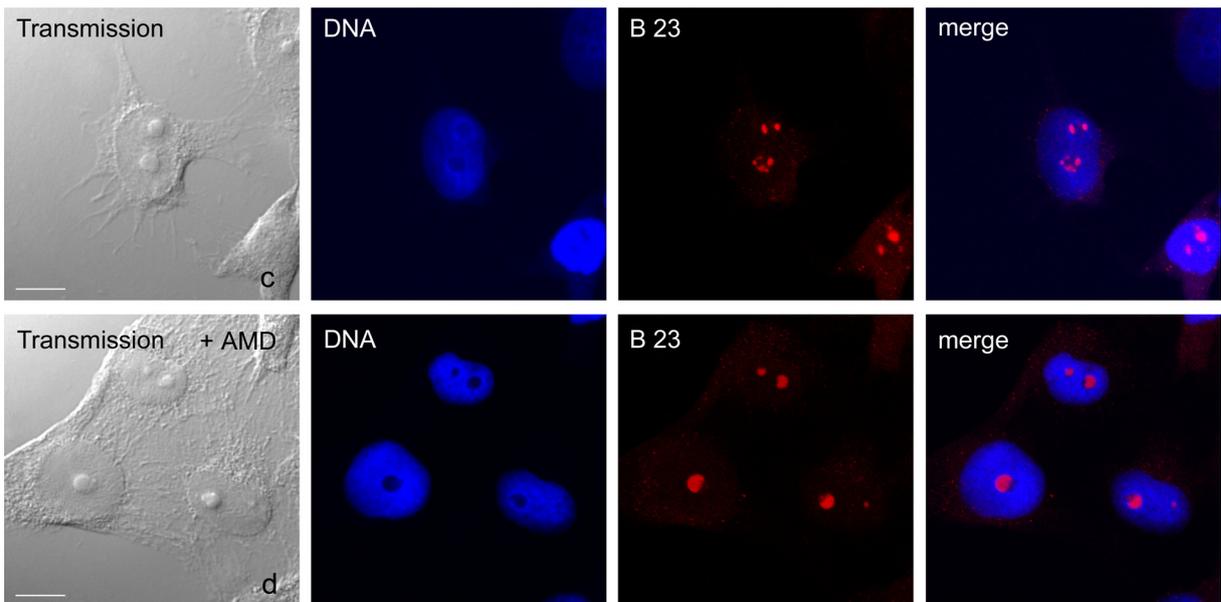


Abb. 4.3.27.: Darstellung des nukleolären Proteins B23 durch indirekte Immunfluoreszenz in somatischen XTC-Zellen.

Nach Fixierung von somatischen *Xenopus*-Zellen (A6 und XTC-Zelllinien) mit Paraformaldehyd wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit einem Antikörper gegen das nukleoläre Protein B23 (GC)(a bis d) durchgeführt. Ein Teil der Zellen wurde mit Actinomycin D (AMD) zur Transkriptionshemmung und der daraus folgenden Segregation der Nukleolen vorbehandelt (b und d). Die Aufnahmen wurden mit konfokaler Laserscan-Mikroskopie angefertigt. Eichstrich 10 μm .

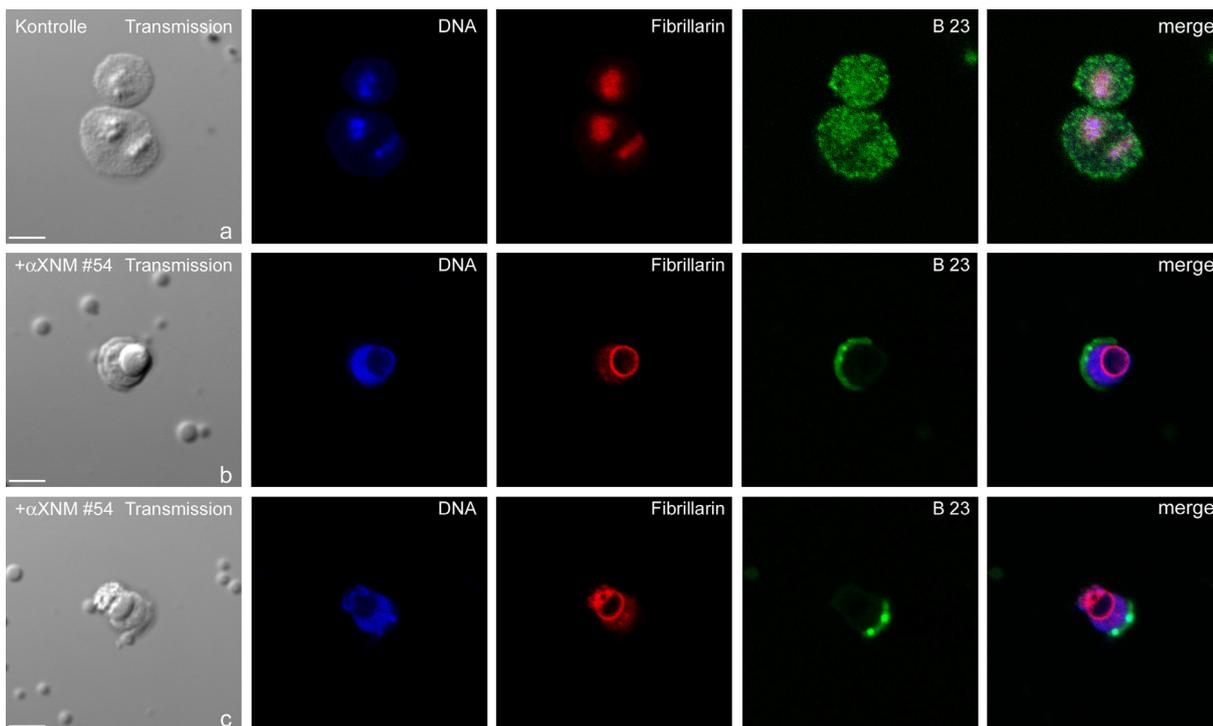


Abb. 4.3.28.: Die Mikroinjektion von *Xenopus*-Kernmyosin IC-Antikörper führt zu massivem Umbau der amplifizierten Nucleolen.

Manuell defollikulierte *Xenopus*-Oozyten wurden mit 0,07 mg Myosinantikörper XNMIC #54 (b und c) oder Isotypkontrollantikörper (a) vorinjiziert. Nach drei Stunden wurden die Zellkerne gewonnen und der Kerninhalt gespreitet. Nach Fixierung mit Paraformaldehyd wurde eine indirekte Doppelimmunfluoreszenz mit Fibrillarlin- und B23-Antikörpern durchgeführt. DNA (FC) ist blau, Fibrillarlin (DFC) rot und B23 (GC) grün angefärbt. Die Aufnahmen zur Darstellung der amplifizierten Nucleolen wurden mit konfokaler Laserscan-Mikroskopie angefertigt. Die Architektur dieser Nucleolen ist durch DNA (FC), Fibrillarlin (DFC) und B23 (GC) dargestellt. Eichstrich 5 μ m.

Der massive Umbau nach Injektion von Kernmyosin IC-Antikörpern wurde an den Nucleolen nach Spreitung des Nucleoplasma dargestellt. Um die Struktur von Nucleolen auch in situ analysieren zu können, wurden mikroinjizierte Oozyten (IgM-Isotypkontrolle oder Kernmyosin IC-Antikörper) für die Elektronenmikroskopie präpariert. Die Nucleolen aus Kontrollloozyten wiesen eine charakteristische Morphologie aus FCs, DFC und GC auf (Abb. 4.3.29. a und b). Im Gegensatz dazu waren die Nucleolen nach Injektion von Kernmyosin IC-Antikörper in ihrer Architektur verändert (Abb. 4.3.29. c und d). Neben einer Verdichtung von DFC und GC ist auch ein massive Umlagerung von Material zu erkennen (Abb. 4.3.29. d).

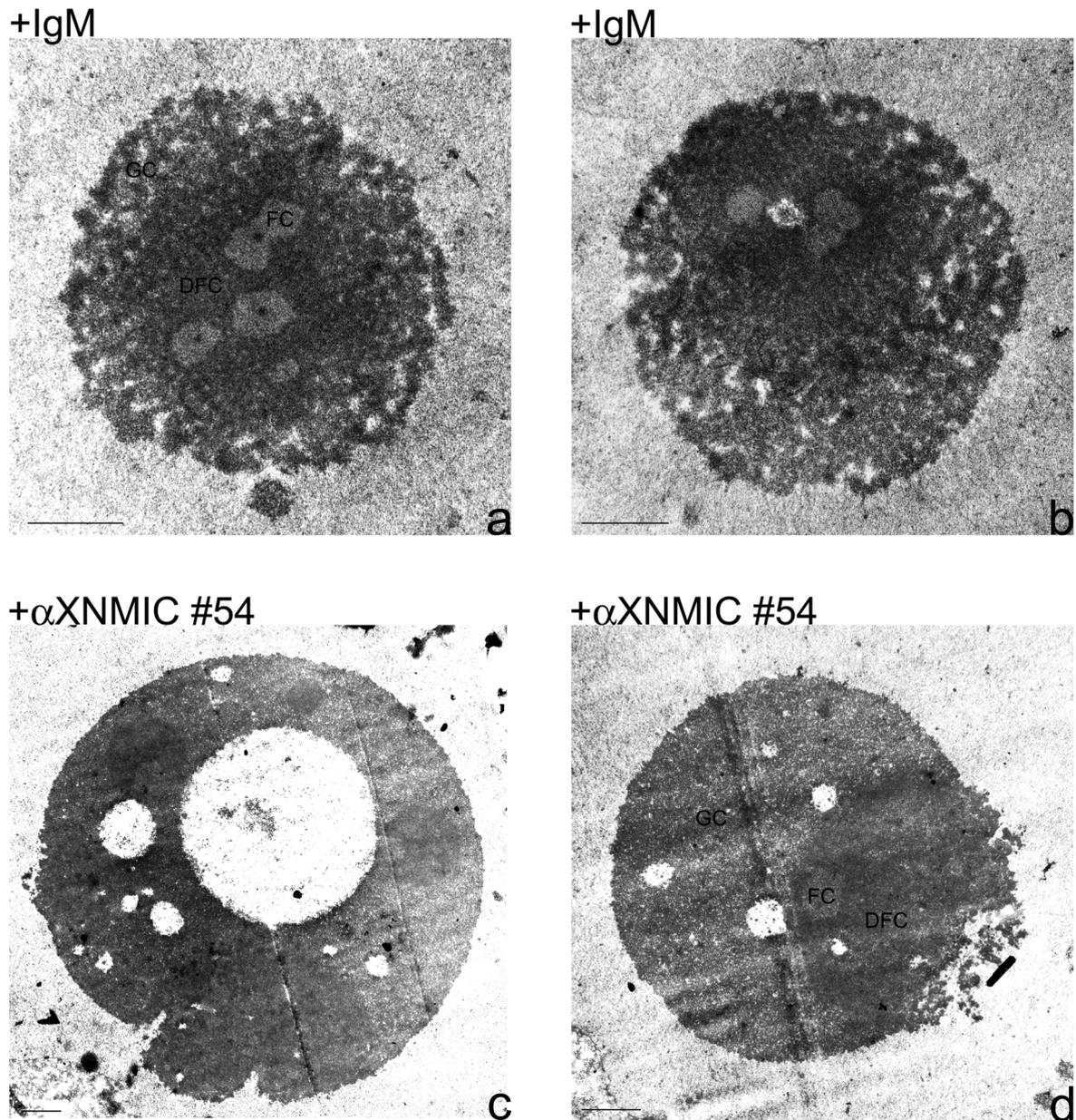


Abb. 4.3.29.: Die Mikroinjektion von *Xenopus*-Kernmyosin IC-Antikörper führt zu massivem Umbau der amplifizierten Nukleolen.

Manuell defollikulierte *Xenopus*-Oozyten wurden mit 0,07 mg Myosinantikörper XNMIC #54 (c und d) oder Isotypkontrollantikörper (a und b) injiziert. Nach drei Stunden wurden die Zellen für die Elektronenmikroskopie aufbereitet. In der oberen Reihe (a und b) sind zwei amplifizierte Nukleolen mit der charakteristischen Dreiteilung in FC, DFC und GC zu sehen. Nach Injektion von Kernmyosin IC-Antikörpern (c und d) war eine Verdichtung von DFC und GC und ein massiven architektonischen Umbau der Nukleolen zu sehen. Eichstrich 1µm.

Actinomycin D blockiert die Transkription, indem es an die DNA bindet. Nach Inkubation der Oozyten mit Actinomycin D spiegelte sich das Erliegen der Transkription in einem fehlenden BrUTP-Einbau wider (Abb. 4.3.26. c). Die durch Spreitung des Kerninhalts gewonnenen Nukleolen, die mit Kernmyosin-Antikörpern injiziert wurden, wiesen im Gegensatz zu Actinomycin D-behandelten Oozyten eine aufgelockerte FC-Struktur auf (Abb. 4.3.24. und 4.3.25.). Daher stellte sich die Frage, ob in diesen Nukleolen noch Transkription möglich ist. Zu diesem Zweck wurde fünf bis 20 Minuten vor der Spreitung BrUTP in die Oozyten appliziert. Durch eine indirekte Immunfluoreszenz mit einem BrUTP-Antikörper konnten weiterhin Fluoreszenzsignale in diesen aufgelockerten FC-Strukturen detektiert werden, hinweisend auf einen Einbau von BrUTP in entstehende Transkripte (4.3.30.). Die Transkription kam somit nicht zum Erliegen. Allerdings konnte hinsichtlich der Quantität der Transkription sowie der Qualität der Transkripte keine Aussage gemacht werden. Eine Reduktion der Transkription sowie das Auftreten verkürzter oder fehlerhafter Transkripte kann nicht ausgeschlossen werden.

Bei den amplifizierten Nukleolen handelt es sich um sehr große, komplex aufgebaute Strukturen, die in einer Anzahl von bis zu 1500 pro Oocyte vorkommen und rege Transkriptionsaktivität aufweisen. In ihrer Summe beherbergen sie eine beträchtliche rDNA- sowie Proteinmasse. In somatischen Zellen von *Xenopus laevis* treten hingegen nur bis zu zwei Nukleolen auf. Daher sollte auch in somatischen Nucleoli die Transkription nach Mikroinjektion von Kernmyosin IC-Antikörper in analysiert werden. Unter Einsatz von α -Amanitin wurde die RNA-Polymerase II-abhängige Transkription unterdrückt, so dass in Kontrollzellen nur die Transkription in den Nukleolen sichtbar war (4.3.31. a und b). Im Gegensatz zu den amplifizierten Nukleolen konnte bei den somatischen Nukleolen nach Injektion von Kernmyosin IC-Antikörpern der BrUTP-Einbau inhibiert werden (4.3.31. c). Eine Hemmung der Transkription gelang somit in den somatischen Nukleolen.

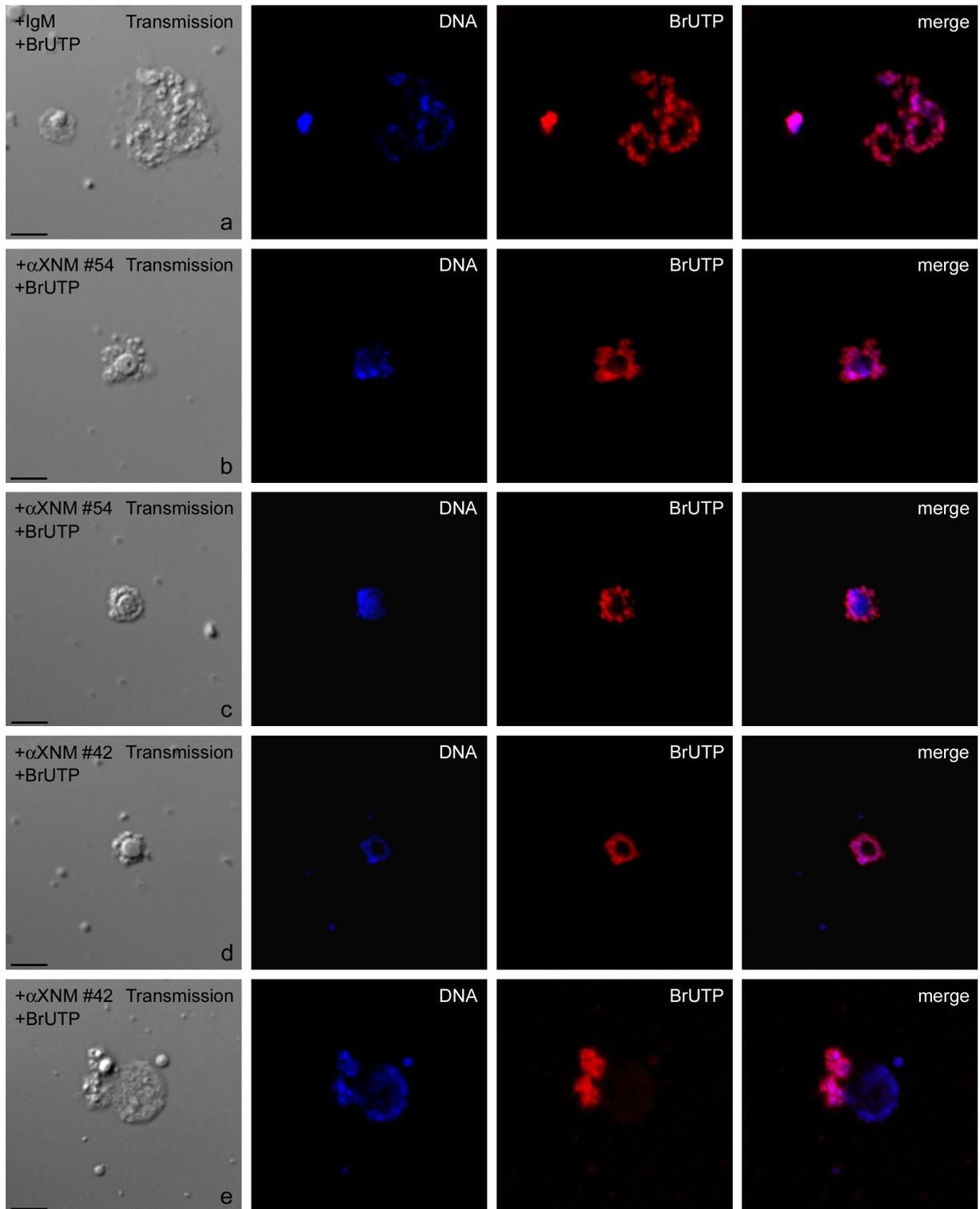


Abb. 4.3.30.: Die Mikroinjektion von *Xenopus*-Kernmyosin IC-Antikörpern führt zu massivem Umbau der amplifizierten Nukleolen, wobei aber noch ein BrUTP-Einbau als Ausdruck der Transkription möglich war.

Manuell defollikulierte *Xenopus*-Oozyten wurden mit 0,07 mg Myosinantikörper XNMIC #54 (b und c) und XNMIC #42 (d und e) oder Isotypkontrollantikörper (a) vorinjiziert. Nach 3 Stunden wurden die Zellkerne gewonnen und der Kerninhalt gespreitet. Nach Fixierung mit Paraformaldehyd wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit BrUTP-Antikörper durchgeführt. Die Kontrollnukleolen (a) zeigen das typische Bild mit Kernregion (FC und DFC) und Kortex (GC). Im Core fand die Herstellung neuer Transkripte statt, in die BrUTP eingebaut wurde. Bei Kernmyosindepletion trat ein massiver Umbau der Nukleolen auf (b bis e), allerdings kam die Transkription nicht zum Erliegen. Die Aufnahmen wurden mit konfokaler Laserscan-Mikroskopie angefertigt. Eichstrich 5 μ m.

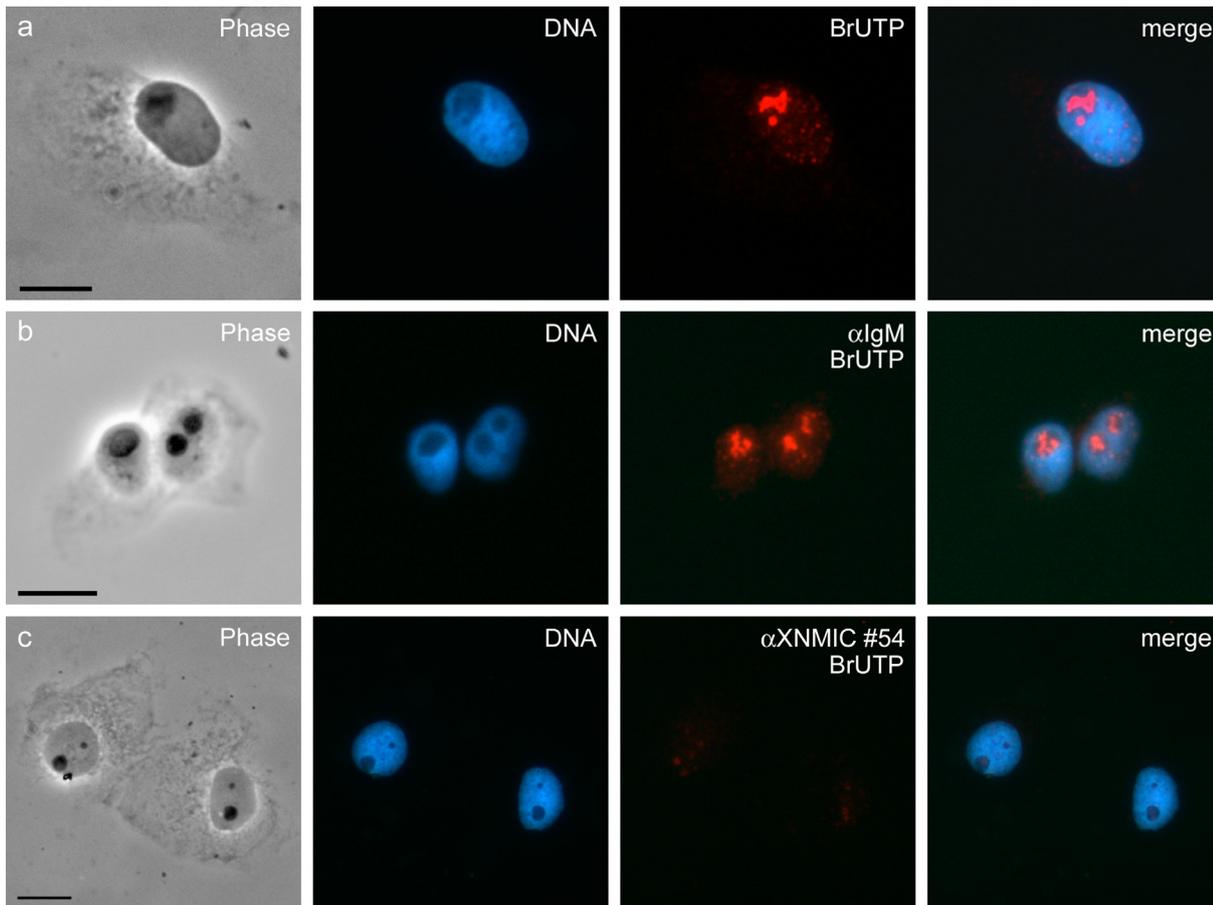


Abb. 4.3.31.: Mikroinjektion von Kernmyosin IC-Antikörpern führt zur Hemmung der Transkription in somatischen Zellen.

Somatische *Xenopus*-A6-Zellen wurden mit dem Kernmyosin-Antikörper XNMIC #54 (c) oder Isotypkontrollantikörper (b) vorinjiziert. Danach wurde ein BrUTP-Einbau unter Zusatz einer α -Amanitin-Dosis durchgeführt, um die RNA-Polymerase I-abhängige Transkription im Nukelolus sichtbar zu machen. Nach Fixierung mit Paraformaldehyd erfolgte eine indirekte Immunfluoreszenz mit BrUTP-Antikörpern. In Kontrollzellen (a und b) konnte ein BrUTP-Einbau als Ausdruck der Transkription gesehen werden. Im Gegensatz dazu konnte in Zellen nach Injektion von Kernmyosin IC-Antikörpern kein BrUTP-Einbau beobachtet werden (c). Eichstrich 10 μ m.

4.3.5.2. Kernmyosin IC ist ein essentieller Faktor bei der RNA-Polymerase II-abhängigen Transkription

Nachdem eine Beteiligung von Kernmyosin IC bei der Transkription im Nukleolus nachgewiesen wurde, sollte nun auch die RNA-Polymerase II-abhängige Transkription untersucht werden.

Die Transkription der mRNA ist in *Xenopus*-Oozyten durch die Lampenbürstenchromosomen sichtbar. An den lateralen Schleifen dieser Chromosomen findet aktive Transkription statt. Wird die Transkription inhibiert, resultiert eine Retraktion dieser Schleifen sowie eine Kondensation der Chromosomen. Diese Effekte konnten bereits durch Verwendung von RNA-Polymerase II-Inhibitoren und -Antikörpern sowie durch Aktinantikörper beobachtet werden (Scheer et al., 1984).

Zuerst sollte geklärt werden, ob Kernmyosin IC an den Lampenbürstenchromosomen lokalisiert. Da unspezifische Signale durch den Einsatz von Antikörpern bei einer Immunfluoreszenz nicht

ausgeschlossen werden können, wurde zur Kontrolle ein monoklonaler Zellkulturüberstand mit Antikörpern gegen das integrale Kernhüllenprotein Emerin eingesetzt. Die Zellkulturüberstände mit den monoklonalen Antikörpern gegen Emerin und Kernmyosin IC enthielten vergleichbare Zellkulturmedium und Zusätze.

Im Gegensatz zur Verwendung des Emerinantikörpers (Abb. 4.3.32. a) konnte mit dem Kernmyosin IC-Antikörper ein Fluoreszenzsignal an den transkriptionell aktiven Schleifen der Lampenbürstenchromosomen (Abb. 4.3.32. b) detektiert werden.

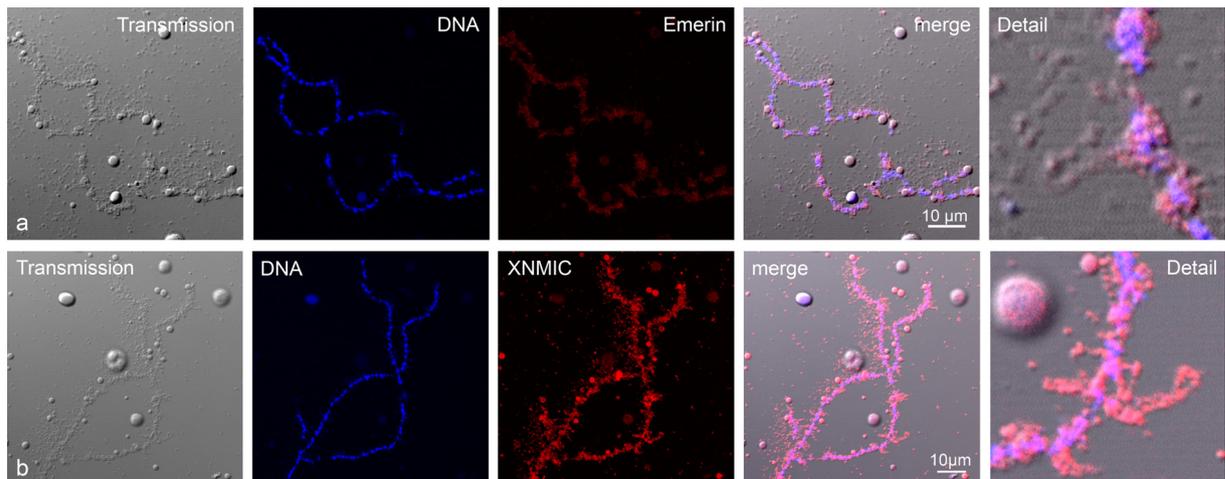


Abb. 4.3.32.: Kernmyosin IC lokalisiert an den lateralen transkriptionell aktiven Schleifen von Lampenbürstenchromosomen.

Xenopus-Ovar wurde gewonnen und 18 Stunden in Oozytenmedium kultiviert. Aus manuell defollikulierten Oozyten konnten dann die Zellkerne gewonnen und der Kerninhalt gespreitet werden. Nach einer Fixierung mit Paraformaldehyd wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit monoklonalen Antikörpern gegen Emerin (a) oder Kernmyosin IC (XNMIC #54) (b) durchgeführt. Im Gegensatz zum Emerinantikörper (a) gelang mit dem Kernmyosin IC-Antikörper (b) die Darstellung der lateralen Schleifen der Lampenbürstenchromosomen. Die Aufnahmen wurden mit konfokaler Laserscan-Mikroskopie angefertigt. Eichstrich 10 μm .

Nachdem Kernmyosin IC an den Lampenbürstenchromosomen nachgewiesen werden konnte, sollte das Verteilungsmuster mit dem der RNA-Polymerase II verglichen werden. Wie in Abb. 4.3.33. zu sehen, zeigten Kernmyosin und RNA-Polymerase II an Lampenbürstenchromosomen eine vergleichbare Lokalisation. Beide Proteine waren an den lateralen transkriptionell aktiven Schleifen zu finden.

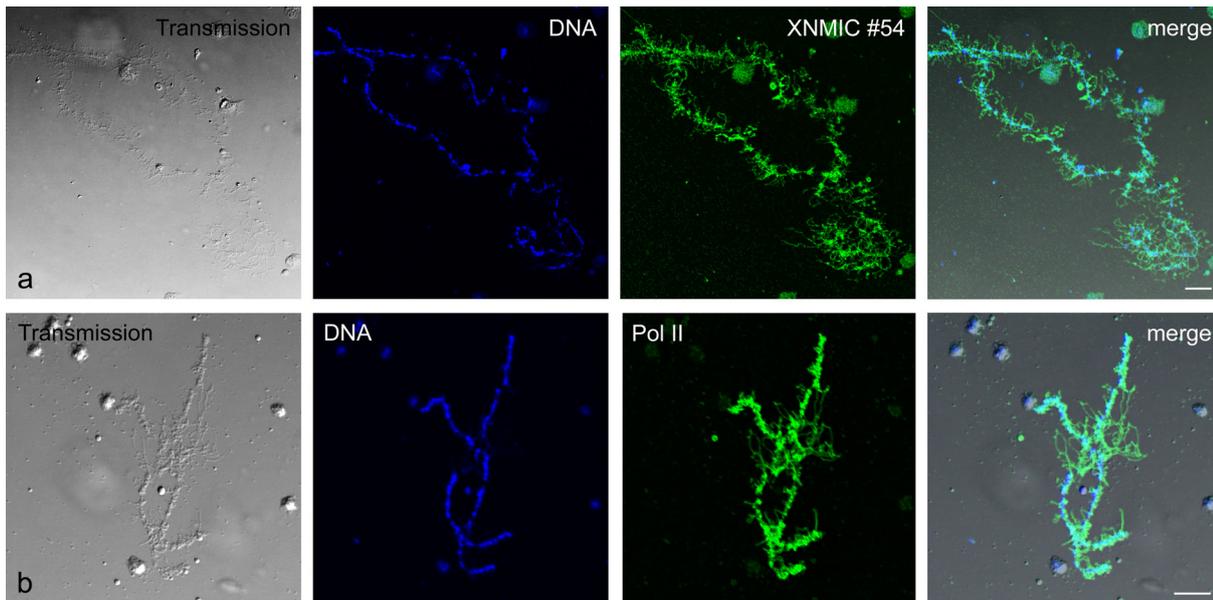


Abb. 4.3.33.: Kernmyosin IC und RNA-Polymerase II zeigen an Lampenbürstenchromosomen eine Lokalisation an den transkriptionell aktiven lateralen Schleifen.

Xenopus-Ovar wurde gewonnen und 18 Stunden in Oozytenmedium kultiviert. Aus manuell defollikulierten Oozyten konnten dann die Zellkerne gewonnen und der Kerninhalt gespreitet werden. Nach einer Fixierung mit Paraformaldehyd wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit monoklonalen Antikörpern gegen Kernmyosin IC (XNMIC #54) (a) oder RNA-Polymerase II (b) durchgeführt. Beide Antikörper erkannten Proteine auf den lateralen Schleifen der Lampenbürstenchromosomen. Die Aufnahmen wurden mit konfokaler Laserscan-Mikroskopie angefertigt. Eichstrich 10 μm .

Als nächstes sollte der Frage nachgegangen werden, ob Kernmyosin in *Xenopus*-Oozyten mit den Transkripten proteinkodierender Gene kolokalisiert. Um dies zu klären, wurde vor der Präparation der Lampenbürstenchromosomen Bromuridintriphosphat (BrUTP) in defollikulierte Oozyten mikroinjiziert. Bei aktiver Transkription wird BrUTP in entstehende Transkripte eingebaut. Anschließend wurden sowohl Kernmyosin IC als auch BrUTP-haltige Transkripte durch eine indirekte Immunfluoreszenz an den fixierten Lampenbürstenchromosomen nachgewiesen. Wie in Abb. 4.3.34. E und F demonstriert, korreliert die Lokalisation von Kernmyosin IC mit den naszierenden Transkripten.

Da nicht bekannt war, ob Kernmyosin IC auch mit transkriptionsinaktiven Chromosomen assoziiert, wurde die Lokalisation von Kernmyosin IC an transkriptionsinaktiven Chromosomen analysiert. Hierzu wurde zunächst die Transkription mit Actinomycin D gehemmt. In Abb. 4.3.35. ist der Effekt der Transkriptionshemmung auf die Lampenbürstenchromosomen zu sehen. Die lateralen Schleifen bildeten sich zurück, außerdem setzte eine Kontraktion der Chromosomen ein, die bei dem abgebildeten Chromosom noch nicht vollständig ausgebildet war. Nach indirekter Immunfluoreszenz konnte Kernmyosin IC nicht mehr am Chromosom nachgewiesen werden.

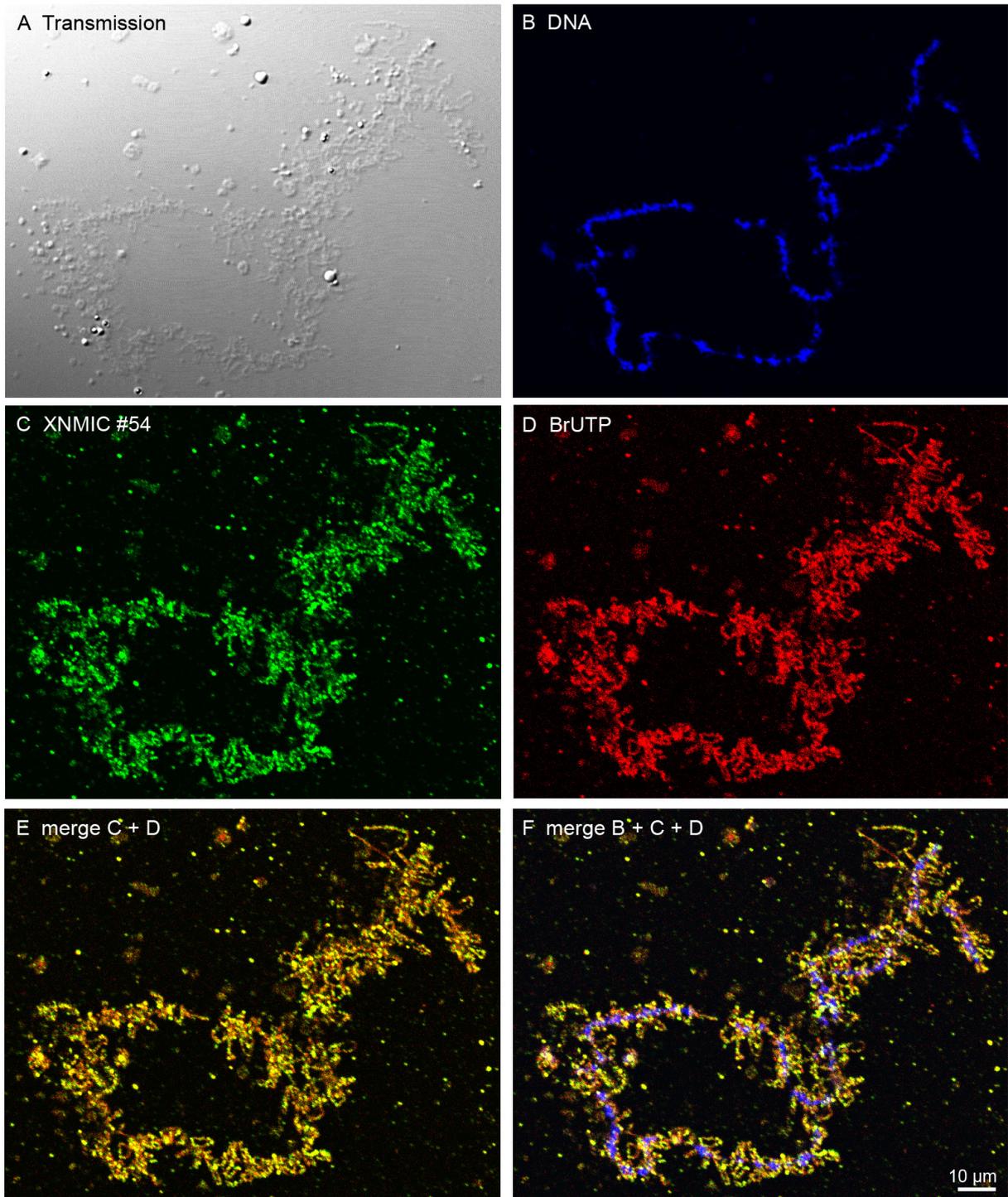


Abb. 4.3.34.: Kernmyosin IC kolokalisiert mit der Transkription proteinkodierender Gene an den lateralen transkriptionell aktiven Schleifen von Lampenbürstenchromosomen.

Xenopus-Ovar wurde gewonnen und 18 Stunden in Oozytenmedium kultiviert. Vor der Präparation der Lampenbürstenchromosomen wurde BrUTP in defollikulierte Oozyten mikroinjiziert. BrUTP wird in entstehende Transkripte eingebaut. Nach einer Fixierung mit Paraformaldehyd wurde eine indirekte Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen Kernmyosin IC (XNMIC #54) (C) und BrUTP (D) durchgeführt. Kernmyosin IC ist in grün (C) und BrUTP in rot (D) dargestellt. Die Kolokalisation zeigte sich an der gelben Farbe (E). Die Aufnahmen wurden mit konfokaler Laserscan-Mikroskopie angefertigt. Eichstrich 10 µm.

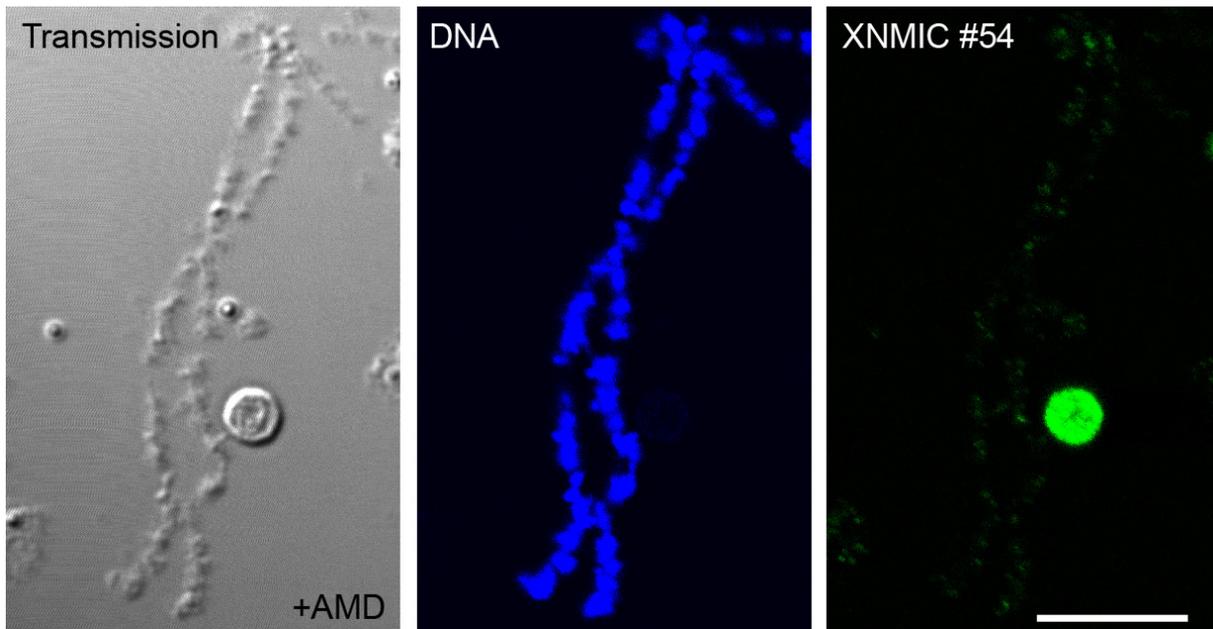


Abb. 4.3.35.: Kernmyosin IC ist nach Transkriptionshemmung nicht mehr am Chromosom nachweisbar. *Xenopus*-Ovar wurde gewonnen und 18 Stunden in Oozytenmedium kultiviert. Manuell defollikulierte Oozyten wurden zwei Stunden lang in Actinomycin D zur Hemmung der Transkription inkubiert. Anschließend wurden die Zellkerne isoliert und der Kerninhalt gespreitet. Nach der Fixierung mit Paraformaldehyd wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit dem monoklonalen Kernmyosin IC-Antikörper XNMIC #54 durchgeführt. Die Aufnahmen mit konfokaler Laserscan-Mikroskopie zeigten, dass Kernmyosin IC nach Retraktion der lateralen Schleifen nicht mehr am Chromosom lokalisiert. Eichstrich 10 μm .

Kernmyosin IC war ähnlich wie RNA Polymerase II an den lateralen transkriptionsaktiven Schleifen der Lampenbürsten lokalisiert wo es mit naszierenden Transkripten kolokalisierte. Nach Hemmung der Transkription mit Actinomycin D konnte es nicht mehr am Chromosom nachzuweisen. Dies legte die Vermutung nahe, dass Kernmyosin IC in die mRNA-Transkription involviert sein könnte.

Es wurde bereits demonstriert, dass durch die Injektion von Aktinantikörpern in Amphibienoozyten eine Retraktion der lateralen transkriptionsaktiven Schleifen und eine Kondensation der Oozyten erfolgt (Scheer et al., 1984). Diese Effekte ähneln denen nach Transkriptionshemmung durch Actinomycin D.

Ob Kernmyosin IC-Antikörper ebenfalls in der Lage sind, die Transkription proteinkodierender Genen zu inhibieren, sollte daher durch Injektionsversuche in *Xenopus*-Oozyten geprüft werden. Die Oozyten wurden entweder mit Kernmyosin IC- oder Isotypkontrollantikörpern mikroinjiziert und fünf Stunden in Oozytenmedium inkubiert. Anschließend wurden die Chromosomen präpariert. Lampenbürstenchromosomen aus den Kontrolloozyten (Abb. 4.3.36. a und c) wiesen multiple laterale Schleifen auf. Im Gegensatz hierzu führte die Injektion von Kernmyosin IC-Antikörpern (Abb. 4.3.36. b und d) zu einer Retraktion der lateralen Schleifen und zur Kondensation der Chromosomen.

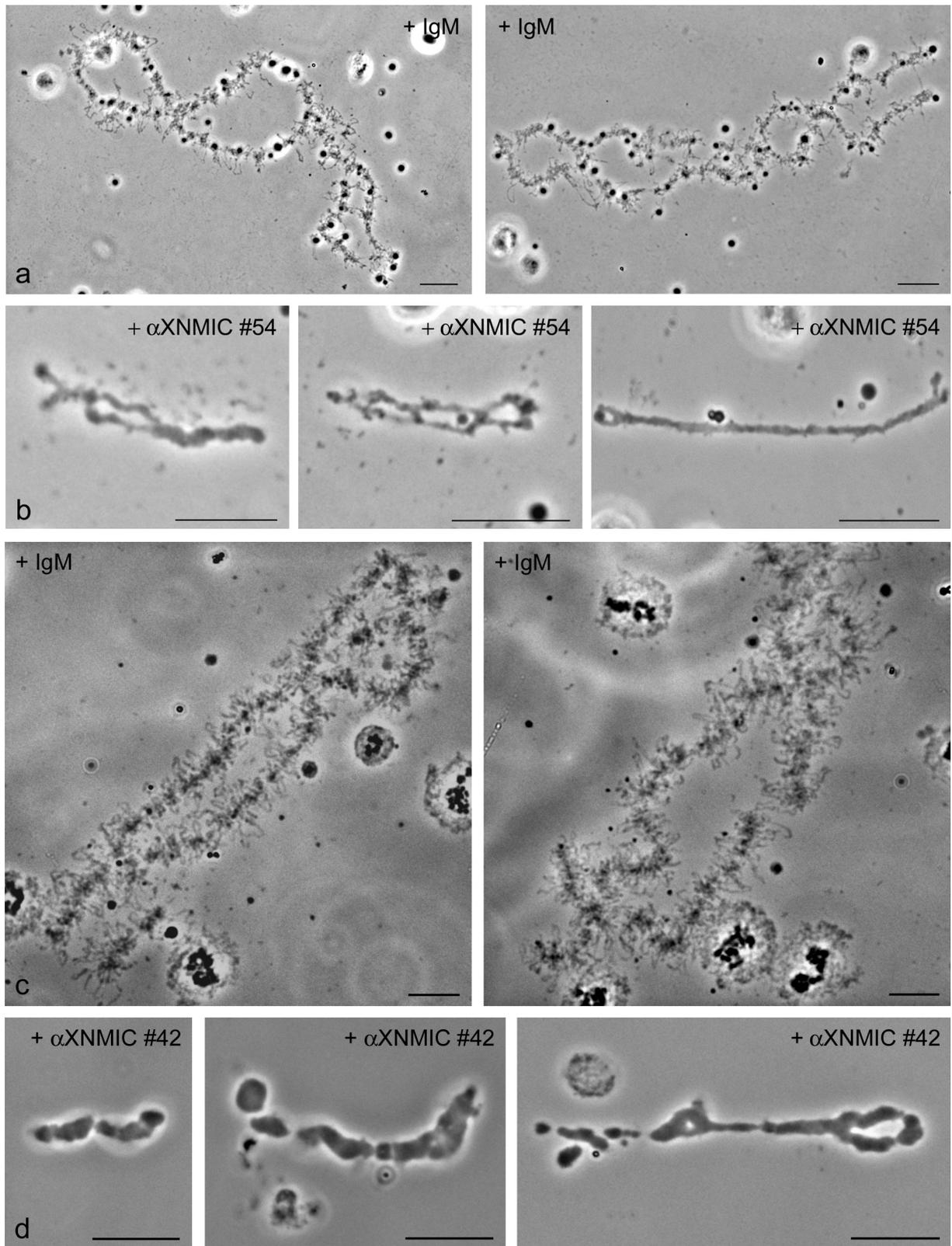


Abb. 4.3.36.: Kernmyosin IC-Antikörper führen zur Retraktion der lateralen Schleifen der Lampenbürstenchromosomen und zur Kondensation der DNA.

Xenopus-Ovar wurde gewonnen und 18 Stunden in Oozytenmedium kultiviert. Manuell defolikulierte Oozyten wurden mit 0,07 mg Kernmyosin IC-Antikörpern XNMIC #54 (Reihe b) und #42 (Reihe d) oder mit Isotypantikörpern (Reihe a und c) in den Zellkern injiziert. Nach fünf Stunden wurden die Zellkerne isoliert und der Kerninhalt gespreitet. Die Chromosomen aus Kontrolloozyten (Reihe a und c) wiesen multiple laterale

Schleifen auf. Dagegen führte die Injektion von Kernmyosin IC-Antikörpern (Reihe b und d) zu einer Retraktion dieser lateralen Schleifen und zur Kontraktion der Chromosomen. Eichstrich 10 μm .

Ergänzend hierzu wurde untersucht, ob ein BrUTP-Einbau und damit eine Transkription an den kernmyosin-depletierten Chromosomen noch statt fand. Interessanterweise konnten noch wenige Schleifen an den Chromosomen detektiert werden, an welchen tatsächlich Transkription eine noch möglich war (Abb. 4.3.37.). Da diese Schleifen einerseits sehr kurz, andererseits in Telomernähe gelegen waren, könnte es sich daher hierbei um Schleifen mit RNA-Polymerase III-abhängiger tRNA-Transkription handeln.

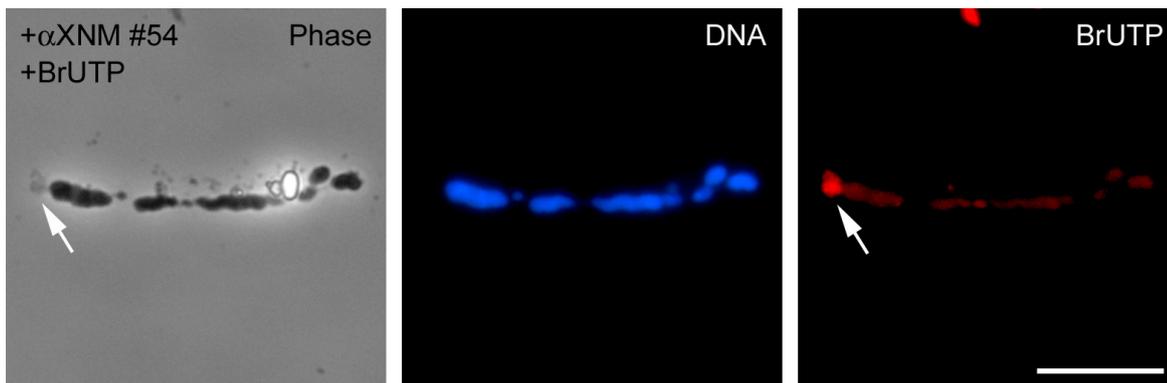


Abb. 4.3.37.: Kernmyosin-Antikörper führen zur Hemmung der Transkription proteinkodierender Gene. *Xenopus*-Ovar wurde gewonnen und 18 Stunden in Oozytenmedium kultiviert. Der Kernmyosin IC-Antikörper XNMIC #54 wurde in die Zellkerne manuell defollikulierter Oozyten injiziert. Nach fünf Stunden wurde BrUTP in das Zytoplasma injiziert, nach 15 Minuten die Zellkerne isoliert und der Kerninhalt gespreitet. Nach Fixierung mit Paraformaldehyd erfolgte eine indirekte Immunfluoreszenz mit einem BrUTP-Antikörper. Die lateralen Schleifen haben sich bis auf wenige Schleifen (Pfeil) zurückgebildet. Ein BrUTP-Einbau fand nur noch in diesen Schleifen statt. Eichstrich 10 μm .

5. ANHANG

5.1. Nichttranslatierte Bereiche und kodierende Sequenz von CD83

1	gcttccgctg	cccgccgggg	aatcccccg	gctggcgcg	agggagttc	ccgaacgcgc	60
61	gggcataaaa	gggcagccgg	cgccccgcg	ccacagctct	gcagctcgtg	gcagcggcgc	120
121	agcgcctccag	ccatgtcgcg	cggcctccag	cttctgctcc	tgagctgcgc	ctacagcctg	180
181	gctccccgca	cgccggagg	gaaggtggct	tgctccgaag	atgtggactt	gcctgcacc	240
241	gccccctggg	atccgcaggt	tccctacacg	gtctcctggg	tcaagttatt	ggaggggtgg	300
301	gaagagagga	tggagacacc	ccaggaagac	cacctcaggg	gacagcacta	tcatcagaag	360
361	gggcaaaatg	gttctttcga	cgccccaat	gaaaggcctt	attccctgaa	gatccgaaac	420
421	actaccagct	gcaactcggg	gacatacag	tgactctgc	aggaccgga	tgggcagaga	480
481	aacctaagt	gcaaggtgat	cttgagagtg	acaggatgcc	ctgcacagcg	taaagaagag	540
541	actttaaga	aatacagagc	ggagattg	ctgctgctg	ctctggttat	tttctactta	600
601	acactcatca	ttttcacttg	taagtttgca	cggctacaga	gtatcttccc	agattttct	660
661	aaagctggca	tggaacgagc	ttttctccca	gttacctccc	caaataagca	tttagggcta	720
721	gtgactcctc	acaagacaga	actggtatga	gcaggatttc	tgaggttct	tcttctgaa	780
781	gctgaggctc	aggggtgtgc	ctgtctgtta	cactggagga	gagaagaatg	agcctacgct	840
841	gaagatggca	tcctgtgaag	tccttcacct	cactgaaaac	atctggaagg	ggatcccacc	900
901	ccattttctg	tgggcaggcc	tcgaaaacca	tcacatgacc	acatagcatg	aggccactgc	960
961	tgcttctcca	tggccacctt	ttcagcgatg	tatgcagcta	tctggccaac	ctcctggaca	1020
1021	ttttttcagt	catataaaa	ctatggtgag	atgcagctgg	aaaagggctt	tgggaaatat	1080
1081	gaatgcccc	agctggccc	tgacagactc	ctgaggacag	ctgtcctctt	ctgcatcttg	1140
1141	ggagactctc	ttgaatttc	ctgtgttttg	ctgtaccagc	ccagatgttt	tacgtctggg	1200
1201	agaaattgac	agatcaagct	gtgagacagt	gggaaatatt	tagcaataat	ttcctgggtg	1260
1261	gaaggtcctg	ctattactaa	ggagtaaatc	gtgtacaaag	aaataacaag	tcgatgaact	1320
1321	attccccagc	agggctttt	catctgggaa	agacatccat	aaagaagcaa	taaagaagag	1380
1381	tgccacattt	atttttatat	ctatatgtac	ttgtcaaaga	aggttgtgtt	tttctgcttt	1440
1441	tgaaatctgt	atctgtagtg	agatagcatt	gtgaactgac	aggcagcctg	gacatagaga	1500
1501	gggagaagaa	gtcagagagg	gtgacaagat	agagagctat	ttaatggccg	gctggaaatg	1560
1561	ctgggctgac	ggtgcagctc	gggtgctcgc	ccacttgctc	cactatctgg	gtgcatgatc	1620
1621	ttgagcaagt	tccttctggt	gtctgctttc	tccattgtaa	accacaaggc	tgctgcatgg	1680
1681	gctaatgaag	atcatatacg	tgaaaattat	ttgaaaacat	ataaagcact	atacagattc	1740
1741	gaaactccat	tgagtcatta	tccttgctat	gatgatgggt	ttttggggat	gagaggggtc	1800
1801	tatccatttc	tcattgtttc	cattgtttga	aacaaagaag	gttaccaaga	agcctttcct	1860
1861	gtagccttct	gtaggaattc	ttttggggaa	gtgaggaagc	caggtccacg	gtctgttctt	1920
1921	gaagcagtag	cctaacacac	tccaagatat	ggacacacgg	gagccgctgg	cagaagggac	1980
1981	ttcacgaagt	gttgcatgga	tgttttagcc	attgttggct	ttcccttacc	aaacttgggc	2040
2041	ccttcccttc	ttggtttcca	aaggcatttt	attgcttgag	ttatatgttc	actgcccccc	2100
2101	taatattagg	gagtaaaacg	gataccaagt	tgatttagtg	tttttacctc	tgtcttggtc	2160
2161	ttcatgttat	taaacgtatg	catgtgaaga	aagggtgttt	ttctgtttta	tattcaactc	2220
2221	ataagacttt	gggataggaa	aaatgagtaa	tggttactag	gcttaatacc	tggttgatta	2280
2281	cataatctgt	acaacgaacc	cccattgatg	aagtttacct	atgtaacaaa	cctgcactta	2340
2341	tacctatgaa	cttaaaatga	aagttaaaaa	taaaaaacat	atacaataaa	aaaaaaaaaa	2400
2401	aaaaaaaaaa						

Abb. 5.1.: 5`- und 3`-untranslatierte Region und kodierende Sequenz von CD83 mit dem HuR-Response-Element.

Start- und Stopkodon sind fett schwarz hervorgehoben. Das Stem-Loop-konfigurierte HuR-Response-Element (SL2, HRE, PRE)(nt 466-615)(Prechtel et al., 2006) ist durch rote fette Nukleotide (Bereich 598-747) und Unterstreichung gekennzeichnet. Das benachbarte Stem-Loop-Element 1 befindet sich von Nucleotid 412-465 (Bereich 544-607)(Prechtel et al., 2006) und ist durch rosafarbene Buchstaben dargestellt. Die 5`-untranslatierte Region (nt -1 bis -132, Bereich 1-132) ist grün, die 3`-untranslatierte Region (nt *751-*2410, Bereich 751-2410) blau gekennzeichnet.

5.2. Proteinsequenzvergleich von CRM1/Exportin1/XPO1 bei *Homo sapiens* (H.s.), *Mus musculus* (M.m.) und *Xenopus laevis* (X.l.)

H. s.	MPAIMTMLADHAARQLLDFSQKLDINLLDNVNVNCLYHGEGAQQRMAQEVLTHLKEHPDAW	60
M. m.	MPAIMTMLADHAARQLLDFSQKLDINLLDNVNVNCLYHGEGAQQRMAQEVLTHLKEHPDAW	60
X. l.	MPAIMTMLADHAARQLLDFSQKLDINLLDNVNVNCLYHGEGAQQRMAQEVLTHLKEHPDAW *****	60
H. s.	TRVDTILEFSQNMNTKYGLQILENVIKTRWKILPRNQCEGIKKYVVGLIIKTSSDPTCV	120
M. m.	TRVDTILEFSQNMNTKYGLQILENVIKTRWKILPRNQCEGIKKYVVGLIIKTSSDPTCV	120
X. l.	TRVDTILEFSQNMNTKYGLQILENVIKTRWKILPRNQCDGIKKYVVGLIIKTSSDPTCV *****:*****	120
H. s.	EKEKVYIGKLNMLVQILKQEWPKHWPTFISDIVGASRTSESLCQNNMVIKLLSEEVFD	180
M. m.	EKEKVYIGKLNMLVQILKQEWPKHWPTFISDIVGASRTSESLCQNNMVIKLLSEEVFD	180
X. l.	EKEKVYIGKLNMLVQILKQEWPKHWPTFISDIVGASRTSESLCQNNMVIKLLSEEVFD *****	180
H. s.	FSSGQITQVKSKHLKDSMCNEFSQIFQLCQFVMENSQNAPLVHATLETLLRFLNWIPLGY	240
M. m.	FSSGQITQVKAKHLKDSMCNEFSQIFQLCQFVMENSQNAPLVHATLETLLRFLNWIPLGY	240
X. l.	FSTGQITQVKAKHLKDSMCNEFSQIFQLCQFVMENSQNAQLVHATLETLLRFLNWIPLGY **:*	240
H. s.	IFETKLISTLIYKFLNVPFRNVSLKCLTEIAGVSVSQYEEQFVTLFVTLTMMQLKQMLPI	300
M. m.	IFETKLISTLIYKFLNVPFRNVSLKCLTEIAGVSVSQYEEQFETLFTLTLTMMQLKQMLPL	300
X. l.	IFETKLISTLVYKFLNVPFRNVSLKCLTEIAGVSVSQYEEQFVTLFVTLTMMQLKQMLPL *****:*****	300
H. s.	NTNIRLAYSNGKDDEQNFIQNLSLFLCTFLKEHDQLIEKRLNLRETLMALHYMLLVSEV	360
M. m.	NTNIRLAYSNGKDDEQNFIQNLSLFLCTFLKEHGQLIEKRLNLREALMEALHYMLLVSEV	360
X. l.	NTNIRLAYSNGKDDEQNFIQNLSLFLCTFLKEHGQLIEKRLNLRETLMALHYMLLVSEV *****:*****:*****	360
H. s.	EETEIFKICLEYWNHLAAELYRESPFSTSASPLLSGSQHFDVPPRRQLYLPMLFKVRLLM	420
M. m.	EETEIFKICLEYWNHLAAELYRESPFSTSASPLLSGSQHFDIPRRQLYLVLSKVRLLM	420
X. l.	EETEIFKICLEYWNHLAAELYRESPFSTSASPLLSGSQHFDVPPRRQLYLPVLSKVRLLM *****:*****:*****	420
H. s.	VSRMAKPEEVLVVENDQGEVVREFMKDTSINLYKNMRETLVYLTHLDYVDTERIMTEKL	480
M. m.	VSRMAKPEEVLVVENDQGEVVREFMKDTSINLYKNMRETLVYLTHLDYVDTEIIMTKKL	480
X. l.	VSRMAKPEEVLVVENDQGEVVREFMKDTSINLYKNMRETLVYLTHLDYADTERIMTEKL *****:*****:*****	480
	LMB	
H. s.	HNQVNGTEWSWKNLNTLCWAIGSISGAMHEEDEKRFVTVIKDLLGLCEQKRGKDNKAI I	540
M. m.	QNQVNGTEWSWKNLNTLCWAIGSISGAMHEEDEKRFVTVIKDLLGLCEQKRGKDNKAI I	540
X. l.	HNQVNGTEWSWKNLNTLCWAIGSISGAMHEEDEKRFVTVIKDLLGLCEQKRGKDNKAI I :*****:*****:*****	540
H. s.	ASNIMYIVGQYPRFLRAHWKFLKTVVKNLFEFMEHETHDGVQDMACDTFIKIAQKRRHFV	600
M. m.	ASNIMYIVGQYPRFLRAHWKFLKTVVKNLFEFMEHETHDGVQDMACDTFIKIAQKRRHFV	600
X. l.	ASNIMYIVGQYPRFLRAHWKFLKTVVKNLFEFMEHETHDGVQDMACDTFIKIAQKRRHFV *****	600
H. s.	QVQVGEVMPFIDEILNNTIICDLQPQVHTFYEAVGYMIGAQTDQTVQEHLEIKYMMLL	660
M. m.	QVQVGEVMPFIDEILNNTIICDLQPQVHTFYEAVGYMIGAQTDQTVQEHLEIKYMMLL	660
X. l.	QVQVGEVMPFIDEILNNTIICDLQPQVHTFYEAVGYMIGAQTDQTVQEHLEIKYMMLL *****	660
H. s.	PNQVWDSIIQQATKNVDILKDPETVKQLGSILKTNVRACKAVGHPFVIQLGRIYLDMLNV	720
M. m.	PNQVWDSIIQQATKNVDILKDPETVKQLGSILKTNVRACKAVGHPFVIQLGRIYLDMLNV	720
X. l.	PNQVWDSIIQQATKNVDILKDPETVKQLGSILKTNVRACKAVGHPFVIQLGRIYLDMLNV *****	720
H. s.	YKCLSENISAAIQANGEMVTKQPLIRSMRTVKRETCLKLISGWVSRSDPQMVAENFVPPPL	780
M. m.	YKCLSENISAAIQANGEMVTKQPLIRSMRTVKRETCLKLISGWVSRSDPQMVAENFVPPPL	780
X. l.	YKCLSENISAAIQANGEMVTKQPLIRSMRTVKRETCLKLISGWVSRSDPQMVAENFVPPPL *****	780

5.5. Sequenzvergleich von eIF5A bei *Homo sapiens*, (H.s.) und *Xenopus laevis* (X.l.)

H.s.	MADDLDFETGDAGASATFPMQCSALRKNQFVVLKGRPCKIVEM	STSKTGRKHGAKVHLVG	60	
X.l.	MADDLDFETGDAGASATFPMQCSALRKNQFVVLKGRPCKIVEM	STSKTGRKHGAKVHLVG	60	

H.s.	IDIFTGKKYEDICPSTHNMDVPNIKRND	FQLIGIQDGYLS	LQDSGEVREDLRLPEGDLG	120
X.l.	IDIFTGKKYEDICPSTHNMDVPNIKRND	FQLIGIQDGYLS	LQDSGEVREDLRLPEGDLG	120

H.s.	KEIEQKYDCGEEILITVLSAMTEEA	VAIKAMAK	154	
X.l.	KEIEQKYDCGEEILITVLSAMTEEA	VAIKAMAK	154	

Abb. 5.5.: Sequenzvergleich von eIF5A (*Homo sapiens*, H.s.) und eIF5A (*Xenopus laevis*, X.l.).

Das Lysin an Position 50 (rot markiert) wird hypusinyliert. Es liegt in einem Bereich mit basischen Aminosäuren (blau markiert). Die schwarz und fett gedruckten Aminosäuren markieren einen leucinreichen Bereich. An Position 101 liegt ein hochkonserviertes Leucin (Chatterje et al., 2006). Der Sequenzvergleich erfolgte mit clustalW.

5.6. Sequenzvergleich von β -Aktin bei *Homo sapiens* (H.s.) und *Xenopus laevis* (X.l.)

H.s.	1	MDDDIAALVVDNNGSMCKAGFAGDDAPRAVFP	SIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGD	EAQS	60	
X.l.	1	MDDDIAALVVDNNGSMCKAGFAGDDAPRAVFP	SIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGD	EAQS	60	
*:*****						
H.s.	61	KRGILTLKYP	IEHGIVTNWDDMEKI	WHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLN	PKANREKMT	120
X.l.	61	KRGILTLKYP	IEHGIVTNWDDMEKI	WHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLN	PKANREKMT	120

H.s.	121	QIMFETFNT	PAMYVAIQAVLSLYASGR	TTGIVMDSGDGV	TVTPIYEGYALPHAILRLDL	180
X.l.	121	QIMFETFNT	PAMYVAIQAVLSLYASGR	TTGIVMDSGDGV	TVTPIYEGYALPHAILRLDL	180

H.s.	181	AGRDLTDYLMKIL	TERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLCY	VALDFEQEMATAASSSSLEKSY		240
X.l.	181	AGRDLTDYLMKIL	TERGYSFTTTAEREIVRDIKEKLCY	VALDFEQEMATAASSSSLEKSY		240

H.s.	241	ELPDGQVITIGNER	FRCPEALFQPSFLGMESCGIHETTFNS	IMKCDVDIRKDL	YANTVLS	300
X.l.	241	ELPDGQVITIGNER	FRCPEALFQPSFLGMESCGIHETTYNS	IMKCDVDIRKDL	YANTVLS	300
*****:*****						
H.s.	301	GGTTMYPGIADRMQKEIT	ALAPSTMKIKI	IAPPERKYSVWIGGSILASL	STFQQMWISKQ	360
X.l.	301	GGTTMYPGIADRMQKEIT	ALAPSTMKIKI	IAPPERKYSVWIGGSILASL	STFQQMWISKQ	360

H.s.	361	EYDESGPSIVHRKCF				375
X.l.	361	EYDESGPSIVHRKCF				375

Abb. 5.6.: Sequenzvergleich von β -Aktin bei *Homo sapiens* (H.s.) und *Xenopus laevis* (X.l.).

Der Sequenzvergleich erfolgte mit clustalW.

5.7. Proteinsequenz des Transkriptionsfaktors IIIA (TFIIIA) von *Xenopus laevis*

1	<u>M</u> AAKVA S TSSEEAEGSLVTEGE M GEKALPVVYKRYI C SFAD C GAAYNKNWKLQAHL C K H T	60
61	GEKPP C KEEG C EKGFTSLHHLTRHSL H TG E KNFT C DS D G C DLRF T TKANM K K H F N RF H	120
121	NIKICVYV C HFEN C GKAFK K HNQLKV H Q F S H TQQLPYE C PHEG C DKR F SLPSRL K R H E K V	180
181	H AGYP C KK D DS C SFVGKTWTLYL K HVAE C HQDLAV C DV C NR K FR H KDYLRD H Q K T H E K E R	240
241	TVYL C PRD G CDRSYTTAFN L RS H I Q S F H E E Q R P FV C E H AG C G K CFAM K SLER H SV V H D P	300
301	E K R K L K E K C P R P K R SLASRLTGYIP P KS E KNASVSGTE K TDSL V KN K PSGT E T N G S L V L	360
361	D K L T I Q	

Abb. 5.7.: *Xenopus laevis*-Transkriptionsfaktor IIIA (TFIIIA).

Der somatische TFIIIA ist um 22 aminoterminale Aminosäuren länger (erstes grau unterlegtes Startmethionin) als der oozyttypische TFIIIA (zweites grau unterlegtes Methionin). Die neun Cys₂His₂-Zinkfinger motive sind unterstrichen dargestellt und die Cystin und Histidin-Aminosäuren rot bzw. blau markiert. Das Kernexportsignal liegt carboxyterminal (rot und fett gedruckt). Grün und fett dargestellt ist ein zweigeteiltes klassisches Kernlokalisationssignal. Die Zinkfinger 3 und 4 sowie 7, 8 und 9 sollen ebenfalls zwei Kernlokalisationssignale darstellen (Wischniewski et al., 2004).

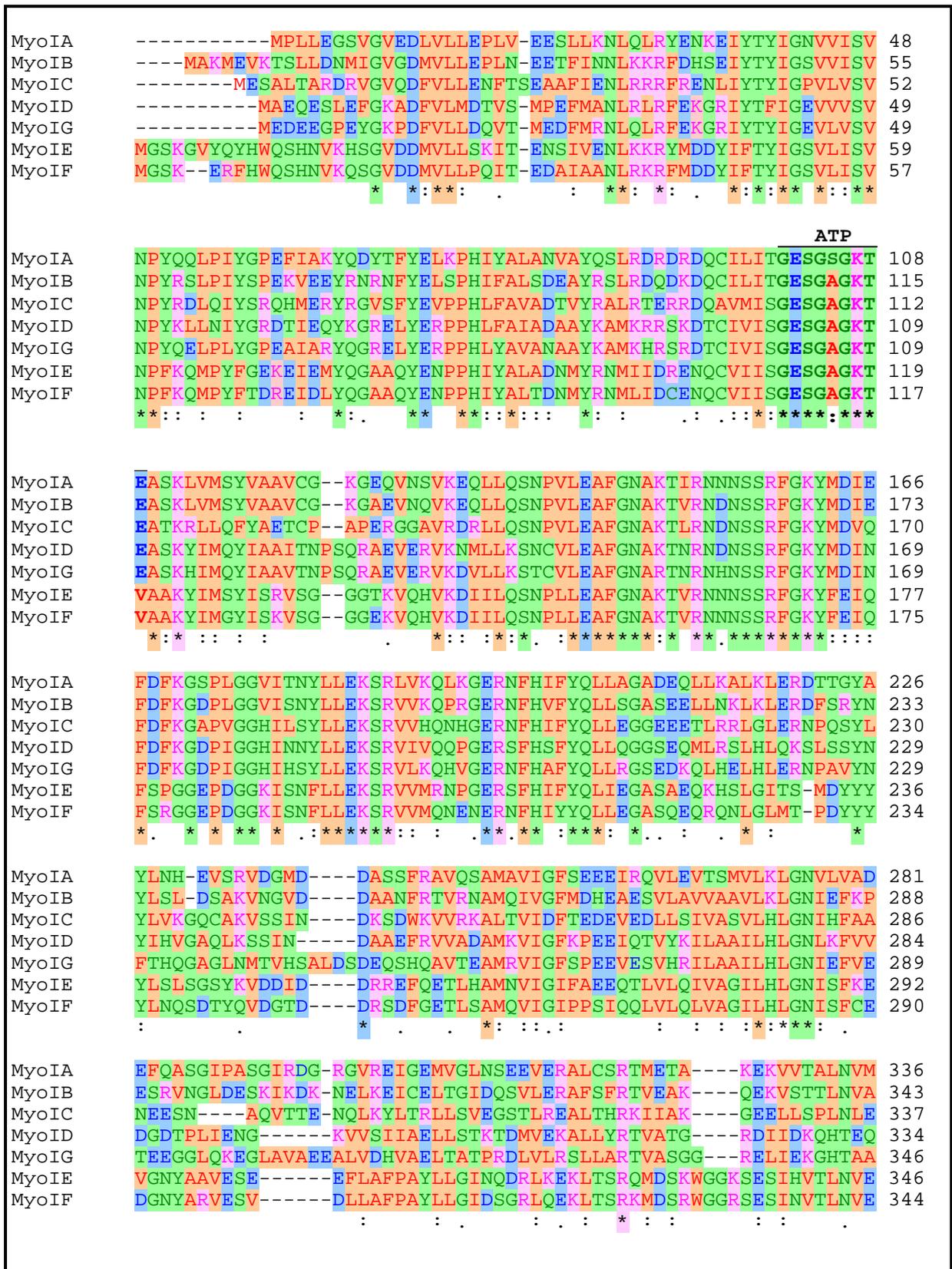
5.8. Sequenzvergleich der 5S rDNA vom somatischen und Oozyten-Typ bei *Xenopus laevis*

som.	1	GCCTACGGCCACACCACCCTGAAAGTGCCCGATCTCGTCTGATCTCGGAAGCCAAGCAGG	60
oo.	1	-----T-----A-----G-TA-----	60
som.	61	GTCGGGCCTGGTTAGTACTTGGATGGGAGACCGCCTGGGAATACCAGGTGTCGTAGGCTT	120
oo.	61	-----C-----	120
som.	121	T	121
oo.	121	-	121

Abb. 5.8.: Sequenzvergleich der 5S rDNA vom somatischen (som.) und Oozyten (oo)-Typ bei *Xenopus laevis*.

Die Sequenz unterscheidet sich an sechs Nukleotidpositionen.

5.9. Multiples Alignment (clustalW) der Myosin I-Familie des Menschen



MyoIA QAQYARDALAKNIYSRLFDWIVNRINESIKVIGIGEK-----KKVMGVLDIYGFEILEDNS 391
 MyoIB QAYYARDALAKNLYSRLFSWLVRINESIKAQTKVR-----KKVMGVLDIYGFEIFEDNS 398
 MyoIC QAAAYARDALAKAVYSRTFTWLVGKINRSLASKDVESPSWRSTTVLGLLDIYGFEVFAQHNS 397
 MyoID EASYGRDAFAKAIYERLFCWIVTRINDIIEVKNYDITIHGKNTVIGVLDIYGFEIFDNNS 394
 MyoIG EASYARDACAKAVYQRLF EWVNRINSVMEPRGRDPRRDGKDTVIGVLDIYGFEVFPVNS 406
 MyoIE QACYTRDALAKALHARVDFLVD SINKAMEKDHEEYN-----IGVLDIYGFEIFQKNG 399
 MyoIF QAAAYTRDALAKGLYARLFDLVEAINRAMQKPQEEYS-----IGVLDIYGFEIFQKNG 397
 : * * ** * * : : * * : : * * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *

MyoIA FEQFVINYNCKLQQVFIEMTLKKEEQEYKREGIPWTKVDYFDNGIICKLIEHNQR--GI 449
 MyoIB FEQFIINYNCKLQQIFIELTLKKEEQEYIREDIEWTHIDYFNNAIICDLIENNTN--GI 456
 MyoIC FEQFCINYNCKLQQLFIELTLKSEQEEYEAEGLAWEPVQYFNNKIICDLVEEKFK--GI 455
 MyoID FEQFCINYNCKLQQLFIQLVLKQEQEYEREGIPWKHIDYFNNNQIIVDLVEQQHK--GI 452
 MyoIG FEQFCINYNCKLQQLFIQLLQEQEYEREGITWQSVVEYFNNTATIVDLVERPHR--GI 464
 MyoIE FEQFCINFVNEKLQQIFIELTLKAEQEEYVQEGIRWTPIEYFNNKIVCDLIENKVNPPGI 459
 MyoIF FEQFCINFVNEKLQQIFIELTLKAEQEEYVQEGIRWTPIQYFNNKVVCDLIENKLSPPGI 457
 **** * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

MyoIA LAMLDEECLRP---GVVSDSTFLAKLNQLFSKHGHYESKVTQNAQRQYDHTMGLSCFRIC 506
 MyoIB LAMLDEECLRP---GTVTDETFLEKLNQVCATHQHFESRMSKCSRFLNDTSLPHSCFRIQ 513
 MyoIC ISILDEECLRP---GEATDLTFLEKLEDTVKHHHPFLT--HKLADQRTKRLSLGRGEFRL 510
 MyoID IAILDDACMN---GKVTDEMFLALNSKLGKHAHFS--RKL CASDKILEFDR-DFRIL 506
 MyoIG LAVLDEACSSA---GTITDRIFLQTLDTTHRHHHLHYTS--RQLCPTDKTMEFGR-DFRIK 518
 MyoIE MSILDDVCATMHAVGEGADQTLQLQKLMQIGSHEHFNS-----WNQGFIIH 505
 MyoIF MSVLDDVCATMHATGGADQTLQLQAAVGTHEHFNS-----WSAGFVIH 503
 : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

MyoIA HYAGKVITYNVTSFIDKNNDLLFRDLLQAMWKAQHPLRLSLFPEGNPKQ-ASLKRPTAGA 565
 MyoIB HYAGKVLVYQVEGFVDKNNDLLYRDL SQAMWKAHALIKSLFPEGNPAK-INLKRPTAGS 572
 MyoIC HYAGEVLYQVTFGLDKNNDLLFRNLKEMTCCSSKNPIMSQCDFRSELS---DKKRPTVAT 567
 MyoID HYAGDVVYSVIGFIDKNKDTLFDKRLMYNSSNPVLKNMWPEGKLSITEVTKRPLTAAT 566
 MyoIG HYAGDVVYSVEGFIDKNRDFLQDFKRLLYNSTDPTLRAMWPDGQDITEVTKRPLTAGT 578
 MyoIE HYAGKVSYDMDGFCERNRDVLFMDLIELMQSSELFPFKSLF PENLQAD--KKGRPTTAGS 563
 MyoIF HYAGKVSYDVSDFCERNRDVLFSDLIELMQTSEQAFLRMLFPEKLDGD--KKGRPSTAGS 561
 **** * * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

Aktin

MyoIA QFKSSVAILMKNLYSKSPNYIRCIKPNNEHQQRGQFSSDLVATQARYLGLLENVRRRAGY 625
 MyoIB QFKASVATLMKNLQTKNPNYIRCIKPNNDKKAHIFNEALVCHQIRYLGLLENVRRRAGY 632
 MyoIC QFKMSLLQLVEILQSKEPAYVRCIKPNDKQKQGRFDEVLRHQVKYLGLLENLRVRRAGF 627
 MyoID LFKNSMIALVDNLASKEPYYVRCIKPNDKKSQPIFDDERC RHQVEYLGLENVRRRAGF 626
 MyoIG LFKNSMVALVENLASKEPFYVRCIKPNEDKVAGKLDENHCRHQVAYLGLLENVRRRAGF 638
 MyoIE KIKKQANDLVSTLMKCTPHYIRCIKPNETKKPRDWEESRVKHQVEYLGLENIRVRRAGY 623
 MyoIF KIKKQANDLVATLMRCTPHYIRCIKPNETKRPRDWEENRVKHQVEYLGLENIRVRRAGF 621
 : * . * : * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

MyoIA AHRQGYGPFLERYRLLSRSTWP-HWNGGDREGVEKVLGELSMSSGELAFGKTKIFIRSPK 684
 MyoIB AFRQAYEPCLERYKMLCKQTWP-HWKGPARGVEVLFNELEIPVEEYSFGRSKIFIRNPR 691
 MyoIC AYRRKYEAFLORYKSLCPETWP-TWAGRPQDGVAVLVRHLGYKPEEYKMGRTKIFIRFPK 686
 MyoID AFRQTYEKFLHRYKMISEFTWPNHDLPSDKAEVKKLIERCGFQD-DVAYGKTKIFIRTPR 685
 MyoIG ASRQPYSRFLRLRYKMTCEYTPWNHLLGSDKAAVSALLEQHGLQG-DVAFGHSKLFI RSPR 697
 MyoIE AYRRIFQKFLORYAILTKATWP-SWQGEKQGVLLHLLQSVNMDSDQFQLGRSKVFIKAPE 682
 MyoIF AYRRQFAKFLORYAILTPETWP-RWRGDERQGVQHLLRAVNMEPDQYQMGSTKVFVKNPE 680
 * * : : * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

IQxxxRGxxxR

MyoIA TLFYLEEQRRLLRQLLATLIQKIYRGWRCRTHYQLMRKSQ--ILISSWFRGNMQKKCYGK 742
 MyoIB TLFKLEDLRKQRLLEDLATLIQKIYRGWRCRTHFLMKKSQ--IVIAAWYRRYAQQKRYQQ 749
 MyoIC TLFATEDALEVRRQSLATKIQAARWGKFWHRQKFLRVKRS--ICIQSWWRGTLGRKKA 744
 MyoID TLFTEELRAQMLIRIVLFLQKVVRRGTLARMRYKRTK----- 722
 MyoIG TLVTEQSRARLPIIIVLLLQKAWRGTLARWRCRRLR----- 734
 MyoIE SLFLLLEMRERKYDGYARVIQKSWRKVAVKRYVQMRREEASDLLLNKKERRRNSINRNFI 742
 MyoIF SLFLLLEVRERKFDGFARTIQKAWRRHVAVRKYEEMREEASNILLNKKERRRNSINRNFI 740
 : * . * : . * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

MyoIA	TKASVLLIQAFVIRGFKAR-----KNYRKYFRSEAAAL	773
MyoIB	TKSSALVIQSYIRGWKARKILRELKHQKRCKEAVTTIAAYWHGTQVRREYRKFFRANAGK	809
MyoIC	RKWAQAQTIIRLLIRGFILR-----HAPRC	767
MyoID	---AALTIIRYRKYVK-----	737
MyoIG	---AIYTIMRWFRRHKVR-----	749
MyoIE	GDYIGMEEHPELQQFVKGREKIDFADTVTKYDRRFKGVKRDLLLPKCLYLIIGREKVKQG	802
MyoIF	GDYLGLEERPELRQFLGKREKRVDFADSVTKYDRRFKPIKRDLLLPKCVYVIGREKVKKG	800
	: :	
MyoIA	TLADFIYKSMVQKFLGLKNNLPSTNVLDKTPAAPYKCLSTANQELQQLFYQWKCKRFR	833
MyoIB	KIYEFTLQRIYQKYFLEMKNKMPSLSPIDKNWPSRPYFLDSTHKEKRIHFLWRCKKYR	869
MyoIC	PENAFFLDHVRTSFLNLRRLQLP-RNVLDTSWPTPP-PALREASELLRELCKINMVWKYC	825
MyoID	---SYIHEVARRFHGVKT---MRDYGKHVKWVSPK-KVLRFFEEALQIFNRWRASQLI	789
MyoIG	---AHLAELQRRFQAARQ---PPLYGRDLVWPLPP-AVLQPFQDTCHALFCRWRARQLV	801
MyoIE	PKGLVKEVLKRIEIERILSVSLTMQDDIFILHEQFYDSLLESVFKTEFLSLLAKRYE	862
MyoIF	PEKGQVCEVLKKKVDIQALRGVSLSTRQDDFFILQEDAADSFLSVFKTEFVSLCKRFE	860
	: . : :	
MyoIA	DQLSPKQVEILREKICASELFGK-----ASYPQSVPIPFQDYIGLQ---	877
MyoIB	DQFTDQQLIYEEKLEASELFGDK-----ALYPSSVGPQFQAYLEIN---	913
MyoIC	RSISPEWKQQLQKAVASEIFKGGK-----DNYPQSVPRLFISTRGLTD---	869
MyoID	KSIPASDLQVRAKVAAMELKGQR-----ADLG--LQRAWEGNYLASKPDT	834
MyoIG	KNIPPSDMPQIKAKVAAMGALQGLR-----QDWG--CRRAWARDYLSSATDN	846
MyoIE	EKTQKQLPLKFSNTLELKLKKNWGPWSAGGSRQVQFHQGFGLAVLKPNSKVLQVSIQIP	922
MyoIF	EATRRLPLPLTFSDTLQFRVKKEGWG---GGTRS SVTFSRFGGLAVLKVGGRTLTVSVGD	917
	. : :	
MyoIA	---GNPKLQKLGEEGP-----VLMAEAVKKVNRGNGKTSSRILLLLTKGHVI	922
MyoIB	---KNPKYKLLKDAIEEK-----IIIAEVVKNINRANGKSTRIFLLTNNLL	958
MyoIC	---EIS-PRVLQALGSEP-----IQYAVPVVKYDRKGYKPRSRQLLTPNAVAV	913
MyoID	PQTSQTFVVPVANELKRKDKYM-----NVLFSCHVRKVNRFKSKVEDRAIFVTPDRHLY	885
MyoIG	PTASSLFAQRLKTLRDKDGF-----AVLFSHVVRKVNRFHKIRNRALLLTDQHLI	897
MyoIE	GLPKNSRPTRRNTTQNTGYSSGTQANYPVRAAPPPP-GYHQNGV---IRNQYVPYPHAP	978
MyoIF	GLPKSSKPTRKGMAGKPRRS---SQAPTRAAPAPPRGMDRNGVPPSARGGPLLEIMS	973
	. : *	
MyoIA	LTDTKK-SQAKIVIGLDNVAGVSVTSLKD-----GLFSLHLSSEMSSVSGSKGD-FLLV	972
MyoIB	LADQKS-GQIKSEVPLVDVTKVSMSQND-----GFFAVHLKEGSEAAASKGD-FLFS	1008
MyoIC	IVED---AKVKQRIDYANLTGISVSSLS-----SLFVLHVQR-ADNKQKGD-VVLQ	960
MyoID	KMDPTKQYKVMKTIPLYNLTGLSVSNGKD-----QLVVFHTKDNKDLIVCLFSKQPT	937
MyoIG	KLDPDRQYRVMRAVPLEAVTGLSVTSGD-----QLVVLHARGQDDLVLVCLHRSRPP	949
MyoIE	G--SQRSNQKSLYTSMARPPLPQQSTSSDRVSQTPESLDFLKVDPQGAAGVRRQTTSRP	1036
MyoIF	GGGTHRPPRGPPSTSLGASRRPRRPPSE-----HNTEFLNVPDQGMAGMQRKRSVGG	1026
	: :	
MyoIA	SEHVIPELLTKMYRAVLDAQORQLTIVTVEKFSVRFKENSVAVKVQGPAGGDNSKLRYYK	1032
MyoIB	SDHLIEMATKLYRITLSQTKQKLNIEISDEFLVQFRQDKVCVKFIQGNQK-NGSVPTCKR	1067
MyoIC	SDHVIETLTKT-----ALSANRVNSININQGSITFAGGPRDGTIDFTPG--SELLITKA	1013
MyoID	HESRIGELVGVLVNHFKSEKRHLQVNVTPVQCSLHGKKTCTVSVETRLNQ--PPDFTKN	995
MyoIG	LDNRVGEVGVLAACHQGEGRTELEVRVSDCIPLSHRGVRRLLISVEPRPEQ--PEPDFRCA	1007
MyoIE	PPAGGRPKPQPKPKPQVPQCKALYAYDAQDTDELSFNANDIIDIKEDPSGWWTGRLRGK	1096
MyoIF	RPVPGVGRPKPQPRTHGPRCRALYQYVGQVDLELSFNVNEVIEILMEDPSGWWKGRHLHGQ	1086
	. : :	
MyoIA	KGSHCLEVIVQ----	1043
MyoIB	KNNRLLVAVP----	1078
MyoIC	KNGHLAVVAPRLNSR	1028
MyoID	RSGFILSVPGN----	1006
MyoIG	RGSFTLLWPSR----	1018
MyoIE	QGLFPNNYVTKI----	1108
MyoIF	EGLFPGNVVEKI----	1098
	..	

Abb. 5.9.: Multiples Alignment (clustalW) der Myosin I-Familie des Menschen. Markiert sind ATP- und Aktin-Bindungsstelle in der Kopfdomäne und IQ-Motive in der Halsregion.

6. DISKUSSION

In eukaryotischen Zellen stellen Transkription und Translation eine funktionelle Einheit dar, obwohl die Transkription und die Ribosomengenese räumlich von der Translation getrennt sind. Die Kernhülle fungiert als Barriere zwischen Zellkern und Zytoplasma, die über ihre Kernporenkomplexe bidirektional überwunden werden muss. Dies bietet zum Beispiel den Vorteil zusätzlicher Regulation der Genexpression sowie der Qualitätskontrolle von Transkripten. Neu synthetisierte RNA-Transkripte binden entsprechend ihrer RNA-Klasse an Proteine und verlassen den Zellkern über unterschiedliche Exportwege. Durch die Analyse des nukleozytoplasmatischen Transportes viraler RNA konnten auch für den Kernexport zellulärer Transkripte wertvolle Erkenntnisse gewonnen werden. Ausgehend von der Identifizierung des leucinreichen Exportsignals beim HIV-1 kodierten Protein Rev (Fischer et al., 1995) und des entsprechenden zellulären Exportfaktors CRM1 (Fornerod et al., 1997) sind mittlerweile zahlreiche Proteine bekannt, darunter viele Shuttelproteine, die leucinreiche Exportsignale besitzen und CRM1-vermittelt exportiert werden. Andererseits führte der Nachweis eines so genannten konstitutiven Transportelements (CTE) bei einfachen Retroviren (Bray et al., 1994) letztendlich zum Exportfaktor TAP (Grüter et al., 1998), der den Export der meisten zellulären mRNAs CRM1-unabhängig vermittelt.

Ein wichtiger zellulärer Kofaktor beim HIV-1-Rev-vermittelten Export von späten HIV-1-Transkripten via CRM1 ist das zelluläre Protein eIF5A (Ruhl et al., 1993). Bemerkenswerterweise enthält eIF5A eine Hypusinmodifikation, die bislang noch in keinem anderen Protein gefunden wurde. Die Entwicklung von Hypusininhibitoren könnten neue antivirale Therapiemöglichkeiten eröffnen. Ein neuer Desoxyhypusin-Hemmer (CNI-1493) wurde bereits viel versprechend an peripheren Blutmonozyten von HIV-1-infizierten Patienten getestet. Die Virusreplikation konnte deutlich gesenkt werden, wobei in Zellkulturen kein offensichtlicher Viabilitätsnachteil zu Tage getreten ist (Hauber et al., 2005). Hypusininhibitoren könnten auch für die Therapie BCR/ABL-positiver Leukämien interessant werden. Durch eine Philadelphia-Translokation t(9;22)(q34;q11) wird ein BCR/ABL-Fusionsgen mit der Expression eines Onkogens mit Tyrosinkinaseaktivität generiert. Hypusininhibitoren (Ciclopirox, CPX; N¹-guanyl-1,7-diaminoheptan, GC7) führten zu einem selektiven antiproliferativen Effekt in BCR-ABL-positiven Zellen (Balabanov et al., 2007). Dennoch birgt eine systemische Therapie Risiken durch die Beeinträchtigung zellulärer Funktionen von eIF5A. Wünschenswert ist daher eine gute Kenntnis der zellulären Bedeutung des eIF5A.

6.1. Die HRE-Sekundärstruktur und die Proteine HuR und eIF5A werden für den CRM1-vermittelten Export der CD83 mRNA benötigt

Der Oberflächenrezeptor CD83 wird auf reifen dendritischen Zellen exprimiert. Während der Reifung dendritischer Zellen ist die Expression des hypusinmodifizierten Proteins eIF5A stark erhöht. Durch den Einsatz des Hypusininhibitors GC7 in dendritischen Zellen konnte die CD83 mRNA im Zellkern angereichert und folglich die Oberflächenexpression von CD83 verhindert werden. Aufgrund der Identifikation von eIF5A als essentiellen Kofaktor beim Rev-vermittelten HIV-1-RNA-Export wurde eine Funktion auch beim nukleozytoplasmatischen Transport von CD83 mRNA in Betracht gezogen (Kruse et al., 2000).

HuR ist ein ubiquitär exprimiertes Mitglied der ELAV-Familie („*Embryonic Lethal Abnormal Vision*“) RNA-bindender Proteine (Ma et al., 1996). Es ist beschrieben, dass das Protein HuR bei bestimmten mRNAs AU-reiche Sequenzen innerhalb der 3'-untranslatierten Region erkennt und diese mRNAs stabilisiert (Brennan und Steitz, 2001). HuR interagiert ebenfalls mit der CD83 mRNA, und zwar innerhalb der kodierenden Sequenz. Dieser Bereich (Nukleotide 466-615) weist eine ausgeprägte Sekundärstruktur auf (Prechtel et al., 2006) und wird daher *Stem-Loop-2-Element* (SL2), *HuR-Response-Element* (HRE) oder auch posttranskriptionelles regulatorisches Element (PRE) genannt. Allerdings führt die Bindung von HuR an das *HuR-Response-Element* nicht zu einer Stabilisation der RNA (Prechtel et al., 2006). Andererseits besitzen zwei der Interaktionspartner von HuR, APRIL und PP32, leucinreiche Exportsignale. Mittels dieser Interaktionspartner soll HuR beim CRM1-vermittelten Export von *c-fos* mRNA beteiligt sein (Brennan et al., 2000). Aufgrund dieser Daten wurde ein Komplex mit Transportfunktion aus CD83 mRNA, HuR, CRM1 und mindestens einem der Proteine APRIL und PP32 vermutet.

Xenopus laevis-Oozyten zeichnen sich neben ihrer leichten Gewinnbarkeit durch eine hohe Anzahl von Kernporenkomplexen aus. Aufgrund ihrer Größe lassen sie sich durch Mikroinjektion manipulieren und manuell in Zellkern- und Zytoplasmafraktion trennen. Daher wurde der Export humaner CD83 mRNA mithilfe von *Xenopus laevis*-Oozyten genauer analysiert.

Grundsätzlich muss diskutiert werden, ob sich die Erkenntnisse aus Exportversuchen mit humaner CD83 mRNA in *Xenopus*-Oozyten auch auf humane dendritische Zellen übertragen lassen. Ein dem CD83 vergleichbares Protein existiert bei *Xenopus laevis* nämlich nicht, überdies differiert das Immunsystem bei Frosch und Mensch. Werden für Exportstudien einzelne Proteine oder Transkripte in Oozyten injiziert und deren Exportkinetik untersucht, muss die Anwesenheit aller zum Export benötigten Faktoren vorausgesetzt werden. Darüber hinaus sollten diese *Xenopus*-Proteine in der Lage sein, humane Proteine oder Transkripte zu erkennen und zu verarbeiten. Je ähnlicher sich Proteine

verschiedener Spezies in den funktionsrelevanten Bereichen sind, umso größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass sie das jeweilige Protein der anderen Spezies auch funktionell ersetzen können. Abgesehen von CD83 konnten bei *Xenopus laevis* Äquivalente zu allen im CD83 mRNP-Exportkomplex vermuteten Komponenten gefunden werden. Hoch konserviert ist eIF5A, dessen humane Aminosäuresequenz mit der *Xenopus*-Sequenz zu 100 Prozent identisch ist (Tab. 4.1.). Ebenso wiesen humanes und aus *Xenopus* stammendes CRM1, Ran, Aktin und HuR jeweils sehr große Homologie auf (97, 98, 99 und 92 Prozent identische Aminosäuren). Die bislang unbekanntenen *Xenopus*-Äquivalente für APRIL und PP32 enthielten immerhin noch 80 bzw. 81 Prozent identische und 89 bzw. 91 Prozent ähnliche Aminosäuren (Tab. 4.1.). Außerdem zeigte das Kernprotein RanBP3 von Mensch und *Xenopus laevis* 69 % identische und 84 % ähnliche Aminosäuren (Tab. 4.1.).

Mikroinjektionsexperimente mit *Xenopus*-Oozyten zeigten einerseits, dass die charakteristische Sekundärstruktur der CD83-HRE-RNA für einen effizienten nukleozytoplasmatischen Export benötigt wird (Abb. 4.1.1.; Abb. 4.1.2.). Transkripte, die nicht in der Lage waren, eine *Stem-Loop*-Konfiguration auszubilden, wurden nicht vom Zellkern in das Zytoplasma transportiert. Andererseits konnte durch die Injektion von ELAV- und eIF5A-Antikörper oder den Einsatz des CRM1-Inhibitors Leptomycin B der nukleozytoplasmatische Export von CD83-HRE-Transkripten inhibiert werden (Abb. 4.1.2. und 4.1.3.). Hieraus konnte eine Beteiligung der Proteine HuR, eIF5A und CRM1 am Export der CD83-HRE-RNA abgeleitet werden.

Obwohl HuR innerhalb seines RNA-Erkennungsmotiv 1 (RRM1) eine leucinreiche HIV-1-Rev-NES-ähnliche Sequenz aufweist (Abb. 4.1.6.), kann HuR ohne Adapterprotein nicht mittels CRM1 exportiert werden (Brennan et al., 2000). Zwar werden viele leucinreiche Exportsignale durch die Sequenz [LIVFM]-X(2-3)-[LIVFM]-X(2-3)-[LIVFM]-X-[LIVFM] beschrieben, dennoch fungieren viele Sequenzen, die in dieses Schema passen, nicht als Exportsignal (la Cour et al., 2004). Oft besteht das Exportsignal aus einer α -Helix, zumindest im Aminoterminus, was auch für die leucinreiche Sequenz von HuR der Fall ist (Abb. 4.1.7.). Charakteristischerweise finden sich in funktionellen leucinreichen Exportsignalen neben den Leucinen jedoch gehäuft die Aminosäuren Glutaminsäure (E), Asparaginsäure (D) und Serin (S). Während diese Aminosäuren in den leucinreichen Bereichen von APRIL und PP32 vorkommen, ist keine dieser Aminosäuren innerhalb der leucinreichen Sequenz von HuR zu finden (Tab. 4.2.). Dies könnte der Grund sein, warum die leucinreiche Sequenz bei HuR nicht als Exportsignal fungiert.

Eine andere mögliche Erklärung hierfür könnte jedoch auch die Maskierung des Signals durch die Interaktion des RNA-Erkennungsmotiv 1 des HuR mit Transkripten sein. Ein exzellentes Beispiel für eine Maskierung leucinreicher Exportsignale liefert die Telomerase, ein Enzym, das zur *de novo* Telomersynthese in der Lage ist. Die funktionsfähige Telomerase setzt sich aus dem RNA-Template

hTR (humane Telomerase RNA) und der katalytischen Untereinheit hTERT (humane Telomerase reverse Transkriptase) zusammen. hTERT und sein Bindungspartner 14-3-3 besitzen je eine HIV-1-Rev-ähnliche leucinreiche Sequenz (hTERT: **MRRK****L**FGV**LRL**; 14-3-3: **I**MQL**L**RDN**LTL**). Bindet das Protein 14-3-3 an das hTERT, ist das Exportsignal sowohl des hTERT als auch von 14-3-3 maskiert. Eine Interaktion mit CRM1 ist nun nicht mehr möglich, weshalb hTERT im Zellkern verbleibt. Die Interaktion von 14-3-3 mit hTERT reguliert somit posttranslational die Telomeraseaktivität (Seimiya et al., 2000).

Mittels RNA-Interferenz-Studien ist es zwischenzeitlich gelungen, Hinweise für die Beteiligung des HuR-Bindungspartners APRIL am Export von CD83 mRNA in somatischen Zellen zu liefern (Fries et al., 2007). Durch *Knockdown* von APRIL, nicht jedoch von PP32, konnte in COS-Zellen eine nukleoplasmatische Anreicherung ektopter CD83 mRNA sowie eine verringerte CD83-Proteinexpression beobachtet werden. In Jurkat-T-Zellen war nach APRIL-Silencing die Menge der endogenen CD83 Transkripte im Zytoplasma ebenfalls verringert. Des Weiteren konnte eine der drei leucinreichen Rev-ähnlichen Sequenzen von APRIL als Exportsignal identifiziert werden (Aminosäuren 109-120, LKKLECLKSLDL)(Fries et al., 2007). Außerdem soll die Phosphorylierung des Threonin an Position 244 (Thr²⁴⁴) den nukleozytoplasmatischen Export von APRIL triggern. Sowohl das Exportsignal als auch die Phosphorylierung des Thr²⁴⁴ von APRIL scheinen für die CD83-Expression notwendig zu sein (Fries et al., 2007).

eIF5A ist evolutionär hoch konserviert, es kommt in hypusinylierter Form bei Eukaryoten und Archebakterien vor (Gordon et al., 1987; Bartig et al., 1992). Dies lässt auf eine alte und grundlegende Funktion in der Zelle schließen. Hypusinhaltiges eIF5A ist in der Lage, direkt an RNAs zu binden, die die putativen Interaktionselemente UAACCA und AAAUGU besitzen (Xu et al., 2004). Die CD83 mRNA enthält keine dieser beiden Konsensussequenzen (siehe 4.1.7.). Allerdings sind auch RNAs bekannt, die mit eIF5A interagieren und kein putatives eIF5A-interagierendes Element aufweisen. Ein Kennzeichen dieser RNAs ist die Ausformung extensiver Sekundärstrukturen (Xu et al., 2004). Das *Stem-Loop*-konfigurierte *Rev-Response*-Element der HIV-1-RNA wird hypusinabhängig von eIF5A gebunden (Liu et al., 1997). Da das CD83-HRE ebenfalls *Stem-Loop*-Elemente aufweist (Prechtel et al., 2006), könnte daher die CD83 mRNA trotz des Fehlens eines putativen eIF5A-interagierenden Elements eine Kandidaten-RNA für die hypusinabhängige Bindung darstellen.

Neben CRM1 interagiert eIF5A auch mit einem Exportrezeptor aus der Importin- β -Familie, dem Exportin 4. Im Gegensatz zu CRM1 ist Exportin 4 jedoch nicht in Hefezellen vorhanden. Obwohl eIF5A sehr viel schlechter an CRM1 als an Exportin 4 binden soll (Lipowsky et al., 2000), konnte in Bindungsexperimenten die Interaktion von eIF5A mit CRM1 demonstriert werden (Abb. 4.1.12.)(Rosorius et al., 1999; Hofmann et al., 2001). Eine Hypusinmodifikation war hierfür nicht

erforderlich. Sowohl in somatischen Zellen (Rosorius et al., 1999) als auch in Oozyten (Hofmann et al., 2001) konnte der Export eines eIF5A ohne Hypusinmodifikation mit dem CRM1-Inhibitor Leptomycin B gehemmt werden. Für die Bindung von eIF5A an den Exportfaktor Exportin 4 soll Hypusin jedoch erforderlich sein (Lipowsky et al., 2000). In höheren Eukaryoten scheint eIF5A somit sowohl ohne Beteiligung von Hypusin über CRM1 als auch hypusinabhängig mittels Exportin 4 in das Zytoplasma transportiert zu werden.

Beim Export von CD83-Transkripten sind verschiedene Funktionen des eIF5A denkbar:

Zwar steht mit APRIL bereits ein Adapterprotein mit einem leucinhaltigen Exportsignal zwischen HuR und CRM1 zur Verfügung. Doch um ein effizientes Zerfallen des Exportkomplexes zu gewährleisten, weisen leucinreiche Exportsignale nur eine schwache Bindungsaffinität zu CRM1 auf (Kutay und Güttinger, 2005). eIF5A, dessen Bindungsaffinität zu CRM1 ebenfalls gering ist (Lipowsky et al., 2000), könnte durch seine Interaktion sowohl mit dem Exportsubstrat als auch mit CRM1 die Bindung des Exportsubstrates an den Exportrezeptor verstärken.

Des Weiteren könnte eIF5A zur Stabilisierung des Exportkomplexes führen, indem es mit Beteiligung des Hypusins an die CD83 mRNA bindet und außerdem mit HuR (Abb. 4.1.11.) sowie hypusinunabhängig mit CRM1 (Abb. 4.1.10.) interagiert.

Die carboxyterminale Domäne von eIF5A weist strukturelle Ähnlichkeiten mit dem bakteriellen Kälteschockprotein CspA auf, daher wäre alternativ auch eine Funktion des eIF5A als Chaperone denkbar (Xu et al., 2001), wobei es ein Transkript vom Zellkern in das Zytoplasma bis zu den Ribosomen begleitet.

Andererseits interagiert eIF5A mit Kernaktin, welches generell an Exportprozessen beteiligt zu sein scheint (Hofmann et al., 2001). Durch eIF5A könnte der Exportkomplex eine Bindungsstelle für Kernaktin bereitstellen. Ein Modell für einen solchen potentiellen Exportkomplex ist in Abb. 6.1. dargestellt.

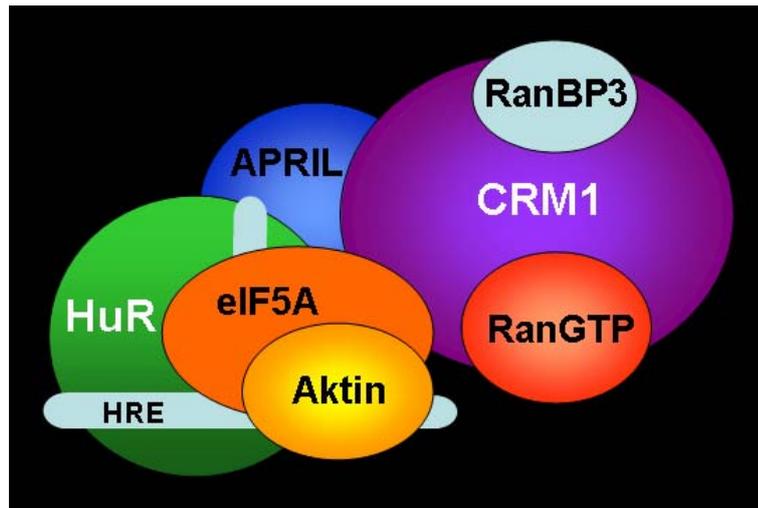


Abb. 6.1.: Schematische Darstellung eines möglichen CD83-HRE-RNA-Exportkomplexes.

HuR bindet an CD83-HRE, APRIL, eIF5A und CRM1. CRM1 interagiert mit APRIL, eIF5A und Ran. Kernaktin ist ein Bindungspartner von eIF5A.

Die Mehrzahl der zellulären mRNAs werden unter Beteiligung der Exportfaktoren TAP/NXT1 exportiert. Um einen effizienten nukleozytoplasmatischen Transport spezieller Transkripte zu gewährleisten, wäre die Umgehung des regulären Exportweges durchaus sinnvoll. Der Oberflächenrezeptor CD83 ist, ein Kennzeichen reifer dendritischer Zellen, nimmt eine überaus wichtige Funktion bei der T-Zell-vermittelten Immunität ein (Lechmann et al., 2001).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Export von CD83-Transkripten jedoch durch den spezifischen CRM1-Inhibitor Leptomycin B gehemmt werden konnte (Abb. 4.1.3.). Dies steht in Einklang mit kürzlich veröffentlichten Daten aus Jurkat-T-Zellen (Schütz et al., 2006). Hier konnte eine Reihe von Transkripten identifiziert werden, welche CRM1-vermittelt exportiert werden, unter anderem auch CD83 mRNA. Des Weiteren existieren Daten über den CRM1-abhängigen Export spezieller Transkripte, z. B. von *c-fos*- (Brennan et al., 2000), Cyclooxygenase-2- (Jang et al., 2003) und Interferon- α 1-Transkripten (Kimura et al., 2004). Diese Transkripte besitzen in ihrer 3' untranslatierten Region (3'-UTR) *cis*-aktive Sequenzelemente, so genannte AU-reiche Elemente (ARE). HuR bindet an diese AREs und führt zur Stabilisierung der Transkripte (Dixon et al., 2001; Fan und Steitz 1998b; Peng et al., 1998). Jedoch konnte für die Interferon- α 1-Transkripte demonstriert werden, dass eine Deletion der 3'UTR den Kernexport dieser mRNA nicht verhindert (Kimura et al., 2004). Es ist daher davon auszugehen, dass der Kernexport nicht durch die Bindung von HuR an das ARE in der 3'UTR vermittelt wird. Möglicherweise besitzen Transkripte von *Early Response* Genen in der kodierenden Sequenz Bereiche mit charakteristischen Sekundärstrukturen oder anderen charakteristischen Sequenzmotiven, welche den Export vermitteln. Inwiefern HuR neben der

Interaktion am ARE in der 3'UTR zur Stabilisation auch den Kernexport dieser Transkripte reguliert, bleibt noch zu klären.

Des Weiteren scheint HuR neben der Stabilisierung und dem Export von bestimmten Transkripten auch die Translation zu beeinflussen. So wurde eine erhöhte Expression des Tumorsuppressorgens p53 nach Induktion eines DNA-Schadens durch UVC-Bestrahlung in humanen Koloncarcinomzellen beschrieben. Dieser Effekt war nicht durch eine verstärkte Transkription, Erhöhung der Stabilität oder erhöhte zytoplasmatische p53 mRNA Level zu erklären, sondern durch eine Steigerung der Translation. Ergebnisse aus Bindungsstudien wiesen darauf hin, dass die Steigerung der Translation durch die Interaktion von HuR an die 3'UTR von p53-Transkripten vermittelt wird (Mazan-Mamczarz et al., 2003).

6.2. eIF5A ist am Export des Transkriptionsfaktors IIIA (TFIIIA) in *Xenopus*-Oozyten beteiligt

Ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung von eIF5A bei bestimmten zellulären RNA-Exportprozessen kommt aus dem TFIIIA-vermittelten Export der 5S rRNA in *Xenopus*-Oozyten. Als Bindungspartner von eIF5A wurde in *Xenopus*-Oozyten der oozytentypische Transkriptionsfaktor IIIA (TFIIIA) identifiziert (Doktorarbeit W. Hofmann, 2002). Oozytentypischer TFIIIA ist in jungen *Xenopus*-Oozyten sowohl bei der RNA-Polymerase III-abhängigen Transkription von 5S rRNA als auch am nukleozytoplasmatischem Export und der Lagerung von 5S rRNA im Zytoplasma beteiligt (Engelke et al., 1980, Wolffe und Brown, 1988; Wischnewski et al., 2004). TFIIIA besitzt ein leucinreiches Exportsignal, das funktionell das Exportsignal von HIV-1-Rev ersetzen konnte (Fridell et al., 1996). Außerdem war die an BSA-gekoppelte leucinreiche Rev-Aktivierungsdomäne in der Lage, kompetitiv den Export der 5S rRNA zu inhibieren (Fischer et al., 1995).

In *Xenopus*-Oozyten konnte TFIIIA nach SDS-PAGE und Westernblot in der Fraktion der Kernhüllenproteine nachgewiesen werden (Abb. 4.2.2.). Es lokalisiert an den nukleoplasmatischen Filamenten der Kernporenkomplexe (Abb. 4.2.3. und 4.2.5.). Die Vermutung, TFIIIA wird aufgrund seines leucinreichen Kernexportsignals mittels CRM1 transportiert, konnte durch den Einsatz des spezifischen CRM1-Inhibitors Leptomycin B bestätigt werden. Sowohl ein TFIIIA-NES-Fusionsprotein als auch endogener TFIIIA wurde nach Leptomycin-Gabe im Oozytenkern angereichert (Abb. 4.2.6.). In Bindungsstudien wurde TFIIIA als Interaktionspartner von eIF5A identifiziert (Hofmann, 2002). Eine Interaktion von TFIIIA und eIF5A konnte in dieser Arbeit mittels Overlay-Blot-Assay bestätigt werden (Abb. 4.2.9.). Dabei zeichnete sich ab, dass eIF5A bei Zusatz von Faktoren aus dem Oozytenextrakt besser an TFIIIA bindet (Abb. 4.2.9.). Über die Art dieser

Faktoren kann bislang nur spekuliert werden. Denkbar ist, dass durch die Interaktion von 5S rRNA an TFIIIA die Bindung von eIF5A verstärkt wurde. Dies könnte einerseits durch eine Konformationsänderung des TFIIIA bewirkt sein, welche die Affinität zu eIF5A erhöht. Andererseits ist ebenso eine Interaktion der 5S rRNA mit eIF5A denkbar, wodurch möglicherweise der Komplex aus TFIIIA, 5S rRNA und eIF5A stabilisiert wird. Da sowohl TFIIIA als auch eIF5A mit CRM1 interagieren, könnte auch die Bindung von CRM1 an das Exportsignal von TFIIIA die Interaktion von TFIIIA und eIF5A beeinflussen.

Es gibt Hinweise dafür, dass das leucinreiche Sequenzmotiv des HIV-1-Rev für eine funktionelle Rev-eIF5A-Interaktion benötigt wird (Ruhl et al., 1993). In Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass eIF5A mit HuR (Abb. 4.1.11.) und mit TFIIIA (Abb. 4.2.9.) interagiert, beide Proteine besitzen wie HIV-1-Rev einen leucinreichen Sequenzbereich. eIF5A scheint jedoch nicht an allen CRM1-vermittelten Exportprozessen von Proteinen mit einem leucinhaltigen Exportsignal beteiligt zu sein. Denn beim Export des Proteinkinaseinhibitors PKI spielt eIF5A offensichtlich keine Rolle, da eIF5A-Antikörper den GST-PKI-NES-Export in somatischen Zellen nicht hemmen konnten (Elfgang et al., 1999). Möglicherweise ergibt sich diese Diskrepanz aus der Funktion der Proteine. PKI bindet und exportiert die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A, hat aber keine Funktion beim RNA-Export. HIV-1-Rev, TFIIIA und HuR hingegen sind in einen RNA-Export involviert. Die Vermutung liegt daher nahe, dass eIF5A einen generellen Kofaktor beim CRM1-vermittelten RNA-Export darstellt.

6.3. Kernmyosin IC ist in *Xenopus laevis* für die Transkription ribosomaler und proteinkodierender Transkripte essentiell und beeinflusst möglicherweise Exportprozesse

Neben CRM1 (Abb. 4.1.12.), HuR (Abb. 4.1.11.), und TFIIIA (Abb. 4.2.9.) ist Kernaktin ebenfalls ein Bindungspartner von eIF5A (Hofmann et al., 2001). Grundlegende Erkenntnisse für die Beteiligung von Aktin bei der Transkription (Scheer et al., 1984) als auch beim nukleozytoplasmatischen Export (Hofmann et al., 2001) resultierten aus Experimenten mit Amphibienoozyten. Weil lange Zeit Zweifel an der Existenz von Aktin und Myosin im Zellkern bestanden, wurden schrittweise viele Argumente der Kritiker entkräftet. So konnte beispielsweise dem Argument der zytoplasmatischen Kontamination durch saubere Isolation von Zellkernen aus Amphibienoozyten begegnet werden (Clark und Merriam, 1977). Darüber hinaus gelang durch die Entwicklung neuer Antikörper letztendlich die Darstellung von Aktin im Zellkern somatischer Zellen (Gonsior et al., 1999). Weiterhin wurden spezielle Funktionen im Zellkern, wie die Beteiligung bei der Transkription proteinkodierender Gene (Scheer et al., 1984) und der Chromosomenkondensation (Rungger et al., 1979) entdeckt. Da traditionellerweise

Aktin und Myosin nur als Motorkomplex akzeptiert wurde, stand mit der Verifizierung von Myosin im Zellkern (Nowak et al., 1997) schließlich der Aktinpartner zur Verfügung. Weil Amphibienoozyten entscheidende Erkenntnisse zur Aufklärung von Kernaktinfunktionen geliefert haben, bot sich das Modellsystem *Xenopus*-Oozyte daher auch für die Analyse von Kernmyosinaufgaben an.

Kernmyosin IC gehört zur Myosin I-Familie von nichtfilamentären, unkonventionellen Myosinen. Bioinformatisch konnte in dieser Arbeit das Myosin IC und Kernmyosin IC bei *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Bos taurus*, *Gallus gallus* und den Amphibien *Xenopus laevis* und *Xenopus tropicalis* identifiziert werden (Abb. 4.3.1.). Bei *Drosophila melanogaster* und *Arabidopsis thaliana* war es nicht zu finden. Dies steht im Einklang mit einer kürzlich veröffentlichten Studie (Kahle et al., 2007). Dort wurde Kernmyosin IC außer bei den in dieser Arbeit gefundenen Organismen noch bei *Canis familiaris*, *Danio rerio*, *Fugu rubripes* und *Tetraodon nigroviridis* identifiziert werden. Kein passendes Protein konnte beim Urchordaten *Ciona intestinalis*, bei *Drosophila* oder bei *C. elegans* gefunden werden. (Kahle et al., 2007). Dies lässt darauf schließen, dass Kernmyosin IC während der Vertebratenentwicklung erworben wurde. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen von β -Aktin (Tab. 4.1.) bzw. Kernmyosin IC (Tab. 4.3.2.) von Mensch und glattem Krallenfrosch unterstreicht die hohe Übereinstimmung der Proteine bei diesen beiden Spezies. β -Aktin von Mensch und *Xenopus laevis* zeigten 99 Prozent identische Aminosäuren. Kernmyosin IC von Mensch und *Xenopus laevis* wiesen 78 Prozent identische und 95 Prozent ähnliche Aminosäuren auf.

Kernmyosin IC unterscheidet sich von Myosin IC durch einen zusätzlichen aminoterminalen Bereich aus 16 Aminosäuren. Obwohl dieser 16-Aminosäuren lange Aminoterminus kein bislang bekanntes Kernlokalisationsmotiv beinhaltet, fungiert er dennoch als Kernlokalisierungssignal (Abb. 4.3.5.). Auffallend sind drei basische Residuen an Position 2, 4 und 14 innerhalb dieser Aminoterminussequenz. An den Positionen 4 und 14 befand sich in allen bioinformatisch untersuchten Organismen ein Arginin. Das Arginin an Position 2 bei Mensch, Nagern und Rind ist bei Huhn und Krallenfröschen durch ein Lysin ersetzt (Abb. 4.3.1.). Die basischen Aminosäuren Arginin und Lysin sind als charakteristische Bestandteile von Kernlokalisierungssignalen bekannt.

Es konnten polyklonale und monoklonale Antikörper gegen das Kernmyosin IC von *Xenopus laevis* generiert werden. Polyklonale Antikörper XNMIC gp30 und monoklonale Antikörper XNMIC #54 erkannten den spezifischen Aminoterminus des *Xenopus*-Kernmyosin IC (Abb. 4.3.9.) In somatischen *Xenopus*-Zellen lokalisierte Kernmyosin IC vorwiegend im Nukleoplasma (Abb. 4.3.10. a; 4.3.13. a). Allerdings konnte es in manchen Zellen auch im Zytoplasma detektiert werden, wo es keine Filamentstruktur, sondern ein punktförmiges Muster aufwies (Abb. 4.3.13. b). Angedeutet war ebenfalls die Lokalisation in der Zellperipherie. Diese Beobachtung im Zytoplasma stimmt mit der

Verteilung von Myosin IC überein (Wagner et al., 1992; Ruppert et al., 1995). Myosin IC war in Säugerzellen bevorzugt in der Zellperipherie lokalisiert und zeigte ein eher punktuelltes Muster (Wagner et al., 1992; Ruppert et al., 1995).

Anders war das Bild bei der Verwendung des Kernmyosin-Antikörpers XNMIC #42 (Abb. 4.3.15). Dessen Epitop befindet sich nicht innerhalb des 16-Aminosäuren-Aminoterminus, sondern im aminoterminalen Bereich des Myosinkopfes (Aminosäuren 17 bis 240). In diesem Bereich liegt auch die ATP-Bindungsstelle (Aminosäuren 120 bis 129). Der Antikörper XNMIC #42 erkennt zwar auch das Kernmyosin IC (Abb. 4.3.9.). Da aber Kernmyosin IC zur nichtfilamentbildenden Myosin I-Klasse gehört, ist aufgrund des filamentartigen Färbemusters im Zytoplasma somatischer Zellen anzunehmen, dass der Antikörper XNMIC #42 neben Kernmyosin IC zusätzlich filamentbildende Vertreter anderer Myosinklassen detektiert.

Kernmyosin IC konnte in somatischen mitotischen *Xenopus*-Zellen zwar in der Teilungsfurche detektiert werden, aber es war dort im Vergleich zu anderen extrachromosomalen Bereichen nicht angereichert (Abb. 4.3.10. c und 4.3.13. c). Für Myosin IC ist ein ähnliches Verteilungsmuster in mitotischen Säugetierzellen beschrieben. Während sich Myosin IB deutlich in der Teilungsfurche anreicherte, war Myosin IC dagegen punktförmig in der gesamten sich teilenden Zelle, exklusive der Chromosomenbereiche, lokalisiert (Ruppert et al., 1995).

Auffallend war in der Immunfluoreszenz mit Antikörpern, die das Kernmyosin IC erkennen, die Färbung der so genannten mitochondrialen Wolke in prävitellogenen *Xenopus*-Oozyten (Abb. 4.3.11.; 4.3.14.; 4.2.16.). Die mitochondriale Wolke, auch Balbiani-Körper genannt, ist ein zytoplasmatisches Organell in prävitellogenen *Xenopus*-Oozyten (Stadium I). Lokalisiert ist dieses sphärische Organell in Kernnähe auf der Seite der Oozyte, die später zum vegetativen Pol wird. Die mitochondriale Wolke besteht aus etwa einer halben Million Mitochondrien, mehreren hundert Keimgranula und einigen lokalisierten RNAs, die in den Keimgranula, in deren Peripherie oder außerhalb der Keimgranula zu finden sind (siehe 1.4.1.3.). In reifen *Xenopus*-Oozyten sind bestimmte RNAs am vegetativen oder animalen Kortex angereichert.

In *Xenopus*-Oozyten existieren zwei Wege, um die vegetative RNA zum vegetativen Kortex zu bringen. Der so genannte frühe Lokalisierungsweg oder METRO („*Message Transport Organizer*“) für die vegetativen Keimplasma-RNAs benützt die mitochondriale Wolke als Vehikel. Zunächst gelangen Keimplasma-RNAs ohne aktive Bewegung und ohne Beteiligung von Mikrotubuli durch Diffusion zur mitochondrialen Wolke, wo sie eingefangen werden. Für das Einfangen der RNAs soll ein Netzwerk aus endoplasmatischem Retikulum (ER) verantwortlich sein, das die mitochondriale

Wolke durchzieht (Chang et al., 2004). Bislang konnte aber noch kein Protein identifiziert werden, das die Interaktion der Keimplasma-RNAs mit dem ER vermittelt.

Denkbar ist, dass das Kernmyosin IC als Bestandteil der Ribonukleopartikel an die Keimplasma-RNAs assoziiert. Hinweise für eine Assoziation von Kernmyosin mit RNA, möglicherweise als Bestandteil von Ribonukleoproteinkomplexen gibt es bereits. In RNase- behandelten HeLa-Zellen konnte im Zellkern im Nukleoplasma und im Nukleolus kaum noch Kernmyosin nachgewiesen werden (Fomproix und Percipalle, 2004). Aufgrund seiner Eigenschaften, mit der Schwanzdomäne elektrostatisch mit Membranen zu interagieren (Doberstein und Pollard 1992; Reizes et al., 1994), könnte das Kernmyosin IC durchaus ein Linkerprotein zwischen RNA und ER-Netzwerk darstellen.

Ungeklärt ist bislang, durch welchen Mechanismus die mitochondriale Wolke in Richtung Kortex gezogen wird. Ob das Kernmyosin IC auch hier eine Rolle spielt, ist fraglich. Mittlerweile gibt es zwar durchaus Hinweise auf eine Motorfunktion von Kernmyosin im Zellkern. Zum einen bei der Translokation von Chromosomen nach Transkriptionsaktivierung (Chuang et al., 2006), zum anderen bei der rDNA-Transkription (Ye et al., 2008). Aber in diesen Fällen interagiert Kernmyosin tatsächlich mit Aktinfilamenten. Mikrofilamente und Mikrotubuli spielen bei der Verlagerung der mitochondrialen Wolke jedoch keine Rolle (Kloc und Etkin 1995). Dotterschollen und eine sich vergrößernde Zytoplasmamasse könnten die mitochondriale Wolke vom Zellkern weg in Richtung Kortex drücken (Wilk et al., 2004).

Des Weiteren war Kernmyosin IC an den lateralen Schleifen der Lampenbürstenchromosomen von *Xenopus*-Oozyten nachweisbar (Abb. 4.3.32, 4.3.33., 4.3.34.). Das Muster ähnelte dem der RNA-Polymerase II, die ebenfalls an den lateralen, transkriptionell aktiven Schleifen der Lampenbürstenchromosomen lokalisiert (Abb. 4.3.33.). Wie bereits erwähnt, konnte in HeLa-Zellen eine Assoziation von Kernmyosin IC mit RNase sensitiven Strukturen dargestellt werden (Fomproix und Percipalle, 2004). In Bestätigung dieser Beobachtung konnte Kernmyosin IC mit den durch BrUTP-markierten naszierenden Transkripten kolokalisiert werden (Abb. 4.3.35.). Nach Hemmung der Transkription durch Actinomycin D waren einerseits die lateralen Schleifen der Lampenbürstenchromosomen nicht mehr sichtbar, andererseits konnte das Kernmyosin IC nun nicht mehr an den Chromosomen nachgewiesen werden (Abb. 4.3.35.). Somit ist anzunehmen, dass Kernmyosin IC zu den aktiven Transkriptionsstellen rekrutiert wird.

Die monoklonalen Antikörper gegen den spezifischen Aminoterminus bzw. gegen die Kopfdomäne von Kernmyosin IC führten nach Mikroinjektion in den Zellkern von *Xenopus*-Oozyten zu einer kompletten Retraktion der meisten lateralen transkriptionsaktiven Schleifen sowie zu einer Verkürzung der Chromosomenachsen (Abb. 4.3.36., 4.3.37). Derselbe Effekt wurde nicht nur nach

Inkubation mit Transkriptionshemmern (Abb. 4.3.35.; Scheer et al., 1984), sondern auch nach Injektion von RNA-Polymerase II-Antikörpern sowie durch die Injektion von Aktinantikörpern und bestimmten Aktin-bindenden Proteinen in Pleurodeles-Oozyten beobachtet (Scheer et al., 1984). Da Antikörper gegen das Kernmyosin IC die mRNA-Transkription unterdrücken konnten, wurde eine essentielle Rolle des Kernmyosin IC bei der RNA-Polymerase II-abhängigen Transkription vermutet. Dies steht im Einklang mit vor kurzem veröffentlichten Daten aus menschlichen Zellkulturzellen. Nach Mikroinjektion von Kernmyosinantikörpern in HeLa-Zellen konnte die Transkription gehemmt werden, was sich durch einen fehlenden BrUTP-Einbau in injizierte Zellen äußerte. Darüber hinaus konnte auch in einem in-vitro-Transkriptionssystem die Beteiligung von Kernmyosin IC bei der RNA-Polymerase II-abhängigen Transkription dargestellt werden (Hofmann et al., 2006b).

Aktin und Myosin sind an verschiedenen Stellen im Polymerase II-abhängigen Transkriptionsprozess beteiligt. Die bislang einzige gesicherte Motorfunktion üben Myosin und Aktin hierbei bei der Verlagerung von Chromosomenabschnitten nach Transkriptionsaktivierung aus (Chuang et al., 2006). Dieser aktive Transport von Chromosomenabschnitten in das Kerninnere geschieht durch eine Wechselwirkung zwischen Aktin und Myosin, und zwar unabhängig von deren Beteiligung bei der Transkription. Versuche mit verschiedenen Aktinmutanten haben gezeigt, dass hierbei nicht Aktinmonomere, sondern Filamente beteiligt sind (Chuang et al., 2006).

Bei der Transkriptionsinitiation nehmen Aktin und Myosin unterschiedliche Aufgaben wahr. Während Aktin für die Bildung des Präinitiationskomplexes benötigt wird, ist Myosin für den darauffolgenden Schritt, die Knüpfung der ersten Phosphodiesterbindung, essentiell (Hofmann et al., 2004; Hofmann et al., 2006b).

An wenigen nicht retrahierten kurzen Schleifen der Lampenbürstenchromosomen war nach Injektion von Kernmyosinantikörpern noch eine Transkription möglich, welche durch den Einbau von BrUTP abgebildet werden konnte (Abb. 4.3.38.). Erste Hinweise auf eine Beteiligung von Kernmyosin IC an der RNA-Polymerase III-abhängigen Transkription gibt es bereits, allerdings wurde Kernmyosin nur an 5S rRNA- und 7SL-Genen, nicht jedoch an tRNA-Genen gefunden (Grummt, 2006). Bei den in dieser Arbeit gesehenen, durch Kernmyosin IC-Antikörper nicht retrahierbaren Schleifen in Telomernähe könnte es sich daher um tRNA-kodierende Schleifen handeln. Die RNA-Polymerase III ist an etwa 90 spezifischen Transkriptionsstellen an den Lampenbürstenchromosomen von *Xenopus laevis* zu finden (Murphy et al., 2002). Die etwa 24 000 5S rRNA-Gene pro haploidem Genom sind in der Nähe der Telomere der langen Chromosomenarme von 16 der 18 *Xenopus*-Chromosomen lokalisiert. Die Verteilung der etwa 7800 bis 9600 tRNA Gene pro haploidem Genom ist weitgehend unklar, bekannt ist lediglich ein Cluster in der Nähe des Telomers des langen Armes eines kurzen akrozentrischen Chromosoms sowie ein Cluster auf einem anderen Chromosom.

Die Beobachtung von Kernmyosin IC in Nukleolen von somatischen *Xenopus*-Zellen (Abb. 4.3.10) führte zur Analyse von Kernmyosin IC in den amplifizierten Nukleolen der *Xenopus*-Oozyten. Während die Struktur der amplifizierten Nukleolen mit der Struktur somatischer Nukleolen vergleichbar ist (Mais und Scheer, 2000), zeichnen sich die amplifizierten Nukleolen zudem durch ihre Anzahl, ihre Größe, den hohen rDNA-Gehalt und ihre hohe transkriptionelle Aktivität aus. Nach Spreitung des Kerninhaltes von Oozyten sind zahlreiche amplifizierte Nukleolen mit einer so genannten Halskettenstruktur, dem Kernbereich aus fibrillärem Zentrum (FC) und dichter fibrillärer Komponente (DFC), zu sehen, die in den Kortex (GC) eingebettet ist. In amplifizierten Nukleolen kann die RNA-Polymerase I im FC detektiert werden. Dagegen ist Fibrillarin, welches in die Prozessierung und Modifikation von prä-rRNA und in die Zusammenlagerung von rRNA mit ribosomalen Proteinen involviert ist (Tollervey et al., 1993), ein charakteristisches Protein des DFC (Mais und Scheer, 2001). Kernmyosin IC konnte in dieser Arbeit in den amplifizierten Nukleolen hauptsächlich in der Kernregion nachgewiesen werden und zeigte hier sowohl eine partielle Kolokalisation mit der RNA-Polymerase I, den durch Bromuridintriphosphat gekennzeichneten naszierenden Transkripten, als auch mit Fibrillarin (Abb. 4.3.22.).

Eine Transkriptionshemmung mit Actinomycin D äußert sich in einer massiven Kondensation des rDNA-Chromatins und der Segregation von FC und DFC in Kappen an einem GC-Körper, die viele ihrer originären Proteine und RNA-Komponenten beinhalten (Shav-Tal et al., 2005). Nach Transkriptionshemmung mit Actinomycin D segregierte Kernmyosin IC zusammen mit der RNA-Polymerase I und rDNA (Abb. 4.3.23.). Eine neue Studie hat gezeigt, dass Aktin und Myosin auch nach Hemmung der Transkription durch Actinomycin D mit der rDNA assoziieren (Ye et al., 2008). Die in den amplifizierten Nucleolen gemachte Beobachtung einer Kolokalisation von Kernmyosin IC und der rDNA spiegelt dies wider (4.3.23.).

Die Darstellung des Kernmyosins IC im Nucleolus unbehandelter und Actinomycin D-behandelter somatischer *Xenopus*-Zellen gelang jedoch nicht in jeder Zelle. Dies könnte am unterschiedlichen Aktivitätszustand der Zellkulturzellen liegen, wobei Kernmyosin möglicherweise nur in den transkriptionell aktivsten Zellen in nachweisbarer Menge im Nucleolus vorlag. In Zellen mit geringer Transkriptionstätigkeit konnte es möglicherweise aufgrund der geringen Menge nicht detektiert werden. Dies ist vereinbar mit der Beobachtung von Kysela et al. (2005), dass die Kernmyosin IC-Expression im Gegensatz zur Aktin-Expression nach Stimulation von humanen Lymphozyten aus dem peripheren Blut mit Phytohämagglutinin (PHA) stark ansteigt (Kysela et al., 2005).

Die Ribosomengenesese ist ein vektorielles Prozess, der von der Transkriptionsstelle bis zu den GCs, dem Nucleoplasma und schließlich Cytoplasma verläuft. Wird dieser Prozess an einer Stelle unterbrochen, werden Intermediärformen angereichert (Olson und Dundr, 2005). Die Störung der

Ribosomenbiogenese spiegelt sich auch optisch in der Nukleolus-Architektur wider. Zudem weiß man aus der Transkriptionshemmung durch Actinomycin D, dass die Segregation schrittweise vonstatten geht. Zunächst kondensieren die fibrillären Komponenten und wandern in die Nukleolusperipherie, dann formen die nukleolären Komponenten den Zentralkörper und die daran assoziierten Kappen. Im Zentralkörper befinden sich Proteine, die aus der GC Region stammen, und die teilweise, wie das Protein B23, progressiv aus dieser Region entlassen werden (Hernandez-Verdun, 2006).

Die Mikroinjektion von Kernmyosinantikörpern in die Zellkerne von *Xenopus*-Oozyten zeigte ebenfalls einen dramatischen Effekt auf die Architektur der amplifizierten Nukleolen (Abb. 4.3.24. und 4.3.25.), der aber nur teilweise an die Segregation Actinomycin D-behandelter Nucleolen erinnerte. Während die DFCs kondensiert wirkten, erschienen die FC-Regionen oftmals noch aufgelockert und umgaben die DFCs meist ringförmig. Bei manchen Nukleolen war eine Ablösung der GC-Region zu beobachten (Abb. 4.3.28.). Trotzdem konnten mittels BrUTP-Einbau noch naszierende Transkripte als Ausdruck einer aktiven Transkription in den FC-Regionen dieser amplifizierten Nukleolen nachgewiesen werden (Abb. 4.3.29.). In somatischen *Xenopus*-Zellen hingegen konnte durch die Injektion von Kernmyosinantikörper die RNA-Polymerase I-abhängige Transkription in den Nukleolen gehemmt werden.

In Mikroinjektionsversuchen mit Aktinantikörpern in Pleurodeles-Oozyten wurde ebenfalls eine Hemmung der Transkription proteinkodierender Gene beobachtet, während eine Transkription in den Nukleolen noch stattfand (Scheer et al., 1984). In somatischen Zellen hingegen konnte durch die Injektion von Aktinantikörpern eine BrUTP-Inkorporation im Nukleolus inhibiert werden. In vielfältigen Experimenten *in vitro* und *in vivo* wurde zudem demonstriert, dass Aktin in der Tat ein essentieller Bestandteil der RNA-Polymerase I-abhängigen Transkription darstellt (Philimonenko et al., 2004, Ye et al., 2008).

Warum die FC-Regionen in den amplifizierten Nukleolen nicht kondensieren, und die Transkription im Vergleich zu den somatischen Zellen nicht zum Erliegen kommt, ist unklar. Es ist unwahrscheinlich, dass Aktin und Myosin bei der RNA-Polymerase I-abhängigen Transkription in somatischen Zellen eine Rolle spielen, nicht aber in den transkriptionell hoch aktiven amplifizierten Nukleolen. Im Gegensatz zur RNA-Polymerase II-abhängigen Transkription scheinen weder Aktin noch Myosin bei der Transkriptionsinitiation im Nukleolus erforderlich zu sein. Weder die Depletion von Aktin noch von Myosin konnte die Transkription der ersten drei Nukleotide verhindern (Philimonenko et al., 2004; Percipalle et al., 2006). Denkbar ist daher, dass die BrUTP-Inkorporation, die nach Injektion von Kernmyosin-Antikörper in *Xenopus*-Oozyten noch zu sehen war, auf diese Trimerherstellung beruht.

In somatischen Nucleolen von Säugerzellen wurde außerdem beobachtet, dass viele Proteine den Nucleolus durchtreten können, auch solche, die keine Aufgabe im Nucleolus wahrnehmen. Nur Proteine, die eine Interaktion im Nucleolus eingehen, zeigen eine höhere Verweildauer (Olson und Dunder, 2005). Die RNA-Polymerase I-Transkriptionsmaschinerie selbst ist ein hochdynamischer Proteinkomplex. Einzelne Komponenten wandern ständig zwischen den Transkriptionsstellen, dem Nucleolus und dem Nucleoplasma. Dabei ist die Zusammenlagerung der Transkriptionsmaschinerie ein sehr ineffektiver Prozess. Während die Anlagerung von RNA-Polymerase I-Untereinheiten an einen rDNA-Promoter mit einer 50 prozentigen Trefferquote noch hoch ist, kommt es nur in ein bis elf Prozent auch zur Initiation und Elongation. Ein Recycling findet nicht als RNA-Polymerase-Holoenzymkomplex statt, sondern der Komplex dissoziiert und assoziiert erneut an einer weiteren Transkriptionsstelle (Dunder et al., 2002). Während der Mitose bleiben nur bestimmte Faktoren, wie die rekrutierende Polymerase-Untereinheit RPA43 sowie UBF an den Nucleolus-Organisator-Regionen. Selbst RNA-Polymerase-Untereinheiten wie RPA16, RPA20, RPA39/40 und RPA194 dissoziieren von den NORs während der Mitose (Chen et al., 2005; Leung et al., 2004). Denkbar ist, dass in Nucleolen somatischer Zellen und in transkriptionell hochaktiven amplifizierten Nucleolen der Oozyten bezüglich der Transkriptionseffizienz Differenzen bestehen. Ein verbessertes Recycling der Transkriptionsmaschinerie bzw. auch deren Subkomplexe könnte die Transkriptionseffizienz in amplifizierten Nucleolen steigern. Eine stabilere oder längerdauernde Interaktion von Bindungspartnern könnte hier jedoch zu einer Maskierung des Antikörperepitops im Kernmyosin führen, während in somatischen Zellen das Kernmyosin durch die ständige Dissoziation und Assoziation der Transkriptionsmaschinerie für die Bindung von Antikörpern besser zugänglich ist.

Weiterhin fiel bei der Immunfluoreszenz auf Oozytengefrierschnitten die Anfärbung der Kernhülle auf (Abb. 4.3.11.; 4.3.14. und 4.3.16.). Diese Beobachtung konnte durch die Detektion von Kernmyosin IC auf handisolierten Kernhüllen von *Xenopus*-Oozyten bestätigt werden. Kernmyosin IC reicherte sich an den nukleoplasmatischen Filamenten der Kernporenkomplexe an (Abb. 4.3.18.). Ein ähnliches Lokalisationsmuster wurde für Aktin beschrieben (Hofmann et al., 2001). Aktin, vermutlich in einer Form aus kurzen Polymeren, ist ein essentieller Kofaktor sowohl beim viralen RNA-Export via CRM1 und TAP als auch beim CRM1-vermittelten nicht RNA-assoziierten Proteinexport (Hofmann et al., 2001).

Antikörper gegen ein Epitop innerhalb der aminoterminalen 16 Aminosäuren von Kernmyosin IC (XNMIC #54) waren jedoch nicht in der Lage, den CRM1-vermittelten GST-TFIIIA-NES-Proteinexport zu inhibieren (Abb. 4.3.19.). Im Gegensatz dazu konnte dieser Proteinexport mit nach Mikroinjektion von Antikörpern gegen ein Epitop in der aminoterminalen Myosinkopfdomäne (XNMIC #42) inhibiert werden (Abb. 4.3.19.). Der Grund für diese Diskrepanz ist noch unklar. Da der Kernmyosinantikörper (XNMIC #42) vermutlich neben dem Kernmyosin IC noch weitere Vertreter

der Myosinfamilie erkennt, ist möglicherweise nicht Kernmyosin IC, sondern ein anderes, ebenfalls im Kern vorkommendes Myosin, bei Exportprozessen beteiligt.

Kernmyosin IC scheint nicht das einzige nukleäre Myosin zu sein. Mittlerweile konnte auch Myosin VI im Zellkern identifiziert werden (Vreugde et al., 2006). Myosin VI weist mehrere putative Kernlokalisierungssignale auf und lokalisiert mit naszierender mRNA und der RNA-Polymerase II. Durch Interferenz-RNA bzw. inhibitorische Antikörper konnte die RNA-Polymerase II-abhängige Transkription gestört werden. Mittels Chromatinimmunpräzipitation wurde demonstriert, dass Myosin VI an den Promoter und die intergenischen Regionen aktiver Gene rekrutiert wird (Vreugde et al., 2006). Myosin VI ist durch eine einzigartige Motorfunktion charakterisiert. Es ist das einzige Myosin, welches zum Minusende von Aktinfilamenten wandert, außerdem ist die Schrittgröße unerwartet groß und variabel. Eine Beteiligung von Myosin VI bei Exportprozessen wurde bislang jedoch noch nicht untersucht.

Des Weiteren könnte auch eine Maskierung von Epitopen eine Rolle spielen. Aus der rDNA-Transkription gibt es Hinweise auf unterschiedliche Konformationen von Kernmyosin IC, welche nicht mit allen spezifischen Kernmyosinantikörpern erkannt werden (Ye et al., 2008). Es ist daher nicht ausgeschlossen, dass bei Exportprozessen strukturelle Besonderheiten des Kernmyosin IC auftreten, welche nur von bestimmten Kernmyosinantikörpern erkannt werden.

Über die Funktion einer potentiellen Aktin-Myosin-Interaktion bei Exportkomplexen kann bislang nur spekuliert werden. Aktin wurde als Bestandteil von RNP-Partikeln identifiziert, wobei es Transkripte vom Transkriptionsort in das Zytoplasma begleitete (Percipalle et al., 2001). In dieser Arbeit wurde allerdings keine RNA als Exportsubstrat, sondern ein TFIIIA-NES-Fusionsprotein benützt. Es wurde aber gezeigt, dass dieses Fusionsprotein unter Beteiligung von eIF5A exportiert wird (Abb. 4.2.10.), welches wiederum Aktin binden kann (Hofmann et al., 2001).

Mittlerweile gibt es einige Anhaltspunkte dafür, dass Aktin und Myosin im Zellkern in einer ähnlichen Weise miteinander agieren wie im Zytoplasma (Chuang et al., 2006; Ye et al., 2008). Im Zytoplasma kann Myosin in einem zyklischen Prozess mit Aktin interagieren und unidirektional Kraft generieren. ATP reduziert hierbei die Affinität des Myosinkopfes für Aktin. Durch ATP-Hydrolyse kommt es zu einer Konformationsänderung, wodurch der Myosinkopf verlagert wird. Der Myosinkopf bindet nun erneut an Aktin und geht in seine ursprüngliche Position zurück, was letztendlich ein Entlanggleiten von Myosin und Aktin bewirkt.

Da das Kernmyosin IC eine Aktinbindungsstelle in der Kopfdomäne besitzt, könnte es über eine Interaktion mit Aktin am Exportkomplex verankert werden. Der intranukleäre Transport selbst geht

durch Diffusion vonstatten, bis der Exportkomplex Kernporenkomponenten kontaktiert (Poltz et al., 1999; Poltz et al., 2006). Die hydrophoben FG-Wiederholungen bestimmter Nukleoporene könnten außer mit den Exportfaktoren zusätzlich mit der hydrophoben IQ-Domäne des Kernmyosin IC interagieren. Durch eine Verankerung von Kernmyosin an Nukleoporinen und eine Interaktion mit Aktin wäre ein aktiver Transport durch den Kernporenkanal denkbar. Bisher gibt es zwar noch keine Anhaltspunkte für eine Interaktion von Kernmyosin und Nukleoporinen. Jedoch konnte vor kurzem Emerin, ein integrales Kernhüllenprotein, als direkter Interaktionspartner von Kernmyosin identifiziert werden (Holaska und Wilson, 2007).

Ein weiterer Schritt bei der Aufklärung von Kernmyosinfunktionen wäre die Herstellung von wildtypischem, rekombinanten *Xenopus*-Kernmyosin IC sowie von Kernmyosin IC-Mutanten. Nach Applikation von Antikörpern gegen Kernmyosin IC konnten in dieser Arbeit Beeinträchtigungen der Polymerase I- und II-abhängigen Transkription, strukturelle Veränderungen der Nukleolen und der Lampenbürstenchromosomen sowie die Hemmung eines Kernexportprozesses beobachtet werden. Um die Funktion des Kernmyosins hier näher zu charakterisieren, könnte ein Rescueversuch mit rekombinantem Kernmyosin IC bzw. verschiedenen Mutanten durchgeführt werden. Insbesondere für die Analyse der Exportblockade interessant ist hierbei eine Mutante mit einer fehlenden Schwanzdomäne sowie Mutanten, die die Interaktion des Kernmyosin mit ATP bzw. Aktin beeinträchtigen. Da über die Interaktion von Kernmyosin IC und Nukleoporinen bisher keine Daten vorliegen, könnten Bindungsstudien, wie zum Beispiel eine Immunpräzipitation mit rekombinantem Kernmyosin IC und Kernhüllenproteinen aus *Xenopus*-Oozyten hierüber weiter Aufschluss geben.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Der eukaryotische Initiationsfaktor 5A (eIF5A) ist evolutionär hoch konserviert und besitzt als einzig bislang bekanntes Protein die Aminosäuremodifikation Hypusin. eIF5A fungiert als essentieller Kofaktor beim Rev- und CRM1-vermittelten nukleozytoplasmatischen Export von HIV-1-Transkripten. Des Weiteren besitzen Hypusininhibitoren einen antiproliferativen Effekt in BCR/ABL-positiven Leukämiezellen. Obwohl eIF5A ubiquitär exprimiert wird, sind die zellulären Funktionen von eIF5A noch weitgehend unklar.

Da Hypusininhibitoren die CD83 mRNA im Zellkern dendritischer Zellen anreichern und folglich die Oberflächenexpression von CD83 verhindern konnten, wurde eine Beteiligung von eIF5A beim nukleozytoplasmatischen Export der CD83 mRNA vermutet. Weiterhin ist bekannt, dass HuR, ein Protein der ELAV-Familie, an ein cis-aktives RNA-Element mit einer ausgeprägten Sekundärstruktur innerhalb der kodierenden Sequenz der CD83 mRNA bindet. Während die Bindung von HuR an AU-reiche Elemente in der 3'UTR bestimmter Transkripte zu deren Stabilisierung führt, wird die Stabilität von CD83-Transkripten durch die Interaktion mit HuR jedoch nicht beeinflusst.

In dieser Arbeit wurden Mikroinjektionsstudien in *Xenopus laevis*-Oozyten zum nukleozytoplasmatischen Export von CD83 mRNA durchgeführt. Abgesehen vom Oberflächenrezeptor CD83 konnte allen potentiell am Export von CD83-Transkripten beteiligten humanen Faktoren Homologe bei *Xenopus laevis* gegenübergestellt werden. Diese zeigten mit 69 bis 100 Prozent identischen bzw. 84 bis 100 Prozent ähnlichen Aminosäuren eine hohe Übereinstimmung zu ihren homologen humanen Proteinen. Es konnte gezeigt werden, dass die charakteristische Sekundärstruktur des HuR-Response-Elements essentiell für den Kernexport von CD83-Transkripten ist. HuR wurde zudem als Bindungspartner von eIF5a identifiziert. Inhibitorische Antikörper sowohl gegen HuR als auch eIF5A waren in der Lage, den Export von CD83-Transkripten zu inhibieren. Während die meisten mRNAs durch den TAP/NXT1-vermittelten Exportweg in das Zytoplasma transportiert werden, transloziert CD83 mRNA CRM1-vermittelt, da der Export durch den CRM1-Inhibitor Leptomycin B gehemmt werden konnte.

Oozytentypischer TFIIIA, ebenfalls ein Interaktionspartner von eIF5A, ist in jungen *Xenopus*-Oozyten sowohl bei der RNA-Polymerase III-abhängigen Transkription von 5S rRNA als auch am nukleozytoplasmatischem Export und der Lagerung von 5S rRNA im Zytoplasma beteiligt. Aufgrund der Parallele zwischen dem HIV-1-Rev vermittelten HIV-1-mRNA-Export und dem TFIIIA-vermittelten 5S rRNA-Export, wurde der Export von TFIIIA im Hinblick auf eine Beteiligung von eIF5A als Kofaktor analysiert.

In *Xenopus*-Oozyten wurde TFIIIA an den nukleoplasmatischen Filamenten der Kernporenkomplexe detektiert. Weiterhin konnte durch den Einsatz des spezifischen CRM1-Inhibitors Leptomycin B bestätigt werden, dass TFIIIA, welches ein leucinreiches Kernexportsignal enthält, mittels CRM1 exportiert wird. Im Overlay-Blot-Assay konnte gezeigt werden, dass eIF5A mit TFIIIA interagiert. Außerdem deuten Mikroinjektionsexperimente darauf hin, dass eIF5A, wie beim HIV-1-Rev-vermittelten Export, auch beim TFIIIA-Export als essentieller Kofaktor involviert ist.

Ein weiterer bekannter Bindungspartner von eIF5A ist Aktin, das im Zellkern an verschiedenen Exportprozessen sowie der RNA-Polymerase I-, II- und III-abhängigen Transkription beteiligt ist. Im Gegensatz zu Aktin wurde die Existenz des Aktinpartners Myosin im Zellkern erst vor kurzem realisiert. Kernmyosin IC gehört zur Myosin I-Familie von nichtfilamentären, unkonventionellen Myosinen.

In dieser Arbeit konnten durch bioinformatische Analysen gezeigt werden, dass Kernmyosin IC bei Vertebraten weit verbreitet ist. Es wurde auch bei *Xenopus laevis* identifiziert. Im Vergleich zu Myosin IC fand sich ein zusätzlicher Aminoterminus aus 16 Aminosäuren, welcher als Kernlokalisierungssignal fungiert. Mit spezifischen Antikörpern konnte Kernmyosin IC in somatischen *Xenopus*-Zellen vorwiegend punktförmig im Nukleoplasma, aber auch im Nukleolus lokalisiert werden. In Oozyten von *Xenopus laevis* konnte Kernmyosin IC, ähnlich wie RNA-Polymerase II, an den lateralen Schleifen der Lampenbürstenchromosomen dargestellt werden. Inhibierende Kernmyosinantikörper führten nach Mikroinjektion in den Zellkern von *Xenopus*-Oozyten zu einer kompletten Retraktion der meisten lateralen transkriptionsaktiven Schleifen sowie zu einer Verkürzung der Chromosomenachsen. In amplifizierten Nukleolen konnte Kernmyosin IC vor allem im Nukleoluskern detektiert werden, wo es partiell mit RNA-Polymerase I und Fibrillarin kolokalisierte. Eine Transkriptionshemmung mit Actinomycin D führte zu einer Umverteilung des Kernmyosin IC zusammen mit der RNA-Polymerase I und der rDNA. Nach Injektion inhibierender Kernmyosinantikörper kam es zu einem massiven architektonischen Umbau der Nukleolen. Im Gegensatz zu den Nukleolen von somatischen *Xenopus*-Zellen war ein BrUTP-Einbau in amplifizierte Nukleolen jedoch noch möglich.

Wie für Kernaktin bereits beschrieben, konnte auch Kernmyosin IC an den nukleoplasmatischen Filamenten der Kernporenkomplexe von *Xenopus laevis*-Oozyten dargestellt werden. Da Aktin als essentieller Kofaktor an Exportprozessen beteiligt ist, sollte in Mikroinjektionsexperimenten auch eine Beteiligung von Kernmyosin IC beim Kernexport überprüft werden. Antikörper gegen ein Epitop in der Myosinkopfdomäne des Kernmyosin IC (XNMIC #42) waren im Gegensatz zu Antikörpern, die den charakteristischen Aminoterminus aus 16 Aminosäuren erkennen (XNMIC #54), in der Lage, einen CRM1-vermittelten Proteinexport zu inhibieren.

7. SUMMARY

Eucaryotic initiation factor 5A (eIF5A), an evolutionary highly conserved protein, is the only protein known to contain the unique amino acid modification hypusine. eIF5A acts as an essential cofactor in Rev and CRM1 mediated nucleocytoplasmic Export of HIV-1 transcripts. Furthermore, hypusin inhibitors exhibit an antiproliferative effect in BCR/ABL expressing leukemic cells. Even if eIF5A is ubiquitous expressed, cellular functions of eIF5A remain widely obscure.

Hypusine inhibitors are able to enrich CD83 transcripts in the cell nucleus of dendritic cells and subsequently prevent surface expression of CD83. Therefore, a role of eIF5A in nucleocytoplasmic export of CD83 mRNA was supposed. Furthermore, HuR, a member of the ELAV family, binds CD83 transcripts on a specific *cis*-active RNA element, which forms a characteristic secondary structure. Whereas binding of HuR on AU-rich elements in the 3'-UTR of certain transcripts leads to their stability, binding of HuR on CD83 transcripts in the coding region does not.

In this thesis, microinjection experiments were performed in *Xenopus laevis* oocytes to elucidate the nucleocytoplasmic export of CD83 mRNA. Above from surface receptor CD83, all human factors potentially forming the CD83 mRNA export complex have counterparts in *Xenopus laevis*. With 69 to 100 per cent identical and 84 to 100 per cent similar amino acids, these human and *Xenopus* homologues exhibit high similarity. The characteristic secondary structure of the HuR response element could be demonstrated as crucial for the nucleocytoplasmic export of CD83 transcripts. Furthermore, HuR could be identified as a binding partner of eIF5A. Inhibitory antibodies against both HuR and eIF5A were able to inhibit nuclear export of CD83 mRNA. While the bulk of cellular mRNAs leaves the nucleus with the aid of TAP/NXT1, CD83 mRNA is exported via the CRM1-mediated pathway, as could be demonstrated by export inhibition using specific CRM1 inhibitor leptomycin B.

Oocyte type TFIIIA, another interaction partner of eIF5A, promotes RNA-Polymerase III-dependent transcription, nucleocytoplasmic translocation as well as storage of 5S rRNA in immature *Xenopus* oocytes. Due to a parallel of HIV-1 Rev mediated HIV-1 mRNA export and TFIIIA mediated 5S rRNA export, nuclear export of TFIIIA was examined with respect to a possible role of eIF5A as a cofactor.

In *Xenopus* oocytes, TFIIIA could be detected on nucleoplasmic filaments of the nuclear pore complexes. Moreover, treatment with specific CRM1 inhibitor Leptomycin B confirmed nucleocytoplasmic export of leucin-rich nuclear export signal containing TFIIIA via CRM1. Interaction of eIF5A with TFIIIA could be demonstrated using overlay blot assay. In microinjection experiments, eIF5A also seems to be an essential cofactor in TFIIIA export, parallel to HIV-1-Rev mediated export.

Actin, a further known binding partner of eIF5A, is involved in diverse nuclear export pathways and RNA-Polymerase I, II and III dependent transcription. In contrast to actin, its partner myosin was only recently discovered undeniable in the cell nucleus. Nuclear myosin IC is a member of the Myosin I family of non filamentous, unconventional myosins.

In this thesis, bioinformatical analysis displayed a wide distribution in vertebrates. Nuclear myosin IC is also present in *Xenopus laevis*. Compared to myosin IC, it contains a specific 16 amino acid aminotermus, which acts as a nuclear localization signal. In somatic *Xenopus* cells, specific antibodies recognized nuclear myosin IC mainly in the nucleus in a punctuate manner, but also in the nucleolus. In *Xenopus laevis* oocytes, nuclear myosin IC, as well as RNA-polymerase II, localized on the lateral transcriptional active loops of lampbrush chromosomes. Inhibitory antibodies against nuclear myosin lead to complete retraction of most of the lateral transcriptional active loops and to a shortening of the chromosome axes. In amplified nucleoli, nuclear myosin was mainly detectable in the nucleolus core, where it colocalized partially with both RNA-polymerase I and fibrillarin. After inhibition of transcription using actinomycin D, nuclear myosin IC was relocated together with RNA-polymerase I and rDNA. Injection of inhibitory antibodies against nuclear myosin resulted in a massive architectural alteration of the amplified nucleoli. In contrast to nucleoli of somatic *Xenopus* cells, BrUTP-incorporation in amplified nucleoli was still possible.

As already published for nuclear actin, nuclear myosin IC could also be detected on nucleoplasmic filaments of nuclear pore complexes in *Xenopus laevis* oocytes. As actin is an essential cofactor in export pathways, a possible role for nuclear myosin IC in nuclear export was examined by microinjection experiments. Antibodies against an epitop in the nuclear myosin head domain (XNMIC #42) were able to inhibit a CRM1 mediated protein export, whereas antibodies against the specific 16 amino acid terminus (XNMIC #54) failed.

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

8.1. Allgemeine Abkürzungen

A	Ampere; Adenin
Abb.	Abbildung
AMD	Aktinomycin D
AP	alkalische Phosphatase
APRIL	„ <i>Acidic Protein Rich In Leucine</i> “
APS	Ammoniumpersulfat
ARE	AU-reiche Elemente
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat
BLAST	„ <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> “
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BRE	basales Repressorelement
BrUTP	Bromuridintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CA	Kapsid
CaCl ₂	Calciumchlorid
Ca(NO ₃) ₂	Calciumnitrat
CAS	„ <i>Cellular Apoptosis Susceptibility</i> “
CBC	Kappenbindungskomplex
CD	„ <i>Cluster of Diversity</i> “
cDNA	(zur mRNA) komplementäre DNA
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation
CIAP	„ <i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase</i> “
cm	Zentimeter
CMV	Zytomegalievirus
CO ₂	Kohlendioxid
COS-Zellen	<i>Cercopithecus aethiops</i> -Nierenzelllinie
CP	„ <i>Start Site Proximal Core Promoter</i> “
CPSF 100	Schneide- und Polyadenylierungsspezifitätsfaktor 100 kDa
CPX	Ciclopirox
CRM1	„ <i>Chromosome Maintenance Region Protein</i> “ ¹
CspA	Kälteschockprotein A
CstF64	Schneidestimulationsfaktor 64 kDa
CTD	carboxyterminale Domäne
CTE	konstitutives Transportelement
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol

Dbp5	DEAD-Box-Protein 5
DC	dendritische Zellen
DDX3	DEAD-Box-Protein 3
DEAD	Asparaginsäure-Glutaminsäure-Alanin-Asparaginsäure
Δ	Deletion
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFC	dichte fibrilläre Komponente
dH ₂ O/ddH ₂ O	destilliertes/doppelt destilliertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	Dubecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP/ddNTP	desoxy/didesoxy-Nukleosid-Triphosphat
dpi	„dots per Inch“, Punkte pro Zoll
DTT	Dithiothreitol
ECL	„Enhanced Chemiluminescence“
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
eEF1A	eukaryotischer Translationselongationsfaktor 1A
EGFP	„Enhanced Green Fluorescent Protein“
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl ethyl)-tetraessigsäure
eIF5A	eukaryotischer Initiationsfaktor 5A
EJC	„Exon Junction Complex“, Exon-Verbindungs-Komplex
ELAV	„Embryonic Lethal Abnormal Vision“
ElrA	„ELAV-related-Protein A“
EM	Elektronenmikroskopie
ENH	„Enhancer“
Env	„Envelope“
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERG	„Early Response Gene“
ETS	externer transkribierter Spacer
F-Aktin	filamentäres Aktin
FC	fibrilläres Zentrum
FCS	fetales Kälberserum
FG	Phenylalanin-Glycin-Wiederholungen
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FxFG	Phenylalanin-AS mit kleiner oder polarer Seitenkette-Phenylalanin-Glycin
g	Gramm
G	Guanin
GAG	„Group Specific Antigen“
G-Aktin	globuläres Aktin
GC	granuläre Komponente
GC7	N ¹ -guanyl-1,7-diaminoheptan
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonien-stimulierender-Faktor
GFP	„Green Fluorescent Protein“

GLFG	Glycin-Leucin-Phenylalanin-Glycin
GLUT4	Glucosetransporter 4
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunde
H2A, H2B	Histon 2A, Histon 2B
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HAT-Medium	Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin-Medium
HCl	Salzsäure
HEAT	<u>H</u> untingtin, <u>E</u> longationsfaktor 3, PR65/ <u>A</u> -Untereinheit der Proteinphosphatase 2A, Lipidkinase <u>T</u> OR
HeLa-Zellen	„Henriette Lack“-Zervixkarzinomzellen
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
His6	Hexahistidin
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
hnRNP	heteronukleäres Ribonukleoprotein
HNS	HuR-nukleozytoplasmatische-Shuttelsequenz
hPa	Hektopascal
HRE	HuR- <i>Response</i> -Element
hRIP	humanes nukleoporinähnliches Rev-interagierendes Protein
Hsp70	Hitzeschockprotein 70 kDa
hTR	“ <i>human Telomerase RNA</i> ”
hTERT	“ <i>human Telomerase Reverse Transcriptase</i> ”
Ig	Immunglobulin
IGS	intergenetischer Spacer
IN	Integrase
InsP ₆	Inositol-Hexakisphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IQ-Motiv	Isoleucin-Glutamin-Motiv
ITS	interner transkribierter Spacer
kb/kbp	Kilobasen/Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenkarbonat
KSCN	Kaliumthiozyanat
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertami-Medium
LD	„ <i>Lower Dimer</i> “
LMB	Leptomycin B
LRR	aminoterminal leucinreichen Region
M	Mol
mA	Milliamper
MA	Matrix
mAB	monoklonaler Antikörper
MCS	„ <i>Multiple Cloning Site</i> “, multiple Klonierungsstelle
MDa	Megadalton

METRO	„ <i>Message Transport Organizer</i> “
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MHC	„ <i>Major Histocompatibility Complex</i> “
min.	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MMuLV/MoMuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MnCl	Manganchlorid
MPMV	<i>Mason-Pfizer-Monkey-Virus</i>
mRNA	„messenger“-RNA, Boten-RNA
mRNP	„messenger“ Ribonukleoprotein
MS 222	Aminobenzoessäure-ethylester-methansulfat
N	Normalität
Na ₂ CO ₃	Natriumkarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumbikarbonat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsazl
NC	Nukleokapsid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NES	Kernexportsignal („ <i>Nuclear Export Signal</i> “)
ng	Nanogramm
NLS	Kernlokalisierungssignal („ <i>Nuclear Localization Signal</i> “)
nm	Nanometer
NMD3	„ <i>Nonsense Mediated Decay</i> “
NOR	Nukleolus-Organisator-Region
NPC	Kernporenkomplex („ <i>Nuclear Pore Complex</i> “)
NSS	nukleozytoplasmatisches Shuttelsignal
nt	Nukleotid
NTF2	Kerntransportfaktor 2
N-Terminus	Amino-Terminus
Nup	Nukleoporin
NXF1,2,3	„ <i>Nuclear Export Factor</i> “ 1,2,3
OD	optische Dichte
OsO ₄	Osmiumtetroxid
³² P	Isotop ³² Phosphat
p	pico
PAF53	polymeraseassoziiertes Faktor 53
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	„ <i>Polymerase Chain Reaction</i> “, Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol

PFA	Paraformaldehyd
pH	pondus hydrogenii
PHA	Phytohämagglutinin
PHAX	phosphorylierter Adapter für den RNA-Export
PIC	Präinitiationskomplex
PKI	Proteinkinaseinhibitor
PML-bodies	Promyelozytenleukämie-Körperchen
pMol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PO ₄	Phosphat
POD	Peroxidase
Pol	Polymerase
POM	Porenmembranprotein
PR	Protease
PRE	<i>cis</i> -aktives posttranskriptionelles regulatorische Element
Rab	Rev-Aktivierungsdomäne-bindendes Protein
RanBP	Ran-Bindungsprotein
RanGEF	„Ran-GDP-Exchange-Factor“, Ran-Nukleotid-Austauschfaktor
RCC1	„Regulator of Chromosome Condensation 1“
rDNA	ribosomale DNA
Ref	RNA-Export Faktor
RNA	Ribonukleinsäure
RNAsin	Ribonuklease-Inhibitor
RPMI-Medium	„Rosewell Park Memorial Institute“-Medium
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
RRE	Rev-Response-Element
RRM	„RNA Recognition Motif“, RNA-Erkennungs-Motiv
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkriptase
RZPD	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung
S	Svedberg-Einheit
SB	Sodiumborat
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sek.	Sekunde
SL1	Selektivitätsfaktor 1
SL	„Stem-Loop“
snoRNA/snoRNP	„Small Nucleolar RNA“, „Small Nucleolar RNP“
snRNP	„Small nuclear RNP“
SP	Spacer
SPT	Spacer Promoter
SR	Serin-Arginin
SSC	„Sodium-Sodiumcitrat“, Natrium-Natriumcitrat
SU	„Surface“
SUMO-1	„Small Ubiquitin-Related Modifier“

SV40	<i>Simian Virus 40</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAF	TBP-assoziierter Faktor
TAP	Tip-assoziertes Protein
TBE	Tris-Bor-EDTA
TBP	TATA-bindendes Protein
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	TBS und Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Term	Transkriptionsterminator
TF	Transkriptionsfaktor
TFIIIA	Transkriptionsfaktor IIIA
TIF-IB	Transkriptionsinitiationsfaktor IB
TKM-Puffer	Tris-Kalium-Magnesium Puffer
T _m	Schmelztemperatur
TM	„ <i>Transmembrane</i> “
TREX	Transkriptions-Export-Komplex
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
tRNA	„ <i>transfer</i> “-RNA
trunc	„ <i>truncated</i> “, verkürzt
TSR	„ <i>Template Suppressor Reagent</i> “
TSS	„ <i>Transformation and Storage Solution</i> “
TTP	Tristetraprolin
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan Mololaurat
U	Einheit („Unit“); Uracil
UBF	„ <i>Upstream Binding Factor</i> “
UCE	„ <i>Upstream Core Element</i> “
UTP	Uridintriphosphat
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
WD	Tryptophan-Asparaginsäure
WICH	„ <i>WSTF-ISWI-Chromatin Remodeling Complex</i> “
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
x	-fach
x g	x-fache Erdbeschleunigung
XIKE-A6-Zelllinie	„ <i>Xenopus laevis Kidney Epithelium</i> “ A6-Zelllinie
XNMIC	<i>Xenopus Nuclear Myosin IC</i> , <i>Xenopus</i> Kernmyosin IC
XPO1	Exportin 1
XTC-Zelllinie	„ <i>Xenopus laevis Tissue Culture</i> “-Zelllinie
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

8.2. Aminosäuren

8.2.1. Abkürzungen der Aminosäuren

Aminosäure	3-Buchstaben-Code	1-Buchstaben-Code	Triples
Alanin	Ala	A	GCU, GCC, GCA, GCG
Arginin	Arg	R	CGU, CGC, CGA, CGG, AGA,
Asparagin	Asn	N	AAU, AAC
Asparaginsäure	Asp	D	GAU, GAC
Cystein	Cys	C	UGU, UGC
Glutamin	Gln	Q	CAA, CAG
Glutaminsäure	Glu	E	GAA, GAG
Glycin	Gly	G	GUU, GUC, GUA, GUG
Histidin	His	H	CAU, CAC
Isoleucin	Ile	I	AUU, AUC, AUA
Leucin	Leu	L	UUA, UUG, CUU, CUC,
Lysin	Lys	K	AAA, AAG
Methionin	Met	M	ATG
Phenylalanin	Phe	F	UUU, UUC
Prolin	Pro	P	CCU, CCC, CCA, CCG
Serin	Ser	S	UCU, UCC, UCA, UCG
Threonin	Thr	T	ACU, ACC, ACA, ACG
Tryptophan	Trp	W	UGG
Tyrosin	Tyr	Y	UAU, UAC
Valin	Val	V	GUU, GUC, GUA, GUG
Start			AUG, selten GUG oder CUG;
Stop			UAA, UAG, UGA

Tab. 8.1.: Abkürzungen der Aminosäuren.

Hydrophile Aminosäuren:

Basische Aminosäuren: Lysin (K), Arginin (R), Histidin (H)

Saure Aminosäuren: Asparaginsäure (D), Glutaminsäure (E)

Polare Aminosäuren: Serin (S), Threonin (T), Asparagin (N), Glutamin (Q)

Hydrophobe Aminosäuren

Alanin (A), Valin (V), Isoleucin (I), Leucin (L), Methionin (M), Phenylalanin (F), Tyrosin (Y), Tryptophan (W)

Aminosäuren mit besonderen Merkmalen:

Cystein (C), Glycin (G), Prolin (P)

9. LITERATURVERZEICHNIS

- Adelman MR, Taylor E W** (1969) Further purification and characterization of slime mold myosin and slime mold actin. *Biochemistry* 8: 4976-4988
- Aguilera A** (2005) Cotranscriptional mRNP assembly: from the DNA to the nuclear pore. *Curr Opin Cell Biol* 17: 242-250
- Alcázar-Román A, Tran E, Gou S, Wentz S** (2006) Inositol hexakisphosphate and Gle1 activate the DEAD-box protein Dbp5 for nuclear mRNA export. *Nature Cell Biol* 8: 711-716
- Allen TD, Cronshaw JM, Bagley S, Kiseleva E, Goldberg MW** (2000) The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. *J Cell Sci* 113: 1651-1659
- Allison LA, Romaniuk PJ, Bakken AH** (1991) RNA-protein interactions of stored 5S RNA with TFIIIA and ribosomal protein L5 during *Xenopus* oogenesis. *Dev Biol* 144: 129-144
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ** (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410
- Andrade LEC, Cham EKL, Raška I, Peebles CL, Roos G, Tan EM** (1991) Human autoantibody to a novel protein of the nuclear coiled body: immunological characterization and cDNA cloning of p80-coilin. *J Exp Med* 173: 1407-1409
- Antic D, Keene JC** (1997) Embryonic lethal abnormal visual RNA-binding proteins involved in growth, differentiation and posttranscriptional gene expression. *Am J Hum Genet* 61: 273-278
- Arts GJ, Fornerod M, Mattaj IW** (1998) Identification of a nuclear export receptor for tRNA. *Curr Biol* 8: 305-314
- Askjaer P, Jensen TH, Nilsson J, Englmeier L, Kjems J** (1998) The specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP. *J Biol Chem* 273: 33414-33422
- Bagley S, Goldberg MW, Cronshaw JM, Rutherford SA, Allen TD** (2000) The nuclear pore complex. *J Cell Sci* 113: 3885-3886
- Bähler M, Rhoads A** (2002) Calmodulin signaling via the IQ motif. *FEBS Lett* 513: 107-113
- Balabanov S, Gontarewicz A, Ziegler P, Hartmann U, Kammer W, Copland M, Brassat U, Priemer M, Hauber I, Wilhelm T, Schwarz G, Kanz L, Bokemeyer C, Hauber J, Holyoake TL, Nordheim A, Brümmendorf TH** (2007) Hypusination of eukaryotic initiation factor 5A (eIF5A): a novel therapeutic target in BCR-ABL-positive leukemias identified by a proteomics approach. *Blood* 109:1701-1711
- Banchereau J, Steinman RM** (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-252
- Barr ML, Bertram EG** (1949) A morphological distinction between neurons of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature* 163: 676-677
- Bartig D, Lemkemeier K, Frank J, Lottspeich F, Klink F** (1992) The archaeobacterial hypusine-containing protein. Structural features suggest common ancestry with eukaryotic translation initiation factor 5A. *Eur J Biochem* 204: 751-758
- Barylko B, Jung G, Albanesi JP** (2005) Structure, function, and regulation of myosin IC. *Acta Biochim Polonica* 52: 373-380
- Barylko B, Wagner MC, Reizes O, Albanesi JP** (1992) Purification and characterization of a mammalian myosin I. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 490-494
- Bayliss R, Littlewood T, Stewart M** (2000) Structural basis for the interaction between FxFG nucleoporin repeats and importin- β in nuclear trafficking. *Cell* 102: 99-108
- Bayliss R, Littlewood T, Strawn LA, Wentz SR, Stewart M** (2002) GLFG und FxFG nucleoporins bind to overlapping sites on importin- β . *J Biol Chem* 277: 50597-50606
- Bazett-Jones DP, Leblanc B, Herfort M, Moss T** (1994) Short-range DNA looping by the *Xenopus* HMG-box transcription factor, xUBF. *Science* 264: 1134-1137
- Bednenko J, Cingolani G, Gerace L** (2003) Importin β contains a COOH-terminal nucleoporin binding region important for nuclear transport. *J Cell Biol* 162: 391-401
- Bell PJ** (2006) Sex and the eukaryotic cell cycle is consistent with a viral ancestry for the eukaryotic nucleus. *J Theor Biol* 243: 54-63
- Benne R, Brown-Luedi ML, Hershey JW** (1978) Purification and characterization of protein synthesis initiation factors eIF-1, eIF-4C, eIF-4D and eIF-5 from rabbit reticulocytes. *J Biol Chem* 253: 3070-3077

- Berg JM, Shi Y** (1996) The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. *Science* 271: 1081-1085
- Berg JS, Powell BC, Cheney RE** (2001) A millennial myosin census. *Mol Biol Cell* 12: 780-794
- Bettinger BT, Gilbert DM, Amberg DC** (2004) Actin up in the nucleus. *Nature Rev* 5: 410-415
- Bevec D, Jaksche H, Oft M, Wöhl T, Himmelspach M, Pacher A, Schebesta M, Koettnitz K, Dobrovnik M, Csonga R, Lottspeich F, Hauber J** (1996) Inhibition of HIV-1 replication in lymphocytes by mutants of the rev cofactor eIF-5A. *Science* 271:1858-1860
- Bischoff FR, Krebber H, Smirnova E, Dong W, Pongstingl H** (1995) Co-activation of RanGTPase and inhibition of GTP dissociation by Ran-GTP binding protein RanBP1. *EMBO J* 14: 705-715
- Bodem J, Dobrev G, Hoffmann-Rohrer U, Iben S, Zentgraf H, Delius H, Vingron M, Grummt I** (2000) TIF-IA, the factor mediating growth-dependent control of ribosomal RNA synthesis, is the mammalian homolog of yeast Rrn3p. *EMBO Rep.* 1: 171-175
- Boeger H, Bushnell DA, Davis R, Griesenbeck J, Lorch Y, Strattan JS, Westover KD, Kornberg RD** (2005) Structural basis of eukaryotic gene transcription. *FEBS Lett* 579: 899-903
- Boeger H, Griesenbeck J, Strattan JS, Kornberg RD** (2004) Removal of promoter nucleosomes by disassembly rather than sliding in vivo. *Mol Cell* 14: 667-673
- Bogerd HP, Fridell RA, Benson RE, Hua J, Cullen BR** (1996) Protein sequence requirements for function of the human T-Cell leukaemia virus type 1 Rex nuclear export signal delineated by a novel in vivo randomization-selection assay. *Mol Cell Biol* 16: 4207-4214
- Bogerd HP, Fridell RA, Madore S, Cullen BR** (1995) Identification of a novel cellular cofactor for the Rev/Rex class of retroviral regulatory proteins. *Cell* 82: 485-494
- Bohnsack MT, Regener K, Schwappach B, Saffrich R, Paraskeva E, Hartmann E, Görlich D** (2002) Exp5 exports eEF1A via tRNA from nuclei and synergizes with other transport pathways to confine translation to the cytoplasm. *EMBO J* 21: 6205-6215
- Bohnsack MT, Stüven T, Kuhn C, Cordes VC, Görlich D** (2006) A selective block of nuclear actin export stabilizes the giant nuclei of *Xenopus* oocytes. *Nature Cell Biol* 8: 257-263
- Bose A, Robida S, Furcini i PS, Chawla A, Fogarty K, Corvera S, Czech MP** (2004) Unconventional myosin Myo1c promotes membrane fusion in a regulated exocytic pathway. *Mol Cell Biol* 24: 5447-5458
- Boveri T** (1909) Die Blastomerenkerne von *Ascaris megalocephala* und die Theorie der Chromosomenindividualität. *Arch Zellforsch* 3: 181-268
- Boyle S, Gilchrist S, Bridger JM, Mahy NL, Ellis JA, Bickmore WA** (2001) The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum Mol Genet* 10: 211-219
- Braun IC, Herold A, Rode M, Izaurralde E** (2002) Nuclear export of mRNA by TAP/NXF1 requires two nucleoporin-binding sites but not p15. *Mol Cell Biol* 22: 5405-5418
- Bray M, Prasad S, Dubay JW, Hunter E, Jeang KT, Rekosh D, Hammarskjöld ML** (1994) A small element from the Mason-Pfizer monkey virus genome makes human immunodeficiency virus type 1 expression and replication Rev-independent. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 1256-1260
- Bregman DB, Du L, van der Zee S, Warren SL** (1995) Transcription-dependent redistribution of the large subunit of RNA polymerase II to discrete nuclear domains. *J Cell Biol* 129: 287-298
- Brennan CM, Gallouzi IE, Steitz JA** (2000) Protein ligands to HuR modulate its interaction with target mRNA in vivo. *J Cell Biol* 151: 1-13
- Brennan CM, Steitz JA** (2001) HuR and mRNA stability. *CMLS* 58: 266-277
- Brody JR, Kern SE** (2004) Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques* 36: 214-216
- Brown R** (1831) Observations on the organs and mode of fecundation in Orchideae and Asclepiadeae. *Trans. Linn. Soc. Lond.* 16: 685-745
- Cajal SR y** (1903) Un sencillo metodo de coloracion seletiva del reticulo protoplasmatico y sus efectos en los diversos organos nerviosos de vertebrados e invertebrados. *Trab Lab Invest Biol* 2: 129-221
- Caput D, Beutler B, Harthog K, Thayer R, Brown-Shirmer S, Cerami A** (1986) Identification of a common nucleotide sequence in the 3' untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 1670-1674
- Casolari JM, Brown CR, Komili S, West J, Hieronymus H, Silver PA** (2004) Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization. *Cell* 117: 427-439

- Chang P, Torres J, Lewis RA, Mowry K, Houlston E, King ML** (2004) Localization of RNAs to the mitochondrial cloud in *Xenopus* oocytes through entrapment and association with endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 15: 4669-4681
- Chatterje I, Gross SR, Kinzy TG, Chen KY** (2006) Rapid depletion of mutant eukaryotic initiation factor 5A at restrictive temperature reveals connections to actin cytoskeleton and cell cycle progression. *Mol Gen Genomics* 275:264-276
- Chen CY, Gherzi R, Ong SE, Chan EL, Raijmakers R, Pruijn GJM, Stoecklin G, Moroni C, Mann M, Karin M** (2001) AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* 107: 451-464
- Chen CY and Shyu AB** (1995) AU-rich elements characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci* 20: 465-470
- Chen D, Dunder M, Wang C, Leung A, Lamond A, Misteli T, Huang S** (2005) Condensed mitotic chromatin is accessible to transcription factors and chromatin structural proteins. *J Cell Biol* 168: 41-54
- Christensen JH, Hansen PK, Lillelund O, Thøgersen HC** (1991) Sequence-specific binding of the N-terminal three-finger fragment of *Xenopus* transcription factor IIIA to the internal control region of a 5S RNA gene. *FEBS Lett* 281: 181-184
- Chuang CH, Carpenter AE, Fuchsova B, Johnson T, de Lanerolle P, Belmont AS** (2006) Long-range directional movement of an interphase chromosome site. *Curr Biol* 16: 825-831
- Chung CT, Niemela SL, Miller RH** (1989) One step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2172-2175
- Cisterna B, Necchi D, Prospero E, Biggiogera M** (2006) Small ribosomal subunits associate with nuclear myosin and actin in transit to the nuclear pores. *FASEB J* 20: E1257-E1263
- Clark TG, Merriam RW** (1977) Diffusible and bound actin in nuclei of *Xenopus laevis* oocytes. *Cell* 12: 883-891
- Clark TG, Rosenbaum JL** (1979) An actin filament matrix in hand-isolated nuclei of *X. laevis* oocytes. *Cell* 18: 1101-1108
- Clouse KN, Luo MJ, Zhou Z, Reed R** (2001) A Ran-independent pathway for export of spliced mRNA. *Nat Cell Biol* 3:97-99
- Cole CN, Scarcelli JJ** (2006) Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol* 18:299-306
- Comai L, Tanese N, Tjian R** (1992) The TATA-binding protein and associated factors are integral components of the RNA polymerase I transcription factor, SL1. *Cell* 68: 965-976
- Comings DE, Harris DC** (1976) Nuclear proteins. II. Similarity of nonhistone proteins in nuclear sap and chromatin, and essential absence of contractile proteins from mouse liver nuclei. *J Cell Biol* 70: 440-452
- Conti E, Müller CW, Stewart M** (2006) Karyopherin flexibility in nucleocytoplasmic transport. *Curr Opin Struct Biol* 16: 237-244
- Conti E, Uy M, Leighton L, Blobel G, Kuriyan J** (1998) Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin- α . *Cell* 94: 193-204
- Copenhaver GP, Putnam CD, Denton ML, Pikaard CS** (1994) The RNA polymerase I transcription factor UBF is a sequence-tolerant HMG-box protein that can recognize structured nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 22: 2651-2657
- Cremer T, Cremer M, Dietzel S, Müller S, Solovei I, Fakan S** (2006) Chromosome territories – a functional nuclear landscape. *Curr Opin Cell Biol* 18: 1-10
- Cronshaw JM, Krutchinsky A, Zhang W, Chait BT, Matunis MJ** (2002) Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol* 158: 915-927
- Cullen BR** (1998) Retroviruses as model systems for the study of nuclear RNA export pathways. *Virology* 249: 203-210
- Cullen BR** (2003) Nuclear RNA export. *J Cell Sci* 116: 587-597
- Cullen BR** (2005) Nuclear RNA export unwound. *Nature* 433: 26-27
- Daneholt B** (2001) Assembly and transport of a premessenger RNP particle. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 7012-7017
- Davis BJ** (1964) Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann N Y Acad Sci* 121: 404-427

- de Lanerolle P, Johnson T, Hofmann WA** (2005) Actin and myosin I in the nucleus: what next? *Nature Struct Mol Biol* 12: 742-746
- Denning DP, Patell SS, Uversky V, Fink AL, Rexach M** (2003) Disorder in the nuclear pore complex: The FG repeat regions of nucleoporins are natively unfolded. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2450-2455
- Dhadialla TS, Raikhel AS** (1990) Biosynthesis of mosquito vitellogenin. *J Biol Chem* 265: 9924-9933
- Dieu MC, Vandervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Ait Yahia S, Briere F, Zlotnik A, Lebecque S, Caux C** (1998) Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 188: 373-386
- Dixon DA, Tolley ND, King PH, Nabors LB, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM** (2001) Altered expression of the mRNA stability factor HuR promotes cyclooxygenase-2 expression in colon cancer cells. *J Clin Invest* 108: 1657-1665
- Dixon LK, Ford PJ** (1982a) Persistence of non-ribosome bound 5S RNA in full-grown oocytes of *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 91: 474-477
- Dixon LK, Ford PJ** (1982b) Regulation of protein synthesis and accumulation during oogenesis in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 93: 478-497
- Doberstein SK, Pollard TD** (1992) Localization and specificity of the phospholipid and actin binding sites on the tail of *Acanthamoeba* myosin IC. *J Cell Biol* 117: 1241-1249
- Douvas AS, Harrington CA, Bonner J** (1975) Major nonhistone proteins of rat liver-chromatin: preliminary identification of myosin, actin, tubulin, and topomyosin. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 3902-3906
- Dumont JN** (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol* 136: 153-180
- Dundr M, Hoffmann-Rohrer U, Hu Qiyue H, Grummt I, Rothblum LI, Phair RD, Misteli T** (2002) A kinetic framework for a mammalian RNA polymerase in vivo. *Science* 298: 1623-1626
- Dundr M, Misteli T** (2001) Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem J* 356: 297-310
- Eberhard D, Tora L, Egly JM, Grummt I** (1993) A TBPcontaining multiprotein complex (TIF-IB) mediates transcription specificity of murine RNA polymerase I. *Nucleic Acids Res.* 21: 4180-4186
- Egly JM, Miyamoto NG, Moncollin V, Chambon P** (1984) Is actin a transcription initiation factor for RNA polymerase B? *EMBO J* 3: 2363-2371
- Elfgang C, Rosorius O, Hofer L, Jaksche H, Hauber J, Bevec D** (1999) Evidence for specific nucleocytoplasmic transport pathways used by leucine-rich nuclear export signals. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6229-6234
- Engelke DR, Ng SY, Shastry BS, Toeder RG** (1980) Specific interaction of a purified transcription factor with an internal control region of 5S RNA genes. *Cell* 19: 717-728
- Englmeier L, Fornerod M, Bischoff FR, Petosa C, Mattaj IW, Kutay U** (2001) RanBP3 influences interactions between CRM1 and its nuclear protein export substrates. *EMBO Rep* 2: 926-932
- Evans JP, Kay BK** (1991) Biochemical fractionation of oocytes. *Methods Cell Biol* 36: 133-148
- Fahrenkrog B** (2006) The nuclear pore complex, nuclear transport, and apoptosis. *Can J Physiol Pharmacol.* 84: 279-286
- Fahrenkrog B, Aebi U** (2003) The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 757-766
- Fahrenkrog B, Köser J, Aebi U** (2004) The nuclear pore complex: a jack of all trades? *Trends Biochem Sci* 29: 175-182
- Fahrenkrog B, Maco B, Fager AM, Koser J, Sauder U, Ullman KS, Aebi** (2002) Domain-specific antibodies reveal multiple-site topology of Nup153 within the nuclear pore complex. *J Struct Biol* 140: 254-267
- Fairman ME, Maroney PA, Wang W, Bowers HA, Gollnick P, Nilsen TW, Jankowsky E** (2004) Protein displacement by DExH/D "RNA helicases" without duplex unwinding. *Science* 304: 730-734
- Fan XC, Myer VE, Steitz JA** (1997) AU-rich elements target small nuclear RNAs as well as mRNAs for rapid degradation. *Genes Dev* 11: 2557-2568
- Fan XC, Steitz JA** (1998a) HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15293-15298
- Fan XC, Steitz JA** (1998b) Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNA. *EMBO J* 17: 3448-3460
- Fischer U, Huber J, Boelens WC, Mattaj IW, Lührmann R** (1995) The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* 82: 475-483

- Fischer U, Pollard VW, Lührmann R, Teufel M, Michael MW, Dreyfuss G, Malim MH** (1999) Rev-mediated nuclear export of RNA is dominant over nuclear retention and is coupled to the Ran-GTPase cycle. *Nucleic Acids Res* 27: 4128-4134
- Fischer U, Sumpster V, Sekine M, Satoh T, Lührmann R** (1993) Nucleo-cytoplasmic transport of U snRNPs: definition of a nuclear location signal in the Sm core domain that binds a transport receptor independently of the m₃G cap. *EMBO J* 12: 573-583
- Flemming W** (1882) in *Zellsubstanz, Kern und Zellteilung*. F.C.W. Vogel, Leipzig, 1-424
- Floer M, Blobel G** (1996) The nuclear transport factor karyopherin β binds stoichiometrically to Ran-GTP and inhibits the Ran GTPase activating protein. *J Biol Chem* 271: 5313-5316
- Fomproix N, Percipalle P** (2004) An actin-myosin complex on actively transcribing genes. *Exp Cell Res* 294: 140-148
- Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj IW** (1997) CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 90: 1051-1060
- Frankel AD, Young JAT** (1998) HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* 67: 1-25
- Frey S, Richter RP, Görlich D** (2006) FG-rich repeats of nuclear pore proteins form a three-dimensional meshwork with hydrogel-like properties. *Science* 314: 815-817
- Fridell RA, Fischer U, Lührmann R, Meyer BE, Meinkoth JL, Malim MH, Cullen BR** (1996) Amphibian transcription factor IIIA proteins contain a sequence element functionally equivalent to the nuclear export signal of human immunodeficiency virus type 1 Rev. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2936-2940
- Fries B, Heukeshoven J, Hauber I, Grüttner C, Stocking C, Kehlenbach RH, Hauber J, Chemnitz J** (2007) Analysis of nucleocytoplasmic trafficking of the HuR ligand APRIL and its influence on CE83 expression. *J Biol Chem* 282: 4504-4515
- Fuerst JA** (2005) Intracellular compartmentation in Planctomycetes. *Annu Rev Microbiol* 59: 299-328
- Gall JG** (2000) Cajal bodies: the first 100 years. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 273-300
- Gall JG, Bellini M, Wu Z, Murphy C** (1999) Assembly of the nuclear transcription and processing machinery: Cajal bodies (coiled bodies) and transcriptosomes. *Mol Biol Cell* 10: 4385-4402
- Gall JG, Murphy C, Callan HG, Wu ZA** (1991) Lampbrush chromosomes. *Meth Cell Biol* 36: 149-166
- Gall JG, Wu Z, Murphy C, Gao H** (2004) Structure in the amphibian germinal vesicle. *Exp Cell Res* 196: 28-34
- Gallouzi IE, Brennan CM, Stenberg MG, Swanson MS, Eversole A, Maizels N, Steitz JA** (2000) HuR binding to cytoplasmic mRNA is perturbed by heat shock. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3073-3078
- Gallouzi IE, Brennan CM, Steitz JA** (2001) Protein ligands mediate the CRM1-dependent export of HuR in response to heat shock. *RNA* 7: 1348-1361; Retraction in part (2003) *RNA* 9: 1410
- Gatfield D, Izaurralde E** (2002) REF1/Aly and the additional exon junction complex proteins are dispensable for nuclear mRNA export. *J Cell Biol* 159: 579-588
- Gherzi R, Lee KY, Briata P, Wegmüller D, Moroni C, Karin M, Chen CY** (2004) A KH domain RNA binding protein, KSRP, promotes ARE-directed mRNA turnover by recruiting the degradation machinery. *Mol Cell* 14: 571-583
- Gillespie PG, Albanesi JP, Bahler M, Bement WM, Berg JS, Burgess DR, Burnside B, Cheney RE, Corey DP, Coudrier E, et al.** (2001) Myosin-I nomenclature. *J Cell Biol* 155: 703-704
- Gillespie PG, Cyr JL** (2004) Myosin-1c, the hair cell's adaptation motor. *Annu Rev Physiol* 66: 521-545
- Gonsior SM, Platz S, Buchmeier S, Scheer U., Jockusch BM., Hinssen H** (1999) Conformational difference between nuclear and cytoplasmic actin is directed by a monoclonal antibody. *J Cell Sci* 112: 797-809
- Good PJ** (1995) A conserved family of *elav*-like genes in vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4557-4561
- Goodson HV, Hawse WF** (2002) Molecular evolution of the actin family. *J Cell Sci* 115: 2919-2622
- Gordon ED, Mora R, Meredith SC, Lee C, Lindquist SL** (1987) Eukaryotic initiation factor 4D, the hypusine-containing protein, is conserved among eukaryotes. *J Biol Chem* 262: 16585-16589
- Görlich D, Panté N, Kutay U, Aebi U, Bischoff FR** (1996) Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein Import. *EMBO J* 15: 5584-5594
- Gottlieb E, Steitz JA** (1989) Function of the mammalian La protein: evidence for its action in transcription termination by RNA polymerase III. *EMBO J* 8: 851-861

- Gounon P, Karsenti E** (1981) Involvement of contractile proteins in the changes in consistency of oocyte nucleoplasm of the newt *Pleurodeles waltlii*. *J Cell Biol* 88: 410-421
- Griffis ER, Altan N, Lippincott-Schwartz J, Powers MA** (2002) Nup98 is a mobile nucleoporin with transcription-dependent dynamics. *Mol. Biol. Cell* 13: 1282-1297
- Griffis ER, Craig B, Dimaano C, Ullman KS, Powers MA** (2004) Distinct functional domains within nucleoporins nup153 and nup98 mediate transcription-dependent mobility. *Mol Biol Cell* 15: 1991-2002
- Griffis ER, Xu S, Powers MA** (2003) Nup98 localizes to both nuclear and cytoplasmic sides of the nuclear pore and binds to two distinct nucleoporin subcomplexes. *Mol Biol Cell* 14: 600-610
- Grummt I** (2003) Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes Dev* 17: 1691-1702
- Grummt I** (2006) Actin and myosin as transcription factors (2006) *Curr Opin Genetics Dev* 16: 191-196
- Grüter P, Tabernero C, von Kobbe C, Schmitt C, Saavedra C, Bachi A, Wilm M, Felber BK, Izaurralde E** (1998) TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus. *Mol Cell* 1: 649-659
- Guddat U, Bakken AH, Pieler T** (1990) Protein-mediated nuclear export of RNA: 5S rRNA containing small RNPs in *Xenopus* Oocytes. *Cell* 60: 619-628
- Gupta RS** (1998) Protein phylogenies and signature sequences: A reappraisal of evolutionary relationships among archaebacteria, eubacteria, and eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 1435-1491
- Gurdon JB** (1991) Nuclear transplantation in *Xenopus*. *Methods Cell Biol* 36: 299-309
- Hanas JS, Hazuda DJ, Bogenhagen DF, Wu FYH, Wu CW** (1983) *Xenopus* transcription factor A requires zinc for binding to the 5S RNA gene. *J Biol Chem* 258: 14120-14125
- Hanas JS, Hocker JR, Cheng YG, Lerner MR, Brackett DJ, Lightfoot SA, Hanas RJ, Madhusudhan KR, Moreland RJ** (2002) *Gene* 282: 43-52
- Harel A, Orjalo AV, Vincent T, Lachish-Zalait A, Vasu S, Shah S, Zimmerman E, Elbaum M, Forbes DJ** (2003) Removal of a single pore subcomplex results in vertebrate nuclei devoid of nuclear pores. *Mol Cell* 11: 853-864
- Hase ME, Cordes VC** (2003) Direct interaction with nup153 mediates binding of Tpr to the periphery of the nuclear pore complex. *Mol Biol Cell* 14: 1923-1940
- Hatano S, Oosawa F** (1966) Isolation and characterization of plasmodium actin. *Biochim. Biophys. Acta* 127: 488-498
- Hauber I, Bevec D, Heukeshoven J, Krätzer F, Horn F, Choidas A, Harrer T, Hauber J** (2005) Identification of cellular deoxyhypusine synthase as a novel target for antiretroviral therapy. *J Clin Invest* 115: 76-85
- Hauser M, Beinbrech G, Groschel-Stewart U, Jockusch BM** (1975) Localisation by immunological techniques of myosin in nuclei of lower eukaryotes. *Exp Cell Res* 95: 127-135
- Heix J, Zomerdijk JCBM, Ravanpay A, Tjian R, Grummt I** (1997) Cloning of murine RNA polymerase I specific TAFs: Conserved interactions between the four subunits of the species-specific transcription factor TIF-IB/SL1. *Proc Natl Acad Sci* 94: 1733-1738
- Hernandez-Verdun D** (2006) Nucleolus: from structure to dynamics. *Histochem Cell Biol* 125: 127-137
- Hetzer M, Walther TC, Mattaj IW** (2005) Pushing the envelope: structure, function and dynamics of the nuclear periphery. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 347-380
- Hill RS, Macgregor HC** (1980) The development of lampbrush chromosome-type transcription in early diplotene oocytes of *Xenopus laevis*: An electron microscope analysis. *J Cell Sci* 44: 87-101
- Hirono M, Denis CS, Richardson GP, Gillespie PG** (2004) Hair cells require phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate for mechanical transduction and adaptation. *Neuron* 44: 309-320
- Hock BD, Kato M, McKenzie JL, Hart DN** (2001). A soluble form of CD83 is released from activated dendritic cells and B lymphocytes, and is detectable in normal human sera. *Int Immunol* 13: 959-967
- Hock BD, Haring LF, Steinkasserer A, Taylor KG, Patton WN, McKenzie JL** (2004) The soluble form of CD83 is present at elevated levels in a number of hematological malignancies. *Leuk Res* 28: 237-241
- Hock, BD, O'Donnell JL, Taylor K, Steinkasserer A, McKenzie JL, Rothwell AG, Summers KL** (2006) Levels of the soluble forms of CD80, CD86, and CD83 are elevated in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients *Tissue Antigens* 67: 57-60
- Hock R, Wilde F, Scheer U, Bustin M** (1998) Dynamic relocation of chromosomal protein HMG-17 in the nucleus is dependent on transcriptional activity. *EMBO J* 17: 6992-7001

- Hodge CA, Colot HV, Stafford P, Cole CN** (1999) Rat8p/Dbp5p is a shuttling transport factor that interacts with Rat7p/Nup159p and Gle1p and suppresses the mRNA export defect of *xpo1-1* cells. *EMBO J* 18: 5778-5788
- Hofmann W** (2000) Die Rolle von eIF-5A und Kernaktin bei Kernexportprozessen. Dissertation Universität Würzburg
- Hofmann W, Reichart B, Ewald A, Müller E, Schmitt I, Stauber RH, Lottspeich F, Jockusch BM, Scheer U, Hauber J, Dabauvalle MC** (2001) Cofactor Requirements for Nuclear Export of Rev Response Element (RRE)- and Constitutive Transport Element (CTE)-containing Retroviral RNAs: An Unexpected Role for Actin. *J Cell Biol* 152: 895-910
- Hofmann WA, Johnson T, Klaczynski M, Fan JL, de Lanerolle P** (2006a) From transcription to transport: emerging roles for nuclear myosin I. *Biochem Cell Biol* 84: 418-426
- Hofmann WA, Stojiljkovic L, Fuchsova B, Vargas GM, Mavrommatis E, Philimonenko V, Kysela K, Goodrich JA, Lessard JL, Hope TJ, Hozak P, de Lanerolle P** (2004) Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. *Nat Cell Biol* 6: 1094-1101
- Hofmann WA, Vargas GM, Ramchandran R, Stojiljkovic L, Goodrich JA, de Lanerolle P** (2006b) Nuclear myosin I is necessary for the formation of the first phosphodiester bond during transcription initiation by RNA polymerase II. *J Cell Biochem* 99: 1001-1009
- Honda BM, Roeder RG** (1980) Association of a 5S gene transcription factor with 5S RNA and altered levels of the factor during cell differentiation. *Cell* 22: 119-26
- Horiike T, Hamada K, Miyata D, Shinozawa T** (2004) The origin of eukaryotes is suggested as the symbiosis of *Pyrococcus* into γ -Proteobacteria by phylogenetic tree based on gene content. *J Mol Evol* 59: 606-619
- Housten DW, King ML** (2000) Germ plasm and molecular determinants of germ cell fate. *Curr Top Dev Biol* 50: 155-181
- Hu P, Wu S, Hernandez N** (2004) A role for beta-actin in RNA polymerase III transcription. *Genes Dev* 18: 3010-3015
- Huang S** (2002) Building an efficient factory: where is pre-rRNA synthesized in the nucleolus? *J Cell Biol* 157: 739-741
- Huang Y, Gattoni R, Stevenin J, Steitz JA** (2003) SR splicing factors serve as adapter proteins for TAP-dependent mRNA export *Mol Cell* 11: 837-843
- Huang Y, Steitz JA** (2001) Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA. *Mol Cell* 7: 899-905
- Hutten S, Kehlenbach RH** (2006) Nup214 is required for CRM1-dependent nuclear protein export in vivo. *Mol Cell Biol* 26: 6772-6785
- Ishikawa H, Bischoff R, Holtzer H** (1969) Formation of arrowhead complexes with heavy meromyosin in a variety of cell types. *J. Cell Biol* 43: 312-328
- Izaurralde E, Lewis J, Gamberi C, Jarmolowski A, McGuigan C, Mattaj IW** (1995) A cap-binding complex mediating U sn-RNA export. *Nature* 376: 709-712
- Jady BE, Richard P, Bertrand E, Kiss T** (2006) Cell cycle-dependent recruitment of telomerase RNA and Cajal bodies to human telomeres. *Mol Biol Cell* 17: 944-954
- Jang BC, Munoz-Najar U, Paik JH, Claffey K, Yoshida M, Hla T** (2003) Leptomycin B, an inhibitor of the nuclear export receptor CRM1, inhibits COX-2 expression. *J Biol Chem* 278: 2773-2776
- Jao DLE, Chen YC** (2006) Tandem affinity purification revealed the hypusine-dependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex. *J Cell Biochem* 97: 583-598
- Jarmolowski A, Boelens WC, Izaurralde E, Mattaj IW** (1994) Nuclear export of different classes of RNA is mediated by specific factors. *J Cell Biol* 124: 627-635
- Jiang ZY, Chawla A, Bose A, Way M, Czech MP** (2002) A phosphatidylinositol 3-kinase-independent insulin signaling pathway to N-WASP/Arp2/3/F-actin required for GLUT4 glucose transporter recycling. *J Biol Chem* 277: 509-515
- Jockusch BM, Becker M, Hindennach I, Jockusch E** (1974) Slime mould actin: homology to vertebrate actin and presence in the nucleus. *Exp Cell Res* 89: 241-246
- Johnson AW, Lund E, Dahlberg J** (2002) Nuclear export of ribosomal subunits. *Trends Biochem Sci* 27: 580-585
- Joho KE, Darby MK, Crawford ET, Brown DD** (1990) A finger protein structurally similar to TFIIA that binds exclusively to 5S RNA in *Xenopus*. *Cell* 61: 293-300
- Joseph J** (2006) Ran at a glance. *J Cell Sci* 119: 3481-3484

- Kad NM, Rovner AS, Fagnant PM, Joel PB, Kennedy GG, Patlak JB, Warshaw DM, Trybus KM** (2003) A mutant heterodimeric myosin with one inactive head generates maximal displacement. *J Cell Biol* 162: 481-488
- Kahle M, Přidalová J, Špaček M, Dzajak R, Hozák P** (2007) Nuclear myosin is ubiquitously expressed and evolutionary conserved in vertebrates. *Histochem Cell Biol* 127:139-148
- Kalderon D, Richardson WD, Markham AF, Smith AE** (1984) Sequence requirements for nuclear localization of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* 311: 33-38
- Kang HA, Hershey JW** (1994) Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 269: 3934-3940
- Kastrup L, Oberleithner H, Ludwig Y, Schäfer C, Shahin V** (2006) Nuclear envelope barrier leak induced by dexamethasone. *J Cell Physiol* 206: 428-434
- Katahira J, Strässer K, Podtelejnikov A, Mann M, Jung JU, Hurt E** (1999) The Mex67p-mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human. *EMBO J* 18: 2593-2609
- Kendirgi F, Barry DM, Griffis ER, Powers MA, Wentz SR** (2003) An essential role for hGle1 nucleocytoplasmic shuttling in mRNA export. *J Cell Biol* 160: 1029-1040
- Khayat ZA, Tong P, Yaworsky K, Bloch RJ, Klip A** (2000) Insulin-induced actin filament remodelling colocalizes actin with phosphatidylinositol 3-kinase and GLUT4 in L6 myotubes. *J Cell Sci* 113: 279-290
- Kim KK, Hung LW, Yokota H, Kim R, Kim SH** (1998) Crystal structures of eukaryotic translation initiation factor 5A from *Methanococcus jannaschii* at 1.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 10419-10424
- Kim SH, Darby MK, Joho KE, Brown DD** (1990) The characterization of the TFIIIA synthesized in somatic cells of *Xenopus laevis*. *Genes Dev* 4: 1602-1610
- Kimura T, Hashimoto I, Nagase T, Fujisawa J** (2004) CRM1-dependent, but not ARE-mediated nuclear export of IFN- α 1 mRNA. *J Cell Sci* 117: 2259-2270
- Kimura T, Hashimoto I, Yamamoto A, Nishikawa M, Fujisawa J** (2000) Rev-dependent association of the intron-containing HIV-1 *gag* mRNA with the nuclear actin bundles and the inhibition of its nucleocytoplasmic transport by latrunculin-B. *Genes Cells* 5: 289-307
- Kiseleva E, Drummond SP, Goldberg MW, Rutherford SA, Allen TD, Wilson KL** (2004) Actin- and protein-4.1-containing filaments link nuclear pore complexes to subnuclear organelles in *Xenopus* oocyte nuclei. *J Cell Sci* 117: 2481-2490
- Kloc M, Etkin LD** (1995) Two distinct pathways for the localization of RNAs at the vegetal cortex in *Xenopus* oocytes. *Development* 121: 287-297
- Kloc M, Etkin LD** (2005) RNA localization mechanisms in oocytes. *J Cell Sci* 118: 269-282
- Kneissel S, Franke WW, Gall JG, Heid H, Reidenbach S, Schnölzer M, Spring H, Zentgraf H, Schmidt-Zachmann MS** (2001) A novel karyoskeletal protein: characterization of protein NO145, the major component of nucleolar cortical skeleton in *Xenopus* oocytes. *Mol Biol Cell* 12: 3904-3918
- Kobe B** (1999) Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin α . *Nat Struct Biol* 6: 388-397
- Kornberg RD** (2005) Mediator and the mechanism of transcriptional activation. *TRENDS in Biochem Sci* 30: 235-239
- Koul S, Verma V, Kumer A, Qazi GN** (1997) Rapid preparation and identification of insert-containing recombinant plasmid DNA. *Biotechniques* 23: 603-608
- Krohne G, Benavente R, Scheer U, Dabauvalle MC** (2005) The nuclear lamina in Heidelberg and Würzburg: a personal view. *Eur J Cell Biol* 84: 163-179
- Kruse M, Rosorius O, Krätzer F, Bevec D, Kuhnt C, Steinkasserer A, Schuler G, Hauber J** (2000) Inhibition of CD83 surface expression during dendritic cell maturation by interference with nuclear export of CD83 mRNA. *J Exp Med* 191: 1581-1589
- Kudo N, Khochbin S, Nishi K, Kitano K, Yanagida M, Yoshida M, Horinouchi S** (1997) Molecular cloning and cell cycle-dependent expression of mammalian CRM1, a protein involved in nuclear export of proteins. *J Biol Chem* 272: 29742-29751
- Kudo N, Matsumori N, Taoka H, Fujiwara D, Schreiner EP, Wolff B, Yoshida M, Horinouchi S** (1999) Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 9112-9117
- Kuersten S, Arts GJ, Walther TC, Englmeier L, Mattaj IW** (2002) Steady-state nuclear localization of exportin-t involves RanGTP binding and two distinct nuclear pore complex interaction domains. *Mol Cell Biol* 22: 5708-5720

- Kugel JF, Goodrich JA** (2002) Translocation after synthesis of a four-nucleotide RNA commits RNA polymerase II to promoter escape. *Mol Cell Biol* 22: 762-773
- Kurz A, Lampel S, Nickolenko JE, Bradl J, Brenner A, Zirbel RM, Cremer T, Lichter P** (1996) Active and inactive genes localize preferentially in the periphery of chromosome territories. *J Cell Biol* 135: 1195-1202
- Kutay U, Güttinger S** (2005) Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak. *Trends Cell Biol* 15:121-124
- Kutay U, Lipowsky G, Izaurralde E, Bischoff FR, Schwarzmaier P, Hartmann E, Görlich D** (1998) Identification of a tRNA-specific nuclear export receptor. *Mol Cell* 1: 359-369
- Kyrpides NC, Woese CR** (1998) Universally conserved translation initiation factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 224-228
- Kysela K, Philimonenko AA, Philimonenko VV, Janacek J, Kahle M, Hozak P** (2005) Nuclear distribution of actin and myosin I depends on transcriptional activity of the cell. *Histochem Cell Biol* 124: 347-358
- la Cour T, Kiemer L, Mølgaard A, Gupta R, Skriver K, Brunak S** (2004) Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel* 17: 527-536
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lagnado CA, Brown CY, Goodall GJ** (1994) AUUUA is not sufficient to promote poly(A) shortening and degradation of an mRNA: the functional sequence within AU-rich elements may be UUAUUUA(U/A)(U/A). *Mol Cell Biol* 14: 7984-7995
- Lai WS, Carballo E, Strum JR, Kennington EA, Phillips RS, Blackshear PJ** (1999) Evidence that tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA. *Mol Cell Biol* 19: 4311-4323
- Lai WS, Carballo E, Thorn JM, Kennington EA, Blackshear PJ** (2000) Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA. Binding of tristetraprolin-related zinc finger proteins to AU-rich elements and destabilization of mRNA. *J Biol Chem* 275: 17827-17837
- Lam YW, Trinkle-Mulcahy L, Lamond AI** (2005) The nucleolus. *J Cell Sci* 118: 1335-1337
- Lamond AI, Spector DL** (2003) Nuclear Speckles: A model for nuclear organelles. *Nature Rev Mol Cell Biol* 4: 605-612
- Lane NJ** (1969) Intranuclear fibrillar bodies in actinomycin D-treated oocytes. *J Cell Biol* 40: 286-291
- Lechmann M, Krooshoop DJ, Duduiak D, Kremmer E, Huhnt C, Figdor CG, Schuler G, Steinkasserer A** (2001) *J Exp Med* 194: 1813-1821
- Lee BM, Xu J, Clarkson BK, Martinez-Yamout MA, Dyson HJ, Case DA, Gottesfeld JM, Wright PE** (2006) Induced fit and "lock and key" recognition of 5 S RNA by Zinc fingers of transcription factor IIIA. *J Mol Biol* 357: 275-291
- Lee YB, Joe YA, Wolff EC, Dimitriadis EK, Park MH** (1999) Complex formation between deoxyhypusine synthase and its protein substrate, the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) precursor. *Biochem J* 340: 273-281
- Leung AK, Gerlich D, Miller G, Lyon C, Lam YW, Lleres D, Daigle N, Zomerdijk J, Ellenberg J, Lamond AI** (2004) Quantitative kinetic analysis of nucleolar breakdown and reassembly during mitosis in live human cells. *J Cell Biol* 166: 787-800
- Levine TD, Gao FB, King PH, Andrews LG, Keene JD** (1993) Hel-N1: an autoimmune RNA-binding protein with specificity for 3' uridylate-rich untranslated regions of growth factor mRNAs. *Mol Cell Biol* 13: 3494-3504
- Li AL, Li HY, Jin BF, Ye QN, Zhou T, Yu XD, P X, Man JH, He K, Yu M, Hu MR, Wang J, Yang SC, Shen BF, Zhang XM** (2004) A novel eIF5A complex functions as a regulator of p53 and p53-dependent apoptosis. *J Biol Chem* 279: 49251-49258
- Li M, Makkinje A, Damuni Z** (1996) Molecular identification of I1PP2A, a novel potent heat-stable inhibitor protein of protein phosphatase 2A. *Biochemistry* 35: 6998-7002
- Liker E, Fernandez E, Izaurralde E** (2000) The structure of the mRNA export factor TAP reveals a *cis* arrangement of a non-canonical RNP domain and an LRR domain. *EMBO J* 19: 5587-5598
- Lim RYH, Aebi U, Stoffler D** (2006a) From the trap to the basket: getting to the bottom of the nuclear pore complex. *Chromosoma* 115: 15-26
- Lim RYH, Fahrenkrog B** (2006) The nuclear pore complex up close. *Curr Opin Cell Biol* 18: 1-6
- Lim RYH, Huang NP, Köser J, Deng J, Lau KHA, Schwarz-Herion K, Fahrenkrog B, Aebi U** (2006b) Flexible phenylalanine-glycine nucleoporins as entropic barriers to nucleocytoplasmic transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:9512-9517

- Lindsay ME, Holaska JM, Welch K, Paschal BM, Macara IG** (2001). Ran-binding protein 3 is a cofactor for Crm1-mediated nuclear protein export. *J Cell Biol* 153: 1391-1402
- Lipowsky G, Bischoff FR, Schwarzmeier P, Kraft R, Kostka S, Hartmann E, Kuray U, Görlich D** (2000) Exportin 4: a mediator of a novel nuclear export pathway in higher eukaryotes. *EMBO J* 19: 4361-4371
- Liu YP, Nemeroff M, Yan YP, Chen KY** (1997) Interaction of eukaryotic initiation factor 5A with the human immunodeficiency virus type 1 Rev response element RNA and U6 snRNA requires deoxyhypusine or hypusine modification. *Biol Signals* 6: 166-174
- Loflin P, Chen Cy, Shyu AB** (1999) Unraveling a cytoplasmic role for hnRNP D in the in vivo mRNA destabilization directed by the AU-rich element. *Genes Dev* 13: 1884-1897
- Lopez-Garcia P, Moreira D** (1999) Metabolic symbiosis at the origin of eukaryotes. *Trends Biochem Sci* 24: 88-93
- Lounsbury KM, Beddow AL, Macara IG** (1994) A family of proteins that stabilize the Ran/TC4 GTPase in its GTP-bound conformation. *J Biol Chem* 269: 11285-11290
- Lourim D, Kempf, Krohne G** (1996) Characterization and quantitation of three B-type lamins in *Xenopus oocytes* and eggs: increase of lamin LI protein synthesis during meiotic maturation. *J Cell Sci* 109: 1775-1785
- Lund E, Dahlberg JE** (1998) Proofreading and aminoacylation of tRNAs before export from the nucleus. *Science* 282: 2082-2085
- Luo MJ, Reed R** (1999) Splicing is required for rapid and efficient mRNA export in metazoans. *PNAS USA* 96: 14937-14942
- Lyon MF** (1961) Gene action in the X chromosome of the mouse. *Nature* 190: 372-373
- Ma WJ, Cheng S, Campbell C, Wright A, Furneaux H** (1996) Cloning and characterization of HuR, a ubiquitously expressed Elav-like Protein. *J Biol Chem* 271: 8144-8151
- Ma WJ, Chung S, Furneaux H** (1997) The Elav-like proteins bind to AU-rich elements and to the poly(A) tail of mRNA. *Nucleic Acids Res* 25: 3564-3569
- Mahajan R, Delphin C, Guan T, Gerace L, Melchior F** (1997) A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanPB2. *Cell* 88: 97-107
- Mais C, Scheer U** (2001) Molecular architecture of the amplified nucleoli of *Xenopus oocytes*. *J Cell Sci* 114: 709-718
- Malim MH, Cullen BR** (1991) HIV-1 structural gene expression requires the binding of multiple Rev monomers to the viral RRE-implications for HIV-1 latency. *Cell* 65: 241-248
- Malim MH, Hauber J, Le SY, Maizel JV, Cullen BR** (1989) The HIV-1 *rev trans*-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* 338: 254-257
- Malim MH, Tiley LS, McCarn DF, Rusche JR, Hauber J, Cullen BR** (1990) HIV-1 structural gene expression requires binding of the Rev *trans*-activator to its RNA target sequence. *Cell* 60: 675-683
- Mattaj IW, Coppard NJ, Brown RS, Clark BFC, De Robertis EM** (1987) 42Sp48 – the most abundant protein in previtelogenic *Xenopus oocytes* – resembles elongation factor 1 α structurally and functionally. *EMBO J* 6: 2409-2413
- Mazan-Mamczarz K., Galban S, Lopez de Silanes I, Martindale JL, Atasoy U, Keene JD, Gorospe M** (2003) RNA-binding protein HuR enhances p53 translation in response to ultraviolet light irradiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 8354–8359
- McDonald D, Carrero g, Andrin C, de Vries G, Hendzel M** (2006) Nucleoplasmic β -actin exists in a dynamic equilibrium between low mobility polymeric species and rapidly diffusing populations. *J Cell Biol* 172: 541-552
- Michael WM** (2000) Nucleocytoplasmic shuttling signals: two for the price of one. *Trends Cell Biol* 10: 46-50
- Michael WM, Choi M, Dreyfuss G** (1995) A nuclear export signal in hnRNA A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway. *Cell* 83: 415-422
- Michael WM, Eder PS, Dreyfuss G** (1997) The K nuclear shuttling domain: a novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein. *EMBO J* 16:3587-3598
- Milankov K, De Boni U** (1993) Cytochemical localization of actin and myosin aggregates in interphase nuclei in situ. *Exp Cell Res* 209: 189-199
- Miller J, McLachlan AD, Klug A** (1985) Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*. *EMBO J* 4: 1609-1614
- Miller OL Jr, Beatty BR** (1969) Visualization of nucleolar genes. *Science* 164: 955-957

- Milloning R, Salvo H, Aebi U** (1988) Probing actin polymerization by intermolecular cross-linking. *J Cell Biol* 106: 785-796
- Moorefield B, Roeder RG** (1994) Purification and characterization of human transcription factor IIIA. *J Biol Chem* 269: 20857-20865
- Morrison J, Yang JC, Stewart M, Neuhaus D** (2003) Solution NMR study of the interaction between NTF2 and nucleoporin FxFG repeats. *J Mol Biol* 222: 587-603
- Mosammamarast N, Pemberton LF** (2004) Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators. *Trends Cell Biol* 14: 547-556
- Moss T, Stefanovsky VY** (2002) At the center of eukaryotic life. *Cell* 109: 545-548
- Murphy C, Wang Z, Roeder RG, Gall JG** (2002) RNA polymerase III in Cajal bodies and lampbrush chromosomes of the *Xenopus* oocyte nucleus. *Mol Biol Cell* 13: 3466-3476
- Myer VE, Fan XC, Steitz JA** (1997) Identification of HuR as a protein implicated in AUUUA-mediated mRNA decay. *EMBO J* 16: 2130-2139
- Nakielný S, Dreyfuss G** (1999) Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell* 99: 677-690
- Nakielný S, Skaikh S, Burke B, Dreyfuss G** (1999) Nup153 is an M9 containing mobile nucleoporin with a novel Ran-binding domain. *EMBO J* 18: 1982-1995
- Nemergut ME, Mizzen CA, Stukenberg T, Allis CD, Macara IG** (2001) Chromatin docking and exchange activity enhancement of RCC1 by histones H2A and H2B. *Science* 292: 1540-1543
- Nowak G, Pestic-Dragovich P, Hozák P, Philimonenko A, Simerly C, Schatten G, de Lanerolle P** (1997) Evidence for the presence of myosin I in the nucleus. *J Biol Chem* 272: 17176-17181
- Ogilvie MK, Hanas JS** (1997) Molecular biology of vertebrate transcription factor IIIA: cloning and characterization of TFIIIA from channel catfish oocytes. *Gene* 203: 103-112
- Ohno M, Segref A, Bachi A, Wilm M, Mattaj JW** (2000) PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation. *Cell* 101: 187-198
- Okuwaki M, Nagata K** (1998) Template activating factor-I remodels the chromatin structure and stimulates transcription from the chromatin template. *J Biol Chem* 273: 34511-34518
- Olson MOJ, Dundr M** (2005) The moving parts of the nucleolus. *Histochem Cell Biol* 123: 203-216
- Ornstein L** (1964) Disc electrophoresis. I. Background and Theory. *Ann N Y Acad Sci* 121: 321-349
- Ouchterlony O, Nilsson LA** (1978) Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: *Handbook of experimental immunology*, Weir DM (ed), 3rd ed, Oxford: Blackwell Scientific Publication, 19.16.-19.28.
- Park MH** (1989) The essential role of hypusine in eukaryotic translation initiation factor 4D. *J Biol Chem* 264: 18531-18535
- Park MH, Cooper HL, Folk JE** (1982) The biosynthesis of protein-bound hypusine (N ϵ -(4-amino-2-hydroxybutyl)lysine). Lysine as the amino acid precursor and the intermediate role of deoxyhypusine (N ϵ -(4-aminobutyl)lysine). *J Biol Chem*. 257: 7217-7222
- Pasquinelli AE, Ernst RK, Lund E, Grimm C, Zapp ML, Rekosh D, Hammarskjöld ML, Dahlberg JE** (1997) The constitutive transport element (CTE) of Mason-Pfizer monkey virus (MPMV) accesses a cellular mRNA export pathway. *EMBO J* 16: 7500-7510
- Peat TS, Newman J, Waldo GS, Berendtsen J, Terwilliger TC** (1998) Structure of translation initiation factor 5A from *Pyrobaculum aerophilum* at 1.75 Å resolution. *Structure* 6: 1207-1214
- Pederson T, Aebi U** (2003) Actin in the nucleus: what form and what for? *J Struct Biol* 140: 3-9
- Pederson T, Aebi U** (2005) Nuclear actin extends, with no contraction in sight. *Mol Biol Cell* 16: 5055-5060
- Pederson T, Politz JC** (2000) The nucleolus and the four ribonucleoproteins of translation. *J Cell Biol* 148: 1091-1095
- Pelham H, Brown DD** (1980) A specific transcription factor that can bind either the 5S RNA gene or 5S RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 4170-4174
- Pemberton LF, Paschal BM** (2005) Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic* 6: 187-198
- Pendleton A, Pepe B, Weeds A, Koffer A** (2003) Latrunculin B of ATP depletion induces cofilin dependent translocation of actin into nuclei of mast cells. *J Biol Chem* 278: 14394-14400
- Peng SS, Chen CY, Xu N, Shyu AB** (1998) RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein. *EMBO J* 12: 3461-3470

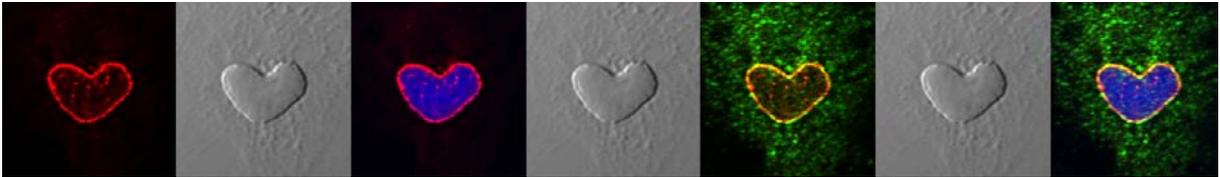
- Pennisi E** (2004) The Birth of the Nucleus. *Science* 305: 766-768
- Percipalle P, Fomproix, Cavellán E, Voit R, Reimer G, Krüger T, Thyberg J, Scheer U, Grummt I, Östlund Farrants AK** (2006) The chromatin remodelling complex WSTF-SNF2h interacts with nuclear myosin I and has a role in RNA polymerase I transcription. *EMBO reports* 7: 525-530
- Percipalle P, Zhao J, Pope B, Weeds A, Lindberg U, Daneholt B** (2001) Actin bound to the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein hrp36 is associated with Balbiani ring mRNA from the gene to polysomes. *J Cell Biol* 153: 229-236
- Pestic-Dragovich L, Stojiljkovic L, Philimonenko AA, Nowak G, Ke Y, Settlage RE, Shabanowitz J, Hunt DF, Hozak P, de Lanerolle P** (2000) A myosin I isoform in the nucleus. *Science* 290: 337-341
- Petosa C, Schoehn G, Askjaer P, Bauer U, Moulin M, Steuerwald U, Soler-López M, Baudin F, Mattay IW, Müller CW** (2004) Architecture of CRM1/exportin1 suggests how cooperativity is achieved during formation of a nuclear export complex. *Mol Cell* 16: 761-775
- Philimonenko VV, Zhao J, Iben S, Dingova H, Kysela K, Kahle M, Zentgraf H, Hofmann WA, de Lanerolle P, Hozak P, Grummt I** (2004) Nuclear actin and myosin I are required for RNA polymerase I transcription. *Nat Cell Biol* 6: 1165-1172
- Politz JC, Tuft RA, Pederson T, Singer RH** (1999) Movement of nuclear poly(A) RNA throughout the interchromatin space in living cells. *Curr Biol* 9: 285-291
- Politz JC, Tuft RA, Prasanth KV, Baudendistel N, Fogarty KE, Lifshitz LM, Langowski J, Spector DL, Pederson T** (2006) Rapid, diffusional shutteling of poly(A) RNA between nuclear speckles and the nucleoplasm. *Mol Biol Cell* 17: 1239-1249
- Politz JCR, Tuft RA, Pederson T** (2003) Diffusion-based transport of nascent ribosomes in the nucleus. *Mol Biol Cell* 14: 4805-4812
- Pollard TD, Korn ED** (1973) *Acanthamoeba* myosin. I. Isolation from *Acanthamoeba castellanii* of an enzyme similar to muscle myosin. *J Biol Chem* 248: 4682-4690
- Powers MA, Forbes DJ, Dahlberg JE, Lund E** (1997) The vertebrate GLFG nucleoporin, nup98, is an essential component of multiple RNA export pathways. *J Cell Biol* 136: 241-250
- Prechtel AT, Chemnitz J, Schirmer S, Ehlers C, Langbein-Detsch, Stülke J, Dabauvalle MC, Kehlenbach RH, Hauber J** (2006) Expression of CD83 is regulated by HuR via a novel cis-active coding region RNA element. *J Biol Chem* 281: 10912-10925
- Proudfoot NJ, Furger A, Dye MJ** (2002) Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* 108: 501-512
- Purkinje JE** (1830) *Symbolae ad ovi avium historiam ante incubationem*. Leopold Vossi, Leipzig 1-24
- Quimby BB, Dasso M** (2003) The small GTPase Ran: interpreting the signs. *Curr Opin Cell Biol* 15: 338-344
- Raška I** (2003) Oldies but Goldies: searching for Christmas trees within the nucleolar architecture. *Trends Cell Biol* 13: 517-525
- Reed R** (2003) Coupling transcription, splicing and mRNA export. *Current Opinion in Cell Biology* 15: 326-331
- Reed R, Chang H** (2005) TREX, SR proteins and export. *Curr Opin Cell Biol* 17: 269-273
- Reichelt R, Holzenburg, A, Buhle EL jr., Jarnik M, Engel A, Aebi U** (1990) Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. *J Cell Biol* 110: 883-894
- Reimer G, Pollard KM, Penning CA, Ochs RL, Lischwe MA, Busch H, Tan EM** (1987b) Monoclonal autoantibody from a (New Zealand black x New Zealand white) F1 mouse and some human scleroderma sera target an Mr 34,000 nucleolar protein of the U3 RNP particle. *Arthritis Rheum* 30: 793-800
- Reimer G, Rose KM, Scheer U, Tan EM** (1987a) Autoantiantibody to RNA polymerase I in scleroderma sera. *J Clin Invest* 79: 65-72
- Reizes O, Barylko B, Li C, Sudhof TC, Albanesi JP** (1994) Domain structure of a mammalian myosin I β . *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6349-6353
- Ribeiro S, Golding GB** (1998) The mosaic nature of the eukaryotic nucleus. *Mol Biol Evol* 15: 779-788
- Robbins J, Dilworth SM, Laskey RA, Dingwall C** (1991) Two interdependent basic domains in nucleoplasmic nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* 64: 615-623
- Rocak S, Linder P** (2004) DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 232-241
- Rodrigues JP, Rode M, Gatfield D, Blencowe BJ, Carmo-Fonseca M, Izaurralde E** (2001) REF proteins mediate the export of spliced and unspliced mRNAs from the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 1030-1035

- Roeder RG** (2005) Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells. *FEBS Lett* 579: 909-915
- Rosorius O, Reichart B, Krätzer F, Heger P, Dabauvalle MC, Hauber J** (1999) Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1. *J Cell Sci* 112: 2369-2380
- Rout M, Aitchison JD, Suprapto A, Hjertaas K, Zhao Y, Chait BT** (2000) The yeast nuclear pore complex: Composition, architecture and transport mechanism. *J Cell Biol* 148: 635-651
- Rout MP, Aitchison JD, Magnasco MO, Chait BT** (2003) Virtual gating and nuclear transport: the hole picture. *Trends Cell Biol* 13: 622-628
- Rückert J** (1892) Zur Entwicklungsgeschichte des Ovarialeies bei Selachiern. *Anat Anz* 7: 107-158
- Rudt F, Pieler T** (1996) Cytoplasmic retention and nuclear import of 5S ribosomal RNA containing RNPs. *EMBO J* 15: 1383-1391
- Rudt F, Pieler T** (2001) Cytosolic import factor- and Ran-independent nuclear transport of ribosomal protein L5. *Eur J Cell Biol* 80: 661-668
- Ruhl M, Himmelpach M, Bahr GM, Hammerschmid F, Jaschke H, Wolff B, Aschauer H, Farrington GK, Probst H, Bevec D, Hauber J** (1993) Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 rev activation domain mediating *trans*-activation. *J Cell Biol* 123: 1309-1320
- Rungger D, Rungger-Brändle E, Chaponnier C, Gabbiani G** (1979) Intranuclear injection of anti-actin antibodies into *Xenopus* oocytes blocks chromosome condensation. *Nature* 282: 320-321
- Ruppert C, Godel J, Müller RT, Kroschewski R, Reinhard J, Bähler M** (1995) Localization of the rat myosin I molecules myr 1 and myr 2 and in vivo targeting of their tail domains. *J Cell Sci* 108: 3775-3786
- Sadoni N, Langer S, Fauth C, Bernardi G, Cremer T, Turner BM, Zink D** (1999) Nuclear organization of mammalian genomes. Polar chromosome territories build functionally distinct higher order compartments. *J Cell Biol* 146: 1211-1226
- Saito S, Miyaji-Yamaguchi M, Shimoyama T, Nagata K** (1999) Functional domains of template-activating factor-I as a protein phosphatase 2A inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 259:471-475
- Sakonju S, Bogenhagen DF, Brown DD** (1980) A control region in the center of the 5S RNA gene directs specific initiation of transcription. I. The 5' border of the region. *Cell* 19: 13-25
- Sanford JR, Caceres JF** (2004) Pre-mRNA splicing: life at the centre of the central dogma. *J Cell Sci* 117: 6261-6263
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1977) DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467
- Sarkar S, Azad AK, Hopper AK** (1999) Nuclear tRNA aminoacylation and its role in nuclear export of endogenous tRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14366-14371
- Schatz O, Oft M, Dascher C, Schebesta M, Rosorius O, Jaksche H, Dobrovnik M, Bevec D, Hauber J** (1998) Interaction of the HIV-1 Rev cofactor eukaryotic initiation factor 5A with ribosomal protein L5. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 1607-1612
- Scheer U** (1973) Nuclear pore flow rate of ribosomal RNA and chain growth rate of its precursor during oogenesis of *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 30: 13-28
- Scheer U, Dabauvalle MC, Krohne G, Zahedi RP, Sickmann A** (2005) Nuclear envelopes from amphibian oocytes – from morphology to protein inventory. *Eur J Cell Biol* 84: 151-162
- Scheer U, Hinssen H, Franke WW, Jockusch BM** (1984) Microinjection of actin-binding proteins and actin antibodies demonstrates involvement of nuclear actin in transcription of lampbrush chromosomes. *Cell* 39: 111-122
- Scheer U, Hock R** (1999) Structure and function of the nucleolus. *Curr Opin Cell Biol* 11: 385-390
- Scheer U, Weisenberger D** (1994) The nucleolus. *Curr Opin Cell Biol* 6: 354-359
- Schmitt C, von Kobbe C, Bachi A, Panté N, Rodrigues JP, Boscheron C, Rigaut G, Wilm M, Séraphin B, Carmo-Fonseca M, Izaurralde E** (1999) Dbp5, a DEAD-box protein required for mRNA export, is recruited to the cytoplasmic fibrils of nuclear pore complex via a conserved interaction with CAN/Nup159p. *EMBO J* 18: 4332-4347.
- Schneider H** (2004) Untersuchung der oozytenspezifischen Variante des Proteins TFIIIA in *Xenopus laevis*. Diplomarbeit Universität Würzburg
- Schoenenberger CA, Bachmeier S, Boerries M, Sutterlin R, Aebi U, Jockusch BM** (2005) Conformation-specific antibodies reveal distinct actin structures in the nucleus and the cytoplasm. *J Struct Biol* 152: 157-168

- Schramm L, Hernandez N** (2002) Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes Dev* 16: 2593-2620
- Schütz S, Chemnitz J, Spillner C, Frohme M, Hauber J, Kehlenbach RH** (2006) Stimulated expression of mRNAs in activated T cells depends on functional CRM1 nuclear export pathway. *J Mol Biol* 358: 997-1009
- Schwarzacher HG, Mosgoeller W** (2000) Ribosome biogenesis in man: Current views on nucleolar structures and function. *Cytogenet Cell Genet* 91: 243-252
- Seimiya H, Sawada H, Muramatsu Y, Shimizu M, Ohko K, Yamane K, Tsuruo T** (2000) Involvement of 14-3-3 proteins in nuclear localization of telomerase. *EMBO J* 19: 2652-2661
- Seither P, Zatschina P, Hoffmann M, Grummt I** (1997) Constitutive and strong association of PAF53 with RNA polymerase I. *Chromosoma* 106: 216-225
- Senay C, Ferrari P, Rocher C, Rieger KJ, Winter J, Platel D, Bourne Y** (2003) The Mtr2-Mex67 NTF2-like domain complex. Structural insights into a dual role of Mtr2 for yeast nuclear export. *J Biol Chemistry* 278: 48395-48403
- Shapiro AL, Vinuela E, Maizel JV Jr.** (1967) Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* 28: 815-820
- Shastry BS, Honda BM, Roeder RG** (1984) Altered levels of a 5S gene-specific transcription factor (TFIIIA) during oogenesis and embryonic development of *Xenopus laevis*. *J Biol Chem* 259: 11373-11382
- Shav-Tal Y, Blechman J, Darzacq X, Montagna C, Dye BT, Patton JG, Singer RH, Zipori D** (2005) Dynamic sorting of nuclear components into distinct nucleolar caps during transcriptional inhibition. *Mol Biol Cell* 16: 2395-2413
- Shaw G, Kamen R** (1986) A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 46: 659-667
- Sherman MP, Greene WC** (2002) Slipping through the door: HIV entry into the nucleus. *Microbes Infect* 4: 67-73
- Singh US, Li Q, Cerione R** (1998) Identification of the Eukaryotic Initiation Factor 5A as a Retinoic Acid-stimulated Cellular Binding Partner for Tissue Transglutaminase II. *J Biol Chem* 273: 1946-1950
- Smith SS, Kelly KH, Jockusch BM** (1979) Actin co-purifies with RNA polymerase II. *Biochem Biophys Res Commun* 86: 161-166
- Smith TF, Gaitatzes C, Saxena K, Neer EJ** (1999) The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci* 24: 181-185
- Smit-McBride Z, Dever TE, Hershey JWB, Merrick WC** (1989a) Sequence determination and cDNA cloning of eukaryotic initiation factor 4D, the hypusine-containing protein. *J Biol Chem*. 264: 1578-1583
- Smit-McBride Z, Schnier J, Kaufman RJ, Hershey JWB** (1989b) Protein synthesis initiation factor eIF-4D. *J Biol Chem* 264: 18527-18530
- Sommer P, Nehrbass U** (2005) Quality control of messenger ribonucleoprotein particles in the nucleus and at the pore. *Curr Opin Cell Biol* 17: 294-301
- Spector DL** (2001) Nuclear domains. *J Cell Science* 114: 2891-2893
- Steitz JA, Berg C, Hendrick JP, La Branche-Chabot H, Metspaly A, Rinke J, Yario T** (1988) A 5S rRNA/L5 complex is a precursor to ribosome assembly in mammalian cells. *J Cell Biol* 106: 545-556
- Stoffler D, Feja B, Fahrenkrog B, Walz J, Typke D, Aebi U** (2003) Cryo-electron tomography provides novel insights into nuclear pore architecture: implications for nucleocytoplasmic transport. *J Mol Biol* 328: 119-130
- Strahm Y, Fahrenkrog B, Zenklusen D, Rychner E, Kantor J, Rosbash M, Stutz F** (1999) The RNA export factor Gle1p is located on the cytoplasmic fibrils of the NPC and physically interacts with the FG-nucleoporin Rip1p, the DEAD-box protein Rat8p/Dbp5p and a new protein Ymr255p. *EMBO J* 18: 5761-5777
- Strawn LA, Shen T, Shulga N, Goldfarb DS, Wentz SR** (2004) Minimal nuclear pore complexes define FG repeat domains essential for transport. *Nat Cell Biol* 6: 197-206
- Stüven T, Hartmann E, Görlich D** (2003) Exportin 6: a novel nuclear export receptor that is specific for profilin-actin complexes. *EMBO J* 22: 5928-5940
- Szabo A, Dalmau J, Manley G, Rosenfeld M, Wong E, Henson J et al** (1991) HuD, a paraneoplastic encephalomyelitis antigen, contains RNA-binding domains and is homologous to Elav and Sex-lethal. *Cell* 67: 325-333
- Theunissen O, Rudt F, Pieler T** (1998) Structural determinants in 5S RNA and TFIIIA for 7S RNP formation. *Eur J Biochem* 258: 758-767

- Thiry M, Lafontaine DLJ** (2005) Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartment. *Trends Cell Biol* 15: 194-199
- Thomas JO, Kornberg RD** (1975) An octamer of histones in chromatin and free in solution. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 2626-2630
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680
- Tollervey D, Lehtonen H, Jansen R, Kern H, Hurt EC** (1993) Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell* 72: 443-457
- Tomlinson RL, Ziegler TD, Supakorndej T, Terns RM, Terns MP** (2006) Cell cycle-regulated trafficking of human telomerase to telomeres. *Mol Biol Cell* 17: 955-965
- Towbin H, Staehlin T, Gordon J** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354
- Tran EJ, Wentz SR** (2006) Dynamic nuclear pore complexes: Life on the Edge. *Cell* 125: 1041-1053
- Truant R, Cullen BR** (1999) The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin β -dependent nuclear localization signals. *Mol Cell Biol* 19: 1210-1217
- Tseng SS, Weaver PL, Liu Y, Hitomi M, Tartakoff AM, Chang TH** (1998) Dbp5p, a cytosolic RNA helicase, is required for poly(A)⁺ RNA export. *EMBO J* 17: 2651-2662
- Ullman KS, Shah S, Powers MA, Forbes DJ** (1999) The nucleoporin nup153 plays a critical role in multiple types of nuclear export. *Mol Biol Cell* 10: 649-664
- Verschure PJ, van der Kraan I, Manders EMM van Driel R** (1999) Spatial relationship between transcription sites and chromosome territories. *J Cell Biol* 147: 13-24
- Vreugde S, Ferrai C, Miluzio A, Hauben E, Marchisio PC, Crippa MP, Bussi M, Biffo S** (2006) Nuclear myosin VI enhances RNA polymerase II-dependent transcription. *Mol Cell* 23: 749-755
- Visegrady BD, Lorinczy D, Hild G, Somogyi B, Nyitrai M** (2005) A simple model for the cooperative stabilisation of actin filaments by phalloidin and jasplakinolide. *FEBS Lett* 579: 6-10
- von Lindern M, van Baal S, Wiegant J, Raap A, Hagemeyer A, Grosveld G** (1992) Can, a putative oncogene associated with myeloid leukemogenesis, may be activated by fusion of its 3' half to different genes: characterization of the set gene. *Mol Cell Biol* 12: 3346-3355
- Wada A, Fukuda M, Mishima M, Nishida E** (1998) Nuclear export of actin: a novel mechanism regulating the subcellular localization of a major cytoskeletal protein. *EMBO J* 17: 1635-1641
- Wagner MC, Barylko B, Albanesi JP** (1992) Tissue distribution and subcellular localization of mammalian myosin I. *J Cell Biol* 119: 163-170
- Wallace RA, Jared DW, Dumont JN, Sega MW** (1973) Protein incorporation by isolated amphibian oocytes: III. Optimum incubation conditions. *J Exp Zool* 184: 321-333
- Walther TC, Alves A, Pickersgill H, Loiodice I, Hetzer M, Galy V, Hulsmann BB, Kocher T, Wilm M, Allen T et al.** (2003) The conserved Nup107-160 complex is critical for nuclear pore complex assembly. *Cell* 113: 195-206
- Wasser M, Chia W** (2000) The EAST protein of *Drosophila* controls an expandable nuclear endoskeleton. *Nature Cell Biol* 2: 268-275
- Weirich CS, Erzberger JP, Flick JS, Berger JM, Thorner J, Weis K** (2006) Activation of the DExD/H-box protein Dpb5 by the nuclear protein Gle1 and its coactivator InsP₆ is required for mRNA export. *Nature Cell Biol* 8: 668-676
- Weis K** (2003) Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell* 112: 441-445
- Wen W, Meinkoth JL, Tsien RY, Taylor SS** (1995) Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* 82: 463-473
- White RJ** (2004) RNA polymerase III transcription – a battleground for tumour suppressors and oncogenes. *Eur J Cancer* 40: 21-27
- White RJ** (2005) RNA polymerases I and III growth control and cancer. *Nature Rev Mol Cell Biol* 6: 69-78
- Wickens M, Landerson P, Jackson RJ** (1997) Life and death in the cytoplasm: messages from the 3' end. *Curr Opin Genet Dev* 7: 220-232

- Wiegand HL, Coburn GA, Zeng Y, Kang Y, Bogerd HP, Cullen BR** (2002) Formation of Tap-NXT1 heterodimers activates Tap-dependent nuclear mRNA export by enhancing recruitment to nuclear pore complexes. *Mol Cell Biol* 22: 245-256
- Wilk K, Bilinski S, Dougherty MT, Kloc M** (2004) Delivery of germinal granules and localized RNAs via the messenger transport organizer pathway to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes occurs through directional expansion of the mitochondrial cloud. *Int J. Dev Biol* 49: 17-21
- Wischniewski J, Rudt F, Pieler T** (2004) Signals and receptors for the nuclear transport of TFIIIA in *Xenopus* oocytes. *Eur J Cell Biol* 83: 55-66
- Wolffe AP** (1992) New insights into chromatin function in transcriptional control. *FASEB J* 6: 3354-3361
- Wolffe AP, Brown DD** (1988) Developmental regulation of two 5S ribosomal RNA genes. *Science* 241: 1626-32
- Woychik NA, Hampsey M** (2002) The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell* 108: 453-463
- Wu Z, Gall JG** (1997) "Micronucleoli" in the *Xenopus* germinal vesicle. *Chromosoma* 105: 438-443
- Wu Z, Murphy C, Gall JG** (1994) Human p80-coilin is targeted to sphere organelles in the amphibian germinal vesicle. *Mol Biol Cell* 5: 1119-1127
- [#81](http://www.laborjournal.de-Labortrick-Tipp)
- Xu A, Chen KY** (2001) Hypusine is required for a sequence-specific interaction of eukaryotic initiation factor 5A with postsystematic evolution of ligands by exponential enrichment RNA. *J Biol Chem* 276: 2555-2561
- Xu A, Jao DLE, Chen KY** (2004) Identification of mRNA that binds to eukaryotic initiation factor 5A by affinity co-purification and differential display. *Biochem J* 384: 585-590
- Yang J, Bogerd HP, Wang PJ, Page DC, Cullen BR** (2001) Two closely related human nuclear export factors utilize entirely distinct export pathways. *Mol Cell* 8: 397-406
- Yang Q, Rout MP, Akey CW** (1998) Three-dimensional architecture of the isolated yeast nuclear pore complex: functional and evolutionary considerations. *Mol Cell* 1: 223-234
- Yang W, Gelles J, Musser SM** (2004) Imaging of single-molecule translocation through nuclear pore complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 12887-12892
- Ye J, Zhao J, Hoffmann-Rohrer U, Grummt I** (2008) Nuclear myosin I acts in concert with polymeric actin to drive RNA polymerase I transcription. *Genes Dev* 22: 322-330
- Yedavalli VSRK, Neuveut C, Chi Y, Kleiman L, Jeang KT** (2004) Requirement of DDX3 DEAD Box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function. *Cell* 119: 381-392
- Zhao J, Jin SB, Bjorkroth B, Wieslander L, Daneholt B** (2002) The mRNA export factor Dbp5 is associated with Balbiani ring mRNA from gene to cytoplasm. *EMBO J* 21: 1177-1187
- Zhao J, Yuan Y, Frödin M, Grummt I** (2003) The activity of TIF-IA, a basal RNA polymerase I transcription factor, is regulated by MAP kinase-mediated signaling. *Mol. Cell* 11: 405-413
- Zhou LJ, Schwartning R, Smith RM, Tedder TF** (1992) A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily. *J Immunol* 149: 735-742
- Zhou LJ, Tedder TF** (1995) Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* 154: 3821-3835
- Zhou LJ, Tedder TF** (1996) CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2588-2592
- Zhou Z, Luo MJ, Straesser K, Katahira J, Hurt E, Reed R** (2000) The protein Aly links pre-messenger-RNA splicing to nuclear export in metazoans. *Nature* 407: 401-405
- Zanelli CF, Maragno ALC, Gregio APB, Komili S, Pandolfi JR, Mestriner CA, Lustrini WR, Valentini SR** (2006) eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. *Biochem Biophys Res Com* 348: 1358-1366

10. DANKSAGUNG

Bedanken möchte ich mich bei

- Frau Prof. Dr. M.-C. Dabauvalle und Herrn Prof. U. Scheer für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes
- ... Frau Prof. Dr. S. Schneider-Schaulies für die Übernahme des Zweitgutachtens
- ... Herrn Prof. Dr. J. Hauber und seinen Mitarbeitern
- ... Herrn Prof. Dr. H. Zentgraf und seinen Mitarbeitern
- ... allen Mitarbeitern der Abteilung Zell- und Entwicklungsbiologie
- ... allen Mitarbeitern der Abteilung Elektronenmikroskopie
- ... dem MD/PhD-Programm der Universität Würzburg
- ... meiner Familie und meinen Freunden
- ... und bei



11. LEBENSLAUF**Stefanie Glaser*****19.10.1972 in Straubing/Niederbayern**

Schulbildung:	1979 - 1983	Grundschule Aiterhofen
	1983 - 1992	Anton-Bruckner-Gymnasium Straubing
	Juli 1992	Allgemeine Hochschulreife
Studium:	1992 - 2000	Studium der Humanmedizin an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau
	Nov. 2000	Abschluß des Medizinstudiums
	2001 - 2001	Aufbaustudium Biologie an der Bayerischen Julius- Maximilians-Universität Würzburg
	Juli 2001	Eignungsprüfung für die Zulassung zum Promotionsstudium der Biologischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg
Dissertation	1998 - 2000	Medizinische Universitätsklinik der Albert-Ludwigs- Universität Freiburg im Breisgau Abteilung Hämatologie/Onkologie Dr. U. Martens/Prof. Dr. W. Lange Thema: "Etablierung eines retroviralen Gentransfer- Systems mit dem Ziel der Manipulation humaner Telomere in Fibroblasten und hämatopoetischen Zellen"
	Juli 2001	Verleihung des medizinischen Doktorgrades durch die Medizinische Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau
	2002 - 2006	Biozentrum der Julius-Maximilians-Universität Würzburg Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie Prof. Dr. M.-C. Dabauvalle Thema: „Analyse des RNA-Kernexportes im Modellsystem <i>Xenopus laevis</i> “
Weiterbildung:	2001 - 2002	Innere Medizin/Humangenetik Universitätsklinik der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau und Klinikum der Julius- Maximilians-Universität Würzburg
	seit 2007	Institut für Zell- und Molekularpathologie, Zentrum für Forensik, Pathologie und Genetik der Medizinischen Hochschule Hannover

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde.

Weiterhin habe ich noch keinen Promotionsversuch unternommen oder diese Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Hannover, den 07.04.2008

Stefanie Glaser