

# Beteiligung des Major Vault Proteins an der Kernporenkomplexbildung

Dissertation zur Erlangung des  
Naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
Der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Christian Hacker  
aus Schweinfurt

Würzburg 2010

Eingereicht am: .....

**Mitglieder der Promotionskommission:**

**Vorsitzender:** .....

**Gutachter:** Prof. Dr. Marie-Christine Dabauvalle

**Gutachter:** Prof. Dr. Clemens Müller-Reible

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
2.1	Die Kernhülle im Verlauf des Zellzyklus	6
2.2	Der Kernporenkomplex	7
2.3	Komposition und Struktur eines Kernporenkomplexes	7
2.4	Molekularer Aufbau von Kernporenkomplexen	9
2.5	Die Auflösung der Kernhülle	12
2.6	Abbau von Kernporenkomplexen	13
2.7	Die Neubildung der Kernhülle	14
2.8	Assemblierung des Kernporenkomplexes	18
2.9	Die Funktionen des Kernporenkomplexes und der Nukleoporine	20
2.9.1	Der nukleo-zytoplasmatische Transport	20
2.9.2	Transport-unabhängige Funktionen von Nukleoporinen	22
2.10	Annulate Lamellae	24
2.11	Der Vault-Komplex	25
2.12	Major Vault Protein (MVP)	27
2.13	Vault-Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (vPARP)	31
2.14	Telomerase-assoziiertes Protein 1 (TEP1)	33
2.15	Vault RNA (vRNA)	34
2.16	Lokalisation und Transport von Vaults	36
2.17	Zelluläre Funktion der Vault-Komplexe	38
2.18	Zielsetzung der Arbeit	41
<b>3.</b>	<b>Material</b>	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b><i>Biologisches Material</i></b>	<b>43</b>
3.1.1	Versuchstiere	43
3.1.2	Bakterienstämme	43
3.1.3	Zelllinien	43
3.1.4	Antikörper	43
3.1.4.1	Primärantikörper	43
3.1.4.2	Sekundärantikörper	44
<b>3.2</b>	<b><i>Molekularbiologisches Material</i></b>	<b>44</b>
3.2.1	Expressionsvektoren	44
3.2.2	Enzyme	47

3.2.3	Oligonukleotide	47
3.2.4	Größenstandards	47
3.2.5	Kits und Kitbestandteile	47
<b>3.3</b>	<b><i>Chemikalien</i></b>	<b>48</b>
<b>3.4</b>	<b><i>Geräte</i></b>	<b>48</b>
<b>4.</b>	<b>Methoden</b>	<b>50</b>
<b>4.1</b>	<b><i>Mikrobiologische Methoden</i></b>	<b>50</b>
4.1.1	Flüssigkultur von Bakterien	50
4.1.2	Bestimmung der Bakteriendichte einer Flüssigkultur durch photometrische Messung	50
4.1.3	Glycerinkultur	51
4.1.4	Herstellung von Agar-Selektionsplatten	51
4.1.5	Herstellung von chemisch kompetenten Bakterien	51
4.1.6	Bestimmung der Kompetenz	52
4.1.7	Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien	52
<b>4.2</b>	<b><i>Molekularbiologische Methoden</i></b>	<b>52</b>
4.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA	52
4.2.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	53
4.2.3	Herstellung von Oligonukleotid-Primern	53
4.2.4	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	54
4.2.5	Kolonie-PCR	56
4.2.6	Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese	57
4.2.7	Extraktion von Nukleinsäure aus Agarose-Gelen	59
4.2.8	Fällung von Nukleinsäuren	59
4.2.9	Sequenzierung von Nukleinsäuren	59
4.2.10	UA-Klonierung von PCR-Fragmenten	60
4.2.11	Transformation von Klonierungsvektoren	61
4.2.12	Restriktionsverdau	61
4.2.13	Gewinnung des Inserts	62
4.2.14	Dephosphorylierung von Klonierungsvektoren	62
4.2.15	Ligation	63
<b>4.3</b>	<b><i>Proteinbiochemische Methoden</i></b>	<b>63</b>
4.3.1	Eindimensionale SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Thomas und Kornberg (1975)	63
4.3.2	Färben von Proteingelen	66
4.3.2.1	Herkömmliche Coomassie-Färbung	66
4.3.2.2	Modifizierte Coomassie-Färbung	67

4.3.2.3	Page-Blue™-Färbung	67
4.3.2.4	Silberfärbung von Proteingelen	68
4.3.3	Trocknen von Proteingelen	68
4.3.4	Western-Blot	68
4.3.5	Nachweis von transferierten Proteinen auf einer Nitrozellulosemembran	70
4.3.5.1	Immunreaktion	70
4.3.5.2	Das Enhanced Chemical Luminescence Detectionssystem (ECL)	70
4.3.6	Entfernen gebundener Antikörper eines Blots (Strippen)	71
4.3.7	Overlay-Blot-Assay	71
4.3.8	Herstellung und Aufreinigung von Fusionsproteinen	72
4.3.8.1	Expression eines Fusionsproteins mit His-Tag	73
4.3.8.2	Gewinnung von Fusionsproteinen aus Einschlussvesikeln (Inclusion Bodies)	73
4.3.8.3	Aufreinigung von Fusionsproteinen mit einem Histidin-Tag unter denaturierenden Bedingungen	74
4.3.8.4	Vorbereitung der Säulenmatrix	74
4.3.8.5	Aufschluss der Bakterien	75
4.3.8.6	Aufreinigung über eine Ni-NTA-Agarose-Matrix	75
4.3.8.7	Aufbereitung der Ni-NTA-Agarose	75
4.3.8.8	Renaturierung von Proteinen durch Dialyse	76
4.3.9	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	76
4.3.10	Extraktion von Proteinen aus Geweben	77
4.3.11	Fällung von Proteinen	78
4.3.11.1	Fällung von Proteinen mit Aceton	78
4.3.11.2	Fällung von Proteinen mit Methanol und Chloroform	78
4.3.11.3	Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure	78
4.3.12	Immunpräzipitation	78
4.3.12.1	Kopplung und kovalente Bindung von Antikörpern an Protein G Sepharose	78
4.3.12.2	Immunpräzipitation unter nativen Bedingungen	79
4.3.13	Pulldown Assay	80
4.3.13.1	Pulldown mit einer Säulenmatrix aus Ni-NTA-Agarose	80
4.3.13.2	Pulldown mit einer Säulenmatrix aus Protein G Sepharose	81
<b>4.4</b>	<b><i>Lipidbiochemische Methoden</i></b>	<b>82</b>
4.4.1	Herstellung von unilamellaren Liposomen	82
4.4.2	Liposomen-Perforations-Assay	82
4.4.3	Porenbildung in künstlichen Lipidfilmen	83
<b>4.5</b>	<b><i>Zellbiologische Methoden</i></b>	<b>84</b>
4.5.1	Herstellung von aktiviertem Eiextrakt (Interphase-Extrakt)	84
4.5.2	Herstellung von membranfreiem Zytosol (S200)	85

4.5.3	Herstellung von mitotischem Eiextrakt	85
4.5.4	Subzelluläre Fraktionierung von Xenopus Eiextrakt	86
4.5.5	Isolierung von Membranfraktionen aus mitotischem Eiextrakt	86
4.5.6	Flotationszentrifugation von Membranen	87
4.5.7	Extraktion von Membranen mit Epigen und NaCl	87
4.5.8	Färbung von Membranvesikeln mit Fluoreszenzfarbstoffen	88
4.5.9	Isolierung von Spermienchromatin	89
4.5.10	Auszählen von Teilchensuspensionen mit der Neubauer-Zählkammer	89
4.5.11	Aufreinigung von Vault-Komplexen	90
4.5.12	Bildung von Vault-ähnlichen Partikeln	91
4.5.13	Bildung von in vitro Kernen	91
4.5.13.1	Bildung von in vitro Kernen in Xenopus laevis Eiextrakt	91
4.5.13.2	Bildung von in vitro Kernen in Zytosol mit Membranfraktionen	92
4.5.14	Bildung von porenlosen in vitro Kernen	92
4.5.14.1	Bildung von porenlosen Kernen in vorinkubiertem Extrakt mit Annulate Lamellae	92
4.5.14.2	Bildung von porenlosen Kernen aus Zytosol und 40% Membranfraktion	92
4.5.15	Rekonstitution von Kernporen durch 30% Membranen und His-MVP	92
4.5.16	Bildung von in vitro Kernen nach Colchizin-Behandlung	92
4.5.17	Bildung von Mikrotubuli in vitro	93
4.5.18	Inhibierung von Kinesinen in Xenopus Extrakten	93
4.5.19	Arbeiten mit Xenopus laevis Embryonen	94
4.5.19.1	In vitro Fertilisation	94
4.5.19.2	Aufzucht der Embryonen	94
4.5.19.3	Mikroinjektion in Xenopus Embryonen	95
<b>4.6</b>	<b><i>Mikroskopische Methoden</i></b>	<b>95</b>
4.6.1	Fixierung von Präparaten für die Fluoreszenzmikroskopie	95
4.6.1.1	Fixierung von in vitro Kernen und Annulate Lamellae	95
4.6.1.2	Fixierung von Kulturzellen mit Formaldehyd-Triton	96
4.6.1.3	Fixierung von Kulturzellen mit Aceton-Methanol	96
4.6.2	Gewinnung von Gewebe	96
4.6.3	Anfertigung von Gefrierschnitten	97
4.6.3.1	Fixierung von Gefrierschnitten	97
4.6.4	Indirekte Immunfluoreszenz	97
4.6.5	Elektronenmikroskopie	98
4.6.5.1	Fixierung von in vitro Kernen	98
4.6.5.2	Entwässerung der Proben und Einbettung in EPON	99
4.6.5.3	Anfertigung von Ultradünnschnitten	99

4.6.5.4	Kontrastierung von Ultradünnschnitten	100
4.6.5.5	Negativkontrastierung von Liposomen	100
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>102</b>
5.1	Analyse von <i>Xenopus laevis</i> Membranfraktionen	102
5.2	Die 30% Membranfraktion ist nicht in der Lage, selbständig eine intakte Kernhülle auszubilden	103
5.3	Die 40% Membranfraktion führt zur Bildung von porenlosen Kernen	105
5.4	Die 30% Membranfraktion induziert die de novo Insertion von NPC's in geschlossenen Doppelmembranen	106
5.5	Kinetik des Einbaus der 30% Membranfraktion in eine bestehende Kernhülle	108
5.6	MVP und Vault induzieren beide den de novo Einbau von Kernporenkomplexen	109
5.7	Lösliches MVP ist für die Kernporenkomplexbildung hinreichend	112
5.8	MVP ist mit der 30% Membranfraktion assoziiert	113
5.9	MVP ist zellulär mit Membranen assoziiert	114
5.10	MVP ist für die Integration der 30% Membranfraktion in die Kernhülle nicht notwendig	115
5.11	MVP co-lokalisiert mit Porenkomplexen der Annulate Lamellae	116
5.12	His-MVP perforiert unilamellare Liposomen	118
5.13	His-MVP induziert die Umstrukturierung von Lipidmembranen	120
5.14	His-MVP bildet Poren in artifiziellen schwarzen Lipidmembranen	121
5.15	Nachweis von MVP in verschiedenen Geweben von <i>Xenopus laevis</i> durch Immunblot	122
5.16	Intrazelluläre Lokalisation von MVP in verschiedenen Geweben von <i>Xenopus laevis</i>	123
5.17	MVP ist für die Frühentwicklung von <i>Xenopus laevis</i> essentiell	124
5.18	Die Bildung eines Mikrotubulinnetzwerkes im zellfreien System von <i>Xenopus laevis</i>	127
5.19	Klonierung von EYFP- $\alpha$ -Tubulin	129
5.20	Expression und Aufreinigung von His-EYFP- $\alpha$ -Tubulin	129
5.21	Die 30% Membranfraktion ist mit Mikrotubuli assoziiert	130
5.22	Die Doppelmembranbildung der 40% Membranfraktion ist Mikrotubuli- unabhängig	131
5.23	Die MVP-vermittelte de novo Bildung von Kernporenkomplexen ist abhängig von Mikrotubuli	133
5.24	Das Motorprotein Mklp2 ist an der de novo Bildung von Kernporenkomplexen beteiligt	135
5.25	MVP interagiert mit zahlreichen zytosolischen Proteinen	139
5.26	MVP interagiert nicht mit Nukleoporinen mit FXFG-Sequenzmotiv- Wiederholungen	142

<b>6.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>145</b>
6.1	Experimentelle Trennung der Ausbildung einer Kernmembran und der Insertion von Kernporenkomplexen	146
6.2	Der membranassoziierte Faktor der 30% Membranen, der zur Insertion von Kernporenkomplexen führt, ist MVP	148
6.3	MVP und Annulate Lamellae	149
6.4	Die NPC-Bildung durch MVP ist abhängig vom Kinesin-vermittelten Transport über Mikrotubuli	150
6.5	Molekulare Mechanismen der Porenbildung durch MVP	152
6.6	Ist MVP ein ubiquitärer Faktor für die Kernporenkomplexbildung?	157
6.7	Ausblick	158
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>160</b>
<b>8.</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>179</b>
	Lebenslauf	182
	Publikationen	183
	Ehrenwörtliche Erklärung	184
	Danksagung	185

## 1. Zusammenfassung

In die Kernmembran von Eukaryoten sind Kernporenkomplexe eingelagert. Diese stellen die einzige Verbindung zwischen dem Nukleo- und Zytoplasma dar und vermitteln den gerichteten Transport von Proteinen und Ribonukleoproteinpartikeln über die Kernhülle. Kernporenkomplexe sind aus zahlreichen Subkomplexen zusammengelagerte Strukturen, über ihre Bildung ist aber bislang noch recht wenig bekannt.

Durch vorangehende Versuche unserer Arbeitsgruppe mit dem zellfreien System, basierend auf *Xenopus laevis* Eiextrakt, konnte gezeigt werden, dass es experimentell möglich ist, die Bildung einer kontinuierlichen Doppelmembran von der Insertion der Kernporenkomplexe zu trennen (Ewald et al., 1997). Dabei spielen verschiedene im Extrakt enthaltene Membranfraktionen eine Rolle.

Erst kürzlich wurden in unserer Arbeitsgruppe zwei unterschiedliche Membranfraktionen aus *Xenopus* Extrakt isoliert, die aufgrund ihrer Dichte als 40% und 30% Membranfraktion benannt wurden. Massenspektrometrische Untersuchungen zeigten, dass sich in der 30% Membranfraktion, welche für die Kernporenkomplexbildung verantwortlich zu sein scheint, das Major Vault Protein (MVP) befindet. Daher wurde zum ersten Mal überraschenderweise MVP mit der Bildung der Kernporenkomplexe in Verbindung gebracht (Dissertation Friederike Vollmar, 2009). MVP ist Hauptbestandteil der Vault-Komplexe, großer tonnenförmiger Ribonukleoproteinpartikel, denen bislang eine Vielzahl von zellulären Funktionen zugeordnet wurden, die meisten davon jedoch noch stark debattiert. Vaults könnten womöglich eine Rolle als Transporter über die Kernporenkomplexe spielen und wurden schon mehrfach mit dem Aufbau einer multiplen Arzneimittelresistenz in Verbindung gebracht. Die Beteiligung von MVP bei der Bildung der Kernporenkomplexe ist eine neue zelluläre Funktion und sollte deshalb in dieser Arbeit näher untersucht werden.

In dieser Arbeit wurden zunächst die 40% und 30% Membranfraktionen auf ihr unterschiedliches Verhalten bei der Bildung der Kernhülle separat und in Kombination genauer untersucht. Dabei zeigte sich, dass die 40% Membranfraktion an Chromatin bindet und eine kontinuierliche Doppelmembran aufbaut. Die 30% Membranfraktion konnte alleine nicht an Chromatin binden, induzierte aber in der durch die 40% Membranfraktion gebildeten Doppelmembran den Aufbau von Kernporenkomplexen. Durch Immunfluoreszenzaufnahmen und ultrastrukturelle Untersuchungen wurde belegt, dass das an der 30% Membranfraktion assoziierte MVP für die Bildung von Kernporenkomplexen verantwortlich war. Ferner konnten wir zeigen, dass sowohl MVP als auch Vault-Partikel die de novo Insertion von Kernporenkomplexen in kontinuierliche Doppelmembranen induzieren konnten.

Die molekularen Mechanismen der Kernporenkomplexbildung durch MVP wurden mit Hilfe von artifiziellen Lipidmembranen analysiert. Anhand von unilamellaren Liposomen und elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass MVP die Lipidstruktur beeinflussen und perforieren kann. Zudem löste MVP die Bildung von Poren in schwarzen Lipidmembranen aus und führte zur Messung von Strömen durch Einzelkanalmessungen über die entstandenen Poren.

Um die bei dem Prozess der Kernporenkomplexbildung beteiligten Bindungspartner von MVP zu identifizieren, wurden mehrere Protein-Protein-Bindungsstudien durchgeführt. Durch einen Overlay-Blot-Assay, Immunpräzipitationen und Pulldown-Versuche konnten zahlreiche zelluläre MVP-Bindungspartner detektiert werden. Unter den ermittelten MVP-Bindungspartnern ließen sich keine Nukleoporine mit dem Sequenzmotiv FXFG identifizieren, es ist jedoch nicht auszuschließen, dass MVP bei der Bildung der Kernporenkomplexe mit anderen Nukleoporinen interagiert.

Da eine frühere Arbeit die Bedeutung von Mikrotubuli bei der Bildung der Kernporenkomplexe aufzeigte (Ewald et al., 2001), wurden in dieser Arbeit die Interaktionen der isolierten 40% und 30% Membranfraktionen und von MVP mit dem Mikrotubulinetzwerk näher analysiert. Dabei zeigte sich, dass nur die 30% Membranfraktion mit Mikrotubuli interagierte und eine Inhibition der Mikrotubulipolymerisation durch Colchizin den Einbau von Kernporenkomplexen verhinderte. Im Gegensatz dazu interagierten die 40% Membranvesikel nicht mit Mikrotubuli und daher hat eine Colchizin-induzierte Inhibition der Mikrotubulipolymerisation keinen Effekt auf den Aufbau einer kontinuierlichen Doppelmembran. Durch immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen konnte im nächsten Schritt gezeigt werden, dass die Lokalisation von MVP an der Kernhülle ebenfalls Abhängig von Mikrotubuli ist.

Um zu demonstrieren, dass die MVP-induzierte Kernporenkomplexbildung im zellfreien System abhängig vom Transport von MVP zur Kernhülle ist, wurde die Zugabe von MVP zu porenlosen Kernen nach einer Colchizin-Behandlung analysiert. Hierbei konnte belegt werden, dass MVP Mikrotubuli auch benötigt, um die Bildung von Kernporenkomplexen in der Kernmembran zu initiieren. Da Mikrotubulifilamente im zellfreien System mit ihren Plus-Enden gegen die Chromatinoberfläche gerichtet sind, sollten für den gerichteten Transport zum Chromatin Motorproteine der Kinesin-Familie eine Rolle spielen. Durch die Inhibition von Mklp2, einem mitotischen Kinesin, konnte der Aufbau der Kernporenkomplexe durch MVP in porenlosen Kernen blockiert werden. Somit erfolgt die MVP-vermittelte de novo Bildung von Kernporenkomplexen nach dem gerichteten Transport von MVP über Mikrotubuli und das Motorprotein Mklp2.

Um die zelluläre Verteilung von MVP im Modellsystem *Xenopus laevis* näher zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit Immunblot-Analysen und Immunfluoreszenzaufnahmen verschiedener

Gewebe angefertigt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass MVP ubiquitär in allen überprüften Zelltypen exprimiert wird und innerhalb der Zelle hauptsächlich zytoplasmatisch verteilt ist, ein Teil von MVP aber auch im Bereich der Kernhülle lokalisiert.

Transgene Mäuse, in denen das Gen für MVP ausgeschaltet wurde, zeigen im Vergleich mit wildtypischen Mäusen keine Beeinträchtigung der Vitalität. Um die Notwendigkeit von MVP bei anderen Vertebraten, speziell bei der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis*, näher zu untersuchen, wurden *Xenopus* Zwei-Zell-Stadien mit MVP-Morpholinos injiziert. Die Mikroinjektion von MVP-Morpholinos führte zu massiven Frühentwicklungsstörungen und war in der Folge für die Embryonen letal. Durch die parallele Injektion eines rekombinanten MVP-Fusionsproteins konnte dieser Effekt umgangen werden und zeigte somit, dass MVP in der Frühentwicklung von *Xenopus laevis* eine essentielle Funktion hat.

## 1. Summary

In eukaryotes, the nuclear envelope is normally interspersed with numerous nuclear pore complexes, which act as the only gateway between the nucleo- and cytoplasm. Nuclear pore complexes mediate the directed transport of proteins and ribonucleoprotein particles through the nuclear envelope. Little is known about the assembly of these structures out of various subcomplexes. Interestingly, our group recently linked the Major Vault Protein (MVP) with the assembly of nuclear pore complexes. MVP is the main part of Vault-complexes, huge barrel-shaped ribonucleoprotein particles with many cellular functions attached, many of them still in debate. Vaults possibly play a role as nuclear transporters and several works exist that connect them with the origin of multiple drug resistance. The involvement in the assembly of nuclear pore complexes depicts a novel cellular function of MVP and should therefore be analyzed in this project.

Preceding work with the cell-free system based on *Xenopus laevis* egg extract showed that the building of a continuous double membrane could be separated from the insertion of nuclear pore complexes and could be assigned to different membrane fractions of the egg extract. (Ewald et al., 1997). Two different membrane fractions were isolated out of *Xenopus* egg extract and named 40% and 30% membrane fraction according to their density. Mass spectrometric analysis showed that the pore-inducing 30% membrane fraction contained MVP (Dissertation Friederike Vollmar).

The first step in this project was the particularly examination of the different behaviour of the 40% and 30% membrane fraction during the formation of the nuclear envelope. Thereby, it could be demonstrated that the 40% membrane fraction binds to chromatin where it builds up a continuous double membrane. The 30% membrane fraction was not able to independently bind to chromatin, but induced the formation of nuclear pore complexes when added to the pore-free nuclei. Immunofluorescent and ultrastructural studies proved that the MVP-associated 30% membrane fraction is responsible in this process. A flotation centrifugation indicated that MVP is indeed associated with the 30% membrane fraction. MVP, as well as Vault-particles have the ability to induce the de novo insertion of nuclear pore complexes in continuous double membranes.

Artificial lipid membranes were used to study the molecular mechanisms involving MVP during the process of nuclear pore complex assembly. By using unilamellar liposomes and electron microscopy it could be demonstrated that MVP affects and perforates the lipid structure. Furthermore, MVP induced the formation of pores in black lipid membranes and lead to the detection currents by single channel measurement. To identify MVP-binding partners that are involved in the process of nuclear pore complex formation, several protein-protein-interaction

studies were performed. Numerous cytosolic MVP-binding partners could be detected with overlay-blot-assays and by immunoprecipitation and pull-down assays. The studies showed that no nucleoporins with the sequence motive FXFG could be detected among the MVP-binding partners, but it cannot be ruled out that MVP interacts with other nucleoporins during the formation of nuclear pore complexes.

As a previous study showed the importance of microtubules during the assembly of nuclear pore complexes (Ewald et al., 2001), this work analyzed the interactions of the isolated 40% and 30% membrane fraction and of MVP concerning the microtubule network. Thereby, it could be shown that only the 30% membrane fraction was able to interact with microtubules and the colchicines-induced inhibition of microtubule polymerisation prevented the insertion of nuclear pore complexes. In contrast, the 40% membrane vesicles did not interact with microtubules and the colchicine-induced inhibition of microtubule assembly had no effect on the constitution of a continuous double membrane. In the next step, immunofluorescence studies demonstrated that the nuclear localisation of MVP is also dependent on microtubules. To demonstrate that the MVP-induced formation of nuclear pore complexes also depends on the microtubule-driven transport of MVP towards the nuclear membrane, the addition of MVP to pore-free nuclei was monitored after colchicine treatment. Hereby, it could be shown that MVP also needed microtubules to initiate the assembly of nuclear pore complexes. As the plus-ends of microtubules are directed towards the chromatin surface in the cell-free system, the directed transport in the direction of chromatin should be mediated by motor proteins of the Kinesin family. The inhibition of Mklp2, a mitotic Kinesin, prevented the assembly of nuclear pore complexes in *Xenopus* egg extract. The MVP-mediated de novo assembly of nuclear pore complex therefore is accomplished by the microtubule-transport of MVP via Mklp2.

To further investigate the cellular localization of MVP in the model system *Xenopus laevis*, immunoblot-analysis and immunofluorescent staining of diverse tissues were performed. Thereby, it could be proven that MVP is expressed ubiquitously in all tested cell types and that it localised predominantly in the cytoplasm. Nonetheless, a part of MVP could be detected in range of the nuclear envelope.

As the MVP knock-out mouse seems to have no impairment in vitality, the importance of MVP for the development of other vertebrates, especially *Xenopus laevis* was studied in particular. The microinjection of MVP-morpholinos led to severe aberrations in early development and caused the death of the treated embryos. The parallel injection of the MVP fusion-protein counteracted this effect and therefore showed that MVP possesses an essential function during the early stages of *Xenopus* embryonic development.

## 2. Einleitung

### 2.1 Die Kernhülle im Verlauf des Zellzyklus

Im Gegensatz zu Prokaryoten entwickelte sich bei Eukaryoten im Laufe der Evolution eine Kompartimentierung der Zelle. Das genetische Material ist im Zellkern vom Rest der Zelle durch die Kernhülle getrennt, wodurch Expression und Translation innerhalb der Zelle räumlich voneinander separiert sind. Die Kernhülle umgibt das Nukleoplasma und gliedert sich in die äußere und innere Kernmembran sowie die Kernporen und Kernlamina. Die äußere Kernmembran (outer nuclear membrane, ONM) ist mit dem rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) verbunden und ähnelt auch dessen Proteinzusammensetzung (Wilhelmsen et al., 2006). In der ONM sind die Nesprine verankert, über die eine Verbindung des Zellkerns mit dem Zytoskelett der Zelle möglich ist (Warren et al., 2005; Razafsky und Hodzic, 2009). Die Verbindung des Zellkerns mit dem Zytoskelett ist über Proteine innerhalb des perinukleären Spaltes, welcher sich zwischen ONM und INM befindet, in das Innere des Zellkerns übertragen. Hierzu zählen die Proteine der Sun-Domäne (Ostlund et al., 2009). Die innere Kernmembran (inner nuclear membrane, INM) besitzt dagegen ein spezifisches Spektrum an integralen Membranproteinen, die den Kontakt der Kernhülle mit der Kernlamina und dem Chromatin vermitteln und für zahlreiche zelluläre Prozesse essentiell sind, wie Organisation des Chromatins, Auf- und Abbau der Kernhülle während der Mitose und Regulation der Genexpression (Foisner 2001; Hetzer und Wente, 2009). Die Kernlamina, ein 10- 20nm dickes fibrilläres Netzwerk aus Proteinen, befindet sich direkt unterhalb der inneren Kernmembran. Die Lamina besteht hauptsächlich aus Intermediärfilamenten vom Typ V, den Laminen, von denen es zwei Hauptgruppen gibt: Typ A und Typ B (Dechat et al., 2008). In Säugetieren gibt es zwei A Typ Lamine, Lamin A und Lamin C, welche durch das alternative Splicen des LMNA-Genes hervorgehen. Von den B Typ Laminen existieren ebenfalls zwei wichtige Vertreter, Lamin B1 und Lamin B2, welche jeweils von einem einzelnen Gen kodiert werden. Über eine farnesylierte C-terminale Domäne sind Lamin A, Lamin B1 und B2 dazu befähigt, an die innere Kernmembran zu assoziieren. Lamin C beinhaltet diese Domäne nicht. Bei Lamin A wird diese Domäne im Normalfall durch proteolytische Spaltung ebenfalls entfernt. Die zellulären Funktionen der Kernlamina sind sehr weit reichend und schließen neben der Stabilisierung der Zellkernform die Organisation der Chromosomen, die Replikation der DNA, die Zellteilung, Differenzierungs- und Entwicklungsprozesse und die Apoptose mit ein. Zudem spielt die Lamina bei bestimmten Krankheiten, den Laminopathien, eine entscheidende Rolle, wie der Emery-Dreifuss-Muskeldystrophy oder der Hutchinson-Gilford-Progerie. Eine Vielzahl von unterschiedlichen Proteinen sind mit der Kernlamina und der inneren Kernmembran assoziiert und erreichen so die große Bandbreite an zellulären

Funktionen, welche die Kernhülle und ihre assoziierten Strukturen erfüllt (Gruenbaum et al., 2005; Roux und Burke, 2006).

## 2.2 Der Kernporenkomplex

In eukaryotischen Zellen findet während der Interphase innerhalb des Zellkerns die Transkription statt. Die Synthese von Proteinen erfolgt dagegen im Zytoplasma und ist somit räumlich von der Transkription getrennt. NPC's stellen die einzige Verbindung zwischen dem Zytoplasma und dem Zellkern dar. Diese sind in der Kernhülle an den Stellen der Fusion von innerer und äußerer Kernmembran lokalisiert, den Kernporen. Über die NPC's erfolgen die passive Diffusion von Ionen und kleinen Molekülen sowie der aktive Transport von Polypeptiden und Ribonukleoproteinpartikeln mit Hilfe von Lokalisationssignalen zwischen Kern und Zytoplasma. Mit einer Molekularmasse von etwa 120 MDa ist der NPC die größte molekulare Maschinerie der Zelle (Beck und Medalia, 2008; Lim et al., 2008), welche aus etwa 30 verschiedenen Proteinen, den Nukleoporinen, aufgebaut ist. Die Nukleoporine sind dabei zu Subkomplexen zusammengelagert (Rout et al., 2000; Cronshaw et al., 2002; Schwartz, 2005; Lim und Fahrenkrog, 2006; Tran und Wenthe, 2006).

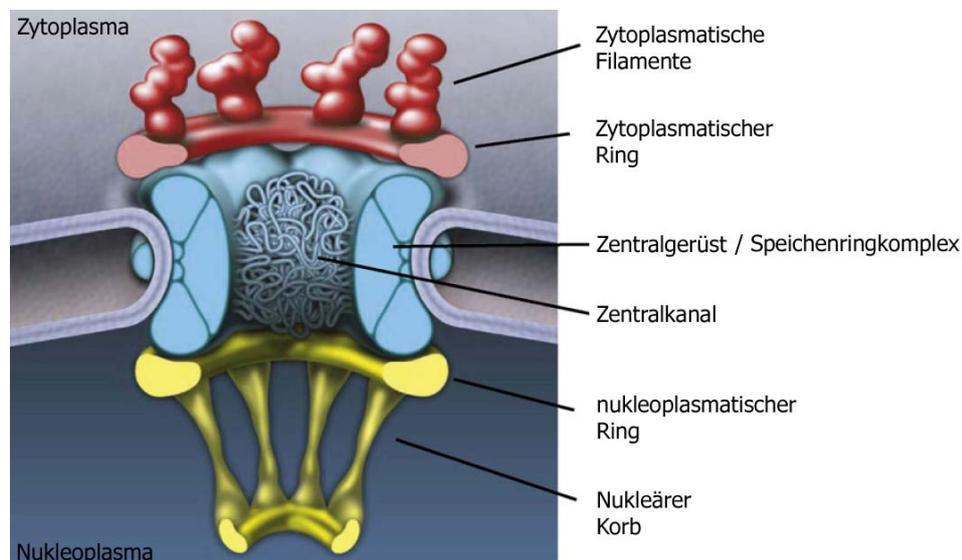
Die Anzahl an NPC's innerhalb einer Zelle variiert aufgrund unterschiedlicher Zellgrößen- und aktivität. Hefen besitzen beispielsweise etwa 200 NPC's pro Zellkern, menschliche Zellen im Stadium der Proliferation zwischen 3000 und 5000 und *Xenopus* Oozyten enthalten etwa  $5 \times 10^7$  NPC's (Gorlich und Kutay, 1999; Lim et al., 2008). Die NPC's sind in der Kernhülle nicht homogen verteilt (Winey et al., 1997). Bei verschiedenen Krankheiten, beispielsweise in Krebszellen, bilden sich in der Kernhülle Anhäufungen von NPC's, die auf bestimmte Areale beschränkt sind und es existieren auch komplett porenfreie Bereiche. Dies konnte während der Telophase und der G1-Phase von Hela S3-Zellen gezeigt werden (Maeshima et al., 2006).

## 2.3 Komposition und Struktur eines Kernporenkomplexes

Der Kernporenkomplex ist in drei verschiedene Bereiche aufgeteilt. Eingelagert in die Kernpore ist das Zentralgerüst, an welches periphere strukturelle Bereiche angefügt sind. Hierzu zählen die zytoplasmatischen Fibrillen und die nukleoplasmatischen Fibrillen. Die nukleären Filamente bilden den so genannten nukleären Korb. Insgesamt unterliegt der NPC einer achtfachen Symmetrie (siehe Abb. 2.1). Das Zentralgerüst besteht aus einem Speicherring, ragt von der inneren bis zur äußeren Kernhülle und ist somit je nach Spezies etwa 30 bis 50 nm hoch (Akey und Radermacher, 1993; Alber et al., 2007; Elad et al., 2009). Das Zentralgerüst bildet den eigentlichen Translokationskanal, durch welchen der nukleo-zytoplasmatische Transport stattfindet (Fahrenkrog und Aebi, 2003; Frey et al., 2006). Die zentrale Pore ist etwa 50 nm lang und 40 nm breit (Stoffler et al., 2003; Beck et al., 2004, 2007). Ober- und unterhalb dieses

Speichenring-Komplexes befinden sich jeweils ein zyto- und ein nukleoplasmatischer Ring, welche mit dem Speichenring verbunden sind (Brohawn et al., 2009). Ausgehend vom zytoplasmatischen Ring erstrecken sich die acht zytoplasmatischen Filamente. Diese Filamente sind etwa 35 nm lang (Lim et al., 2008) und sind an kleinen Erhebungen des zytoplasmatischen Rings angebracht (Kiseleva et al., 2000). Am nukleoplasmatischen Ring befinden sich ebenfalls acht Filamente, welche etwa 60 nm lang sind und durch einen distalen Ring miteinander verbunden sind. Zusammen mit dem Zentralgerüst ergibt sich für den NPC somit eine Gesamtlänge von etwa 150 nm (Beck et al., 2007).

Zwischen dem Speichenringkomplex und den ober- und unterseitig liegenden Ringen wurden periphere Kanäle beschrieben (Hinshaw et al., 1992; Stoffler et al., 2003). Die Funktion dieser Kanäle ist bislang noch nicht genau identifiziert worden, jedoch gibt es Hinweise darauf, dass sie dem Transport von kleinen Proteinen und Ionen dienen (Kramer et al., 2007), oder dass Membranproteine der inneren Kernmembran über diese Kanäle nach der Translation vom endoplasmatischen Retikulum zu ihrem Bestimmungsort in der Kernhülle gelangen (Powell und Burke, 1990; Zuleger et al., 2008). Daneben spielen die peripheren Kanäle im Zusammenhang mit dem Erhalt der elektrischen Leitfähigkeit der Kernmembran eine Rolle (Danker et al., 1999; Mazzanti et al., 2001; Shahin et al., 2001; Enss et al., 2003) und könnten während der Translokation großer Proteinkomplexe als eine Art Puffer für mögliche Deformationen des Zentralgerüsts dienen (Fahrenkrog und Aebi, 2003).



**Abb. 2.1:** Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus eines Kernporenkomplexes im Querschnitt. Die Gliederung des NPC's in drei Bereiche ist farblich dargestellt. Rot und gelb markiert sind die beiden nach außen ragenden Bereiche des NPC's, die zytoplasmatischen Filamente und der nukleäre Korb. Blau markiert ist das Zentralgerüst mitsamt Translokationskanal. Abbildung nach D'Angelo und Hetzer, 2008.

Die strukturelle Organisation des NPC ist von der Hefe bis zum Menschen hoch konserviert, es finden sich jedoch auch Unterschiede in der Form und Größe (Elad et al., 2009). Nur bei Hefen ist der Speichenringkomplex spiegelsymmetrisch aufgebaut (Yang et al., 1998). Bei *Dictyostelium discoideum* und *Xenopus laevis* ist der nukleäre Ring fest mit dem Speichenring verbunden, beim Menschen ist diese Verbindung dagegen über tubuläre Ausläufer des Speichenrings bewerkstelligt, welche den nukleären Ring in einem Abstand von 15 nm zum Speichenring halten (Beck et al., 2007; Stoffler et al., 2003; Elad et al., 2009). Die strukturellen Unterschiede zwischen den Spezies beruhen auf Abweichungen innerhalb der Gensequenz der Nukleoporine, auf Unterschieden der Zellgröße und -aktivität sowie der Anzahl der NPC's pro Zelle (Gerace und Burke, 1988; Winey et al., 1997; Gorlich und Kutay, 1999).

#### **2.4 Molekularer Aufbau von Kernporenkomplexen**

Jeder NPC ist aus nur ~30 unterschiedlichen Proteinen, den Nukleoporinen, aufgebaut. Die Nukleoporine sind innerhalb des NPC zu Subkomplexen zusammen gelagert, welche die symmetrischen Elemente eines NPC's aufbauen (Devos et al., 2006). In Hefen wurde die Gesamtanzahl an Nukleoporinen dabei auf 456 Proteinmoleküle pro NPC errechnet (Alber et al., 2007 a). Die Nukleoporine lassen sich aufgrund ihrer Lage innerhalb des NPC und ihrer Domänenstruktur in verschiedene Gruppen gliedern. Etwa 10 Nukleoporine besitzen N- oder C-terminal eine Region mit Wiederholungen der Aminosäuren Phenylalanin und Glycin (FG-Domäne), etwa 15 Nukleoporine haben eine strukturelle Funktion innerhalb des NPC und bilden das Zentralgerüst durch  $\alpha$ -helikale Domänen und  $\beta$ -Faltblattstrukturen und 3 Nukleoporine haben eine Transmembrandomäne und verankern den NPC in der Kernhülle.

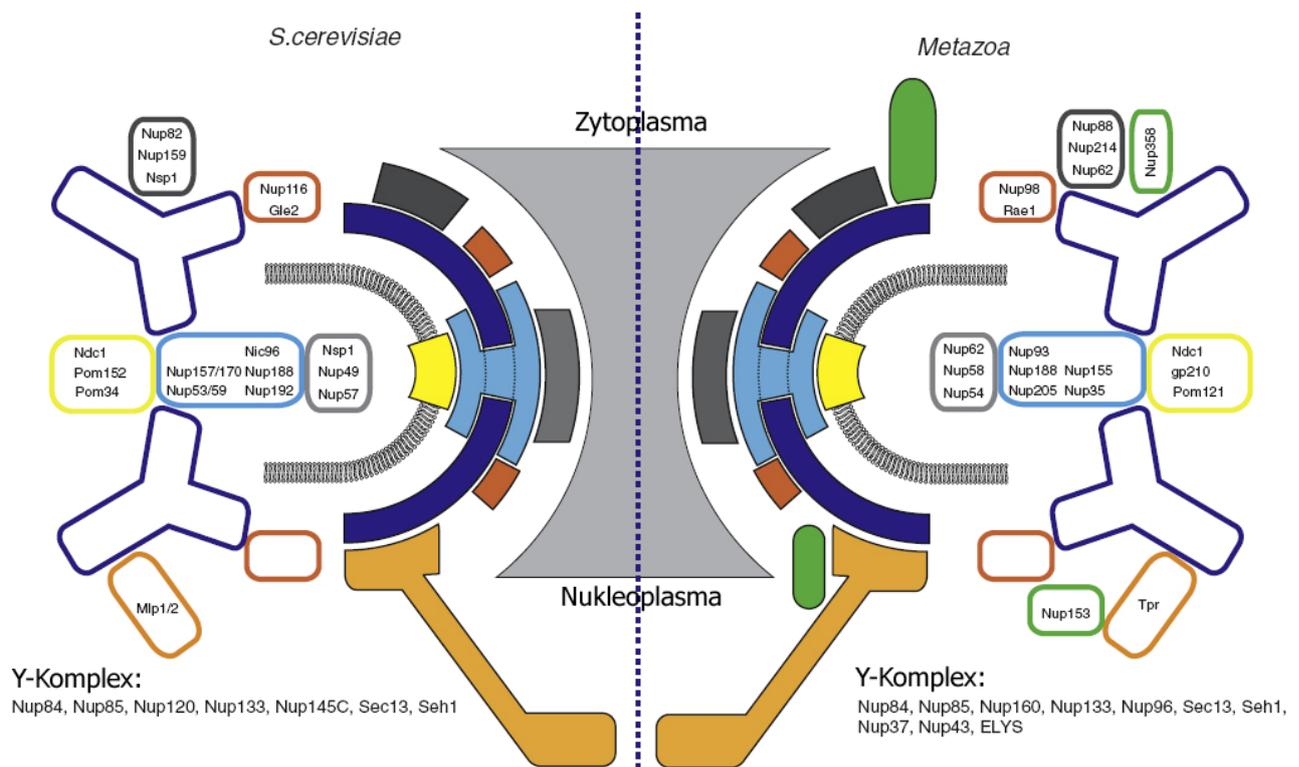
Die Nukleoporine mit FG-Domänen machen etwa 13% der Gesamtmasse eines NPC aus (Brohawn et al., 2009). Es existieren drei FG-Domänen-Typen, die sich in der Abfolge der Aminosäuren unterscheiden. Die Anzahl der Domänen variiert zwischen den Nukleoporinen von 4 bis 48 Aminosäure-Wiederholungen (D'Angelo und Hetzer, 2008). Neben den Wiederholungen von Phenylalanin und Glycin gibt es Wiederholungen von Glycin-Leucin-Phenylalanin-Glycin (GLFG), Wiederholungen von Phenylalanin-x-Phenylalanin-Glycin (FXFG; Suntharalingam und Wente, 2003; Stewart, 2007), Prolin-X-Phenylalanin-Glycin (PXFG) und Serin-X-Phenylalanin-Glycin (SXFG; D'Angelo und Hetzer, 2008), wobei X für eine beliebige Aminosäure steht. Die FG-Domänen haben entweder kohäsive oder nicht-kohäsive Eigenschaften (Frey et al., 2006; Frey und Gorlich, 2007; Patel et al., 2007). Die Kohäsion zwischen den FG-Domänen wird durch die Sequenzen zwischen den einzelnen FG-Wiederholungen bestimmt (Krishnan et al., 2008) und spielt für den Aufbau der selektiven Barriere sowie für die Transportprozesse eine wichtige Rolle. Die FG-Domänen-tragenden Nukleoporine finden sich hauptsächlich im Zentralkanal der

Kernpore, wo sie die selektive Barriere für unspezifische Makromoleküle bilden (Rout et al., 2000).

Die nächste Gruppe von Nukleoporinen bewerkstelligt hauptsächlich strukturelle Funktionen innerhalb eines NPC. Mehr als die Hälfte der Nukleoporine, die am Aufbau des Zentralgerüsts beteiligt sind, beinhalten  $\alpha$ -helikale Domänen (Jeudy und Schwartz, 2007; Boehmer et al., 2008; Schrader et al., 2008; Leska et al., 2009; Whittle und Schwartz, 2009).

Eine Vielzahl dieser Nukleoporine beinhalten Coiled-Coil-Domänen, bestehend aus  $\alpha$ -Helices. Beispiele hierfür sind die langen Coiled-Coil-Domänen von Mlp-1/2 in Hefe, bzw. Tpr in Vertebraten, welche Hauptbestandteil der nukleären Filamente und somit des nukleären Korbes sind (Brohawn et al., 2009). Neben der Coiled-Coil-Domäne finden sich  $\alpha$ -Solenoid-Domänen (Devos et al., 2006). Diese Domänen bestehen aus einer Einheit von 2 bis 3  $\alpha$ -Helices, die wiederholt angeordnet sind und superhelikale Bereiche ausbilden (Kobe und Kajava, 2000). Eine weitere identifizierte  $\alpha$ -helikale Domäne ist die ACE1-Domäne (Ancestral Coatomer Element 1), welche in den Nukleoporinen Nic96/Nup93, Nup145C/Nup96, Nup85 und Nup84/Nup107 identifiziert wurde (Brohawn et al., 2009). Diese Domäne besteht aus einem 65 kDa großen Bereich, welcher aus insgesamt 28  $\alpha$ -Helices aufgebaut ist. Die ACE1-Domäne wurde außerhalb von NPC's bislang nur in dem Protein Sec31 identifiziert, welches das Hauptstrukturprotein von COPII-Vesikel-Hüllen ist und deshalb auf einen gemeinsamen evolutiven Ursprung schließen lässt (Devos et al., 2004, 2006; Brohawn et al., 2008; Boehmer et al., 2008).

Eine zweite wichtige Strukturdomäne von Nukleoporinen mit architektonischer Funktion sind  $\beta$ -Faltblätter bzw.  $\beta$ -Propeller. Diese Domänen dienen nicht nur strukturellen Aufgaben, sondern sind auch Stellen der Interaktion zwischen einzelnen Proteinen. Zusammen mit  $\alpha$ -helikalen Domänen bilden sie die Grundlage für das Grundgerüst des NPC. Neben  $\alpha$ - und  $\beta$ -Strukturen wurden in einigen Nukleoporinen zudem Zink-Finger-Motive identifiziert, wie beispielsweise in Nup153 und Nup358 (Higa et al., 2007). Zudem wurden Motive für die Interaktion mit RNA in Nup35 nachgewiesen (Handa et al., 2006).



**Abb. 2.2:** Schematische Darstellung der Subkomplexe eines NPC und deren Anordnung. Auf der linken Bildhälfte sind die Subkomplexe und die jeweiligen Nukleoporine der Hefe *S. cerevisiae* gezeigt, auf der rechten Hälfte die von Metazoa. Ein wichtiger struktureller Bestandteil beider NPC's ist der Y-Komplex, welcher Hauptbestandteil des Zentralgerüsts (blaue Farben) ist. Die Transmembranbestandteile der NPC's sind gelb markiert, das Netzwerk aus FG-Domänen-tragenden Nukleoporinen in grau. Einige periphere Nukleoporine sind aufgrund der vereinfachten Darstellung nicht im Bild enthalten. Abbildung nach Brohawn et al., 2009.

Innerhalb des NPC sind die Nukleoporine in Subkomplexen zusammengelagert (siehe Abb. 2.2). Diese Subkomplexe stellen stabile Interaktionsgruppen zwischen Nukleoporinen dar, die aus mitotischen Extrakten isoliert werden können (Matsuoka et al., 1999). Das Zentralgerüst rund um den Speichenringkomplex besteht aus acht Speichen, die um die zentrale Achse angeordnet sind. Jede der acht Speichen wird aus wiederum fünf Subkomplexen aufgebaut (Brohawn et al., 2009). Das Zentralgerüst selbst setzt sich aus zwei Subkomplexen zusammen, dem Nup84- oder Y-Komplex und dem Nic96-Komplex. Der Y-Komplex besteht aus sieben konservierten Komponenten, Nup84, Nup85, Nup120, Nup133, Nup145C, Sec13 und Seh1, welche die charakteristische Y-Form aufbauen (Siniosoglou et al., 2000; Lutzmann et al., 2002; Kampmann und Blobel, 2009). Daneben beinhaltet der Y-Komplex möglicherweise noch drei weitere Komponenten, Nup37, Nup43 und ELYS/MEL-28, deren Rolle innerhalb des Komplexes aber noch unklar ist (Cronshaw et al., 2002; Franz et al., 2007; Rasala et al., 2006). Der Y-Komplex lokalisiert innerhalb des NPC zwischen der zyto- und nukleoplasmatischen Hälfte und wird vom Nic96-Komplex beidseitig abgedeckt (Brohawn et al., 2009). Der Nic96-Komplex ist wiederum über das Transmembranprotein Ndc1 mit einem Komplex aus Nup157/Nup170,

Nup33/Nup59 und Ndc1 verbunden und somit in der Kernhülle verankert (Makio et al., 2009; Onischenko et al., 2009).

Analysen mit GFP-markierten Nukleoporinen offenbarten eine große Bandbreite an Dynamik innerhalb des NPC (Rabut et al., 2004). Während die strukturell wichtigen Nukleoporine, wie Mitglieder des Y- oder des Nic96-Komplexes, sehr stabil im NPC assoziiert vorliegen und nach ihrem Einbau immobil sind, sind andere Nukleoporine, wie solche die FG-Domänen tragen, hoch dynamisch und verbleiben oft nur Sekunden in ihrer Position innerhalb des NPC. Proteine des Zentralgerüsts werden nach ihrem Einbau nicht mehr ausgetauscht und können auch nach dem Durchlaufen eines Zellzyklus noch in ihrem Subkomplex verbleiben (Daigle et al., 2001; D'Angelo et al., 2009). Das Zentralgerüst bildet somit eine Art Plattform für mobile Nukleoporine, die neben dem nukleo-zytoplasmatischen Transport auch noch weitere Funktionen beinhalten können (Kalverda und Farnerod, 2007).

## **2.5 Die Auflösung der Kernhülle**

Während der offenen Mitose bei höheren Eukaryoten wird die Kernhülle aufgelöst. Nur so kann der zytoplasmatische Spindelapparat die Kinetochore erreichen und die Chromatiden schließlich voneinander trennen. Nach der Segregation der Chromatiden wird die Kernhülle erneut um das Chromatin aufgebaut und die ursprüngliche Trennung von Zyto- und Nukleoplasma wieder hergestellt. Der Abbau der Kernhülle beginnt mit der Auflösung der Lamina. Bereits während der frühen Prophase werden die A-Typ-Lamine aus der Lamina freigesetzt (Georgatos et al., 1997). In Säugetierzellen wird der Abbau der Kernhülle durch Zugkräfte verstärkt, die von Mikrotubuli ausgeübt werden, die regelrecht an der Kernhülle ziehen (Salina et al., 2002; Beaudouin et al., 2002). Diese Mikrotubuli sind an der Kernhülle assoziiert und durch die ausgeübten Zugkräfte bilden sich zunächst Einschnürungen rund um die Centrosomen. Daraufhin bilden sich Löcher in der distalen Seite des Zellkerns und die Kernhülle reißt ein. Dieser Prozess wird durch Importin  $\beta$  und RanGTP in einem bislang unbekanntem Mechanismus reguliert (Muhlhauser und Kutay, 2007). Mikrotubuli spielen auch bei weiteren Vorgängen während der Mitose eine entscheidende Rolle. Zu Beginn der Mitose bilden sich an den Centrosomen Mikrotubuli-Astern, welche an der Kernhülle in entgegengesetzte Richtung wandern (Rosenblatt, 2005). Sowohl bei der Migration der Centrosomen als auch während der durch Mikrotubuli ausgeübten Zugkräfte an der Kernhülle wird das Motorprotein Dynein benötigt, welches den zytoplasmatischen Transport gegen die Minus-Enden von Mikrotubuli bewerkstelligt (Robinson et al., 1999; Gönczy et al., 1999; Salina et al., 2002). Die Interaktion von Dynein wird über die Dynein-bindenden Proteine LIS1 und NDEL1 gesteuert (Hebbar et al., 2008).

Ein früher Schritt beim Abbau der Kernhülle ist die Freisetzung von Subkomplexen aus den Kernporenkomplexen während der späten Prophase (Dultz et al., 2008; siehe 2.6). Der Abbau der NPC's ermöglicht das ungehinderte Eindringen mitotischer Faktoren in das Zellkerninnere. Im Gegensatz zu den A-Typ-Laminen beginnen die B-Typ-Lamine sich zu lösen, wenn die Kernporenkomplexe bereits abgebaut wurden und somit die nukleäre Barriere aufgehoben ist (Beaudouin et al., 2002; Lee et al., 2000). Während die A-Typ-Lamine im Zytoplasma gelöst bleiben, verbleiben die B-Typ-Lamine mit der Membran assoziiert. Gleichzeitig werden die Proteine der inneren Kernmembran von der Lamina und Chromatin gelöst und die Transmembranproteine der Kernhülle gehen in das ER über (Beaudouin et al., 2002; Ellenberg et al., 1997; Yang et al., 1997; Puhka et al., 2007).

Die Auflösung der Kernhülle wird durch mitotische Kinasen ausgelöst, welche Proteine der Kernhülle phosphorylieren und somit die Interaktionen untereinander aufheben (Güttinger et al., 2009). Die am besten charakterisierte mitotische Kinase ist CDK1 (cyclin-dependent kinase1), welche zusammen mit Cyclin B den mitotischen Komplex MPF bildet (M-Phase promoting factor). Daneben sind in verschiedenen Spezies weitere Kinasen aktiv, wie die Proteinkinase C, Aurora A, oder PLK1 (polo-like kinase1, Güttinger et al., 2009).

Nach der Auflösung der Lamina und der Phosphorylierung der Proteine der inneren Kernmembran und des Chromatins kann die Kernmembran vom ER absorbiert werden (Ellenberg et al., 1997; Yang et al., 1997). Während der Mitose wird auch das ER reorganisiert und ein tubuläres Netzwerk gebildet (Puhka et al., 2007). Bei der Umformung des ER von Membranblättern zu -tuben wird die GTPase RAB-5, sowie die Retikulons RET-1 und YOP-1 benötigt (Shibata et al., 2006; Voeltz et al., 2006; Audhya et al., 2007; Hu et al., 2008). In *Xenopus* Extrakt wurde zudem die Notwendigkeit des COP1-Komplexes bei der Auflösung der Kernhülle nachgewiesen (Liu et al., 2003; Cotter et al., 2007).

## **2.6 Abbau von Kernporenkomplexen**

Der Abbau von NPC's erfolgt ausschließlich während der Mitose, bislang wurde noch kein derartiger Vorgang während der Interphase nachgewiesen (vgl. 2.5). Ebenso wie der Aufbau von NPC's erfolgt der Abbau nach einem geordneten Prozess. Der schrittweise Abbau von NPC's in nachweisbare Zwischenstufen wurde in *Drosophila* Embryonen (Kiseleva et al., 2001) und in in vitro Untersuchungen (Cotter et al., 2007) dokumentiert. In Seeigel Oozyten konnte der gesamte Prozess verfolgt werden (D'Angelo und Hetzer, 2008). Ein erster Schritt ist hierbei die Freisetzung von Nukleoporinen des nukleären Korbes, Nup98 und Nup153, gefolgt von der Lösung von Nup214 aus dem zytoplasmatischen Ring. Hierdurch wird die Permeabilität der NPC's schrittweise erhöht und zytoplasmatische Faktoren können in den Zellkern ungehindert eindringen. In Säugetieren erfolgt der Abbau von NPC's synchron und ist wesentlich schneller

als deren Zusammenbau (Dultz et al., 2008). Der Abbau erfolgt darüber hinaus nicht in der umgekehrten Reihenfolge wie der Aufbau der NPC's. Beispielsweise wird der Nup107-160-Komplex erst spät aus dem NPC freigesetzt, während dieser Komplex bei der Assemblierung der NPC's sehr früh beteiligt ist. In Hefen erfolgt während der Mitose keine Auflösung der Kernmembran, man spricht von einer geschlossenen Mitose. Die NPC's werden hierbei während der gesamten Mitose nicht abgebaut.

Der Abbau von NPC's in der offenen Mitose erfolgt nach mitotischer Phosphorylierung von Nukleoporinen. Die spezifische Hyperphosphorylierung von Nukleoporinen wurde *in vitro* und *in vivo* mehrfach nachgewiesen (Macaulay et al., 1995; Favreau et al., 1996; Bodoor et al., 1999; Nousiainen et al., 2006; Glavy et al., 2007). Beteiligt ist hierbei die Serin/Threonin-Kinase CDC2 (Cdk1), welche als universelle mitotische Kinase angesehen wird. (Macaulay et al., 1995; De Souza et al., 2004; Onischenko et al., 2005; Lusk et al., 2007) Daneben sind die säugetierspezifische Proteinkinase A (PKA) und die Proteinkinase C (PKC), die Caseinkinase von *S. cerevisiae* und die Serin/Threoninkinase NIMA von *A. nidulans* an der Phosphorylierung von Nukleoporinen beteiligt (Miller et al., 1999; Cai et al., 2002; De Souza et al., 2004; Lusk et al., 2007). Phosphoryliert werden die Transmembran-Nukleopore Ndc1 (Mansfeld et al., 2006; Stavru et al., 2006) und gp210 (Favreau et al., 1996) sowie die Nukleopore Nup35, Nup153, Nup98, Nup62, Nup214 und der Nup107-160-Komplex (Macaulay et al., 1995; Belagareh et al., 2001; Walther et al., 2003 a; Glavy et al., 2007; Lusk et al., 2007). Durch die Phosphorylierung dissoziieren die einzelnen Subkomplexe voneinander und eine Interaktion wird verhindert. Für die spätere Assemblierung müssen die Nukleopore deshalb dephosphoryliert werden (Walther et al., 2003 a). Ein weiterer Faktor, der in Verbindung mit dem Abbau von NPC's gestellt wird, ist der Coatomer Komplex COP1 (Prunuske et al., 2006; Cotter et al., 2007). Eine Hypothese für die Notwendigkeit dieses Komplexes ist die lokal begrenzte Vesikelbildung über COP1, welche die Kernporemembran auflöst und zum Zerfall des NPC beiträgt. Eine andere Rolle könnte die Aufrechterhaltung von Mikrodomänen innerhalb des ER-Netzwerkes sein, in welches die Bereiche der Kernpore während der Mitose durch laterale Diffusion übergehen (Lim et al., 2008).

## **2.7 Die Neubildung der Kernhülle**

Während der späten Anaphase startet der Prozess der Neubildung der Kernhülle um das Chromatin. In der Telophase wird dieser Prozess abgeschlossen. Die Kernhüllenreuebildung kann in drei Hauptereignisse gegliedert werden: die Assoziation von Proteinen der inneren Kernmembran an das Chromatin, die Umhüllung des Chromatins mit einer Doppelmembran und die Bildung von Kernporen. Da die Auflösung der Kernhülle durch die Phosphorylierung von Nukleoporinen, Chromatin-assoziierten Faktoren und der Kernmembranproteine ausgelöst wird,

ist die Dephosphorylierung aller am Aufbau der Kernhülle beteiligter Faktoren essentiell. Zudem müssen die mitotischen Kinasen inaktiviert werden. Am besten erforscht ist in diesem Zusammenhang die Phosphatase 1, welche die Chromosomenstruktur, Dekondensation des Chromatins und die Dephosphorylierung von Lamin B kontrolliert (Steen et al., 2000; Landsverk et al., 2005; Vagnarelli et al., 2006).

Über die Neubildung der Kernhülle ist bislang noch sehr wenig bekannt. In vitro Untersuchungen haben gezeigt, dass für diesen Prozess RanGTP, die Hydrolyse von GTP und die AAA ATPase p97 benötigt werden, welche bei der Fusion der Membranen zu einer Doppelmembran eine entscheidende Rolle spielen (Hetzer et al., 2001). p97 ermöglicht die Dissoziation chromosomal gebundener Proteine, wie die während der Mitose an Chromosomen gebundene Kinase Aurora. Aurora verhindert den Aufbau einer Kernhülle um die Chromosomen. Durch p97 wird Aurora in der Telophase von den Chromosomen dissoziiert und dessen Blockade aufgehoben (Ramadan et al., 2007).

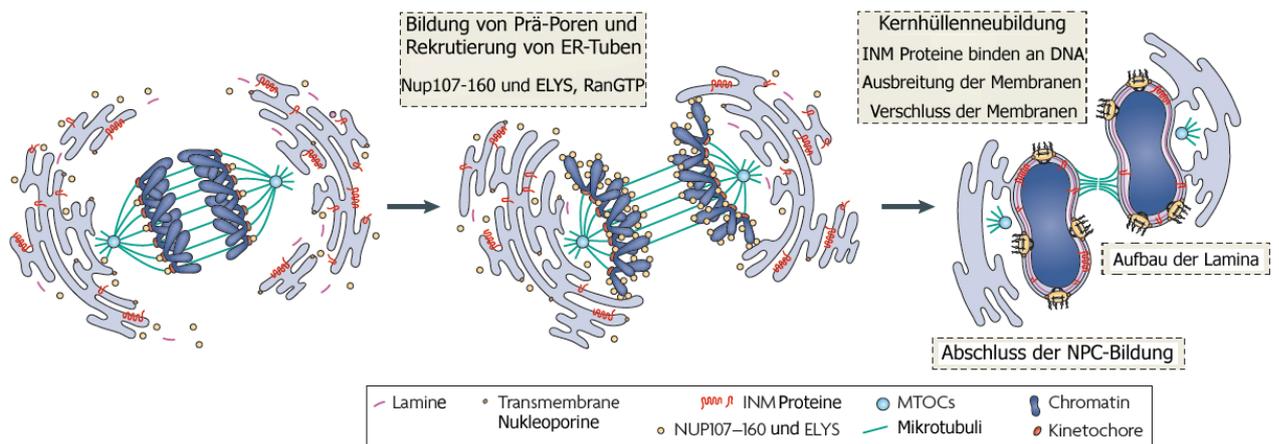
Bei der Bildung der Kernhülle gibt es zwei grundlegende Hypothesen. Bei der einen Hypothese wird davon ausgegangen, dass sich die Kernhülle aus Membranvesikeln aufbaut, die bei der Auflösung der Kernhülle entstanden sind. Die zweite Hypothese bezieht sich darauf, dass die Kernhülle mitsamt Transmembranproteinen während der Mitose in das ER aufgenommen wird und sich daraus anschließend auch wieder die Kernhülle aufbaut. Die Ergebnisse aus in vitro Untersuchungen im zellfreien System von *Xenopus laevis* ließen zunächst darauf schließen, dass die Kernhülle durch die Fusion von mitotischen Vesikeln entsteht, welche Proteine der Kernhülle enthalten. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass die Entstehung dieser Vesikel auf eine Fragmentierung des endoplasmatischen Retikulums während der in vitro Herstellung der Extrakte zurückzuführen ist (Collas und Courvalin, 2000). In vivo Studien bekräftigen die Hypothese, dass transmembrane Proteine der Kernhülle während der Mitose in das ER eingelagert werden, anstatt dass sich Vesikel bilden, die Proteine der Kernhülle beinhalten. (Ellenberg et al., 1997; Yang et al., 1997; Ellenberg und Lippincott-Schwartz, 1999; Daigle et al., 2001). Es ist noch unklar, ob die Komponenten der Kernhülle dabei vollständig in das ER übergehen oder dort innerhalb bestimmter Domänen zusammengelagert vorliegen. In Modellen, die diese Hypothese bestätigen, verbleiben die Proteine der Kernhülle während der Mitose in Subkompartimenten des ER und dienen später als Vorläufer für den Aufbau der Kernhülle nach der Mitose. Im zellfreien System könnte sich deshalb zunächst aus den Membranvesikeln ein intaktes ER-Netzwerk bilden, was die Hydrolyse von GTP benötigt. Anschließend kann aus diesem Netzwerk eine neue Kernhülle entstehen (Anderson und Hetzer, 2007).

Während der Mitose in Säugetierzellen bilden sich aus einem Großteil des ER ein tubuläres Netzwerk (Puhka et al., 2007, siehe 2.5). Möglicherweise sind an den Spitzen der ER-Tuben Proteine anwesend, die in der Kernhülle in stark gekrümmten Membranen lokalisieren, wie

beispielsweise die transmembranen Nukleoporine NDC1 und pom121 oder das NPC-assoziierte Protein SUN1 (Liu et al., 2007; Güttinger et al., 2009). In der frühen Telophase kommen die Spitzen dieser ER-Tuben mit Chromatin in Berührung und starten den Aufbau der Kernhülle (Anderson und Hetzer, 2007; 2008). Die Bindung der Tuben an Chromatin wird durch die hohe Affinität der Proteine der inneren Kernmembran an DNA vorangetrieben (Antonin et al., 2005; Mansfeld et al., 2006; Ulbert et al., 2006; Anderson und Hetzer, 2007).

Nach der Assoziation der Tuben-Spitzen flachen sich die ER-Tuben auf dem Chromatin ab und verteilen sich über die gesamte Chromatinoberfläche (Anderson und Hetzer, 2007; 2008). Ein wichtiger Faktor bei der Fusion der Membranbestandteile zur Bildung der Kernhülle sind Proteine der SNARE-Familie (soluble NSF attachment protein receptor) und die ATPase NSF (NEM-sensitive factor; Söllner et al., 1993), welche bei zahlreichen zellulären Membranfusionsvorgängen benötigt werden (Baur et al., 2007). Im Menschen existieren etwa 30 verschiedene SNARE's, die in verschiedenen zellulären Bereichen benötigt werden (Jahn et al., 2003). Die SNARE-Proteine assoziieren auf ihrer jeweiligen Akzeptormembran zu dreisträngigen helikalen Bündeln und bilden den t-(target)-SNARE-Komplex. Der t-SNARE-Komplex interagiert wiederum mit einem v-(vesicle)-SNARE, welches mit der fusionierenden Membran assoziiert ist und bildet mit ihm ein Bündel aus vier Helices (trans-SNARE). Durch diese Interaktion gelangt die v-SNARE-assoziierte Membran in die unmittelbare Nähe der Akzeptormembran und die Fusion beider Membranen wird eingeleitet. An diese Stelle bindet NSF über den Adapter  $\alpha$ -SNAP (soluble NSF attachment protein). Durch die Hydrolyse von ATP können die SNARE's von den Membranen dissoziieren und die Fusion beider Membranen ist abgeschlossen.

Der genaue Mechanismus, der beim vollständigen Schließen der Kernhülle benötigt wird, ist bislang noch unbekannt. Es wurden hierfür zwei unterschiedliche Modelle postuliert. Das eine Modell führt die Entstehung einer kontinuierlichen Kernhülle auf die Einlagerung von NPC's gegen Ende der Mitose zurück, wodurch die Poren in der Kernmembran versiegelt werden (Anderson und Hetzer, 2007). Das zweite Modell erklärt die lückenlose Schließung der Kernhülle durch Fusionsprozesse der Membranen (Larijani und Poccia, 2009). Da NPC's ebenfalls in intakte Kernhüllen integriert werden können, erscheint das Modell der Membranfusion plausibler (D'Angelo und Hetzer, 2008).



**Abb. 2.3:** Die Neubildung der Kernhülle nach der Mitose. In der Anaphase werden die Chromatiden voneinander getrennt. Die Proteine der INM sind im tubulären ER-Netzwerk verteilt. Der Aufbau der NPC's startet mit der Bildung von Prä-Poren (siehe 2.8). In der späten Anaphase binden die Spitzen der ER-Tuben an Chromatin. In der folgenden Telophase formen sich diese Tuben in flache Membranen ab und bedecken die Chromatinoberfläche. Dabei binden die Proteine der INM und sorgen für die Verbindung zwischen Chromatin und Kernhülle. Der Aufbau der NPC's wird schließlich vollendet und durch die startenden Importprozesse können die für den Aufbau der Lamina fehlenden Lamine ins Innere des Zellkerns transportiert werden. Schematische Darstellung nach Güttinger et al., 2009.

Bestimmte Lipide und Lipid-modifizierende Enzyme spielen ebenfalls eine Rolle bei der Kernhüllenbildung. Im Seeigel konnte gezeigt werden, dass Membranbestandteile, die für die Kernhüllenbildung verantwortlich sind, aus zwei distinkten Membrantypen bestehen. Die eine Membranpopulation ähnelt in ihrer Zusammensetzung dem ER, die andere Population hat einen ungewöhnlich hohen Anteil an Phosphoinositiden, Sterolen und der Phospholipase C (Larijani et al., 2000, 2001; Byrne et al., 2007; Garnier-Lhomme et al., 2009). Phosphoinositide spielen eine wichtige Rolle bei Signalkaskaden und beim Membrantransport (Di Paolo und De Camilli, 2006). Daneben haben Phosphoinositide und ihre Reaktionsprodukte aber auch einen Einfluss auf die Membrandynamik und –struktur (Larijani et al., 2001; Larijani und Poccia, 2007).

Eine Hypothese, die Fusionsprozesse für das vollständige Verschließen der Kernhülle in den Vordergrund stellt, besagt, dass eine lokale Membranfusion durch die Hydrolyse von  $PIP_2$  zu Diacylglycerol (DAG) durch Phospholipase C ausgelöst wird, da DAG strukturelle Veränderungen der Membran auslöst, die für die Fusion von Membranen entscheidend sind (Rand et al., 1981; Rand und Fang, 1993; Larijani und Dufoure, 2006; Chernomordik und Koszlov, 2008). DAG ist ein Lipid mit negativer Krümmung, welches strukturell in Lipiddoppelmembranen eingreifen kann und an Membranfusionen beteiligt ist (Das und Rand, 1986; Coorssen und Rand, 1990; Burger, 2000; Churchward et al., 2008). In Hefe wurde zudem die Interaktion von DAG mit SNARE-Proteinen und Rab nachgewiesen, was eine Verbindung zwischen Lipiden und Proteinen bei der Membranfusion herstellt (Jun et al., 2004). Während der Membranfusion müssen die beteiligten Lipide neu organisiert werden. Die Lipide ordnen sich zunächst so an, dass sich die

Membran an der Stelle der nachfolgenden Membranfusion stark krümmt (Markin et al., 1984; Kozlovsky et al., 2002). Anschließend können die an der Fusion beteiligten Membranen miteinander verschmelzen. Um die hierfür nötige Energieschwelle zu überschreiten, bedarf es der SNARE-Proteine (Chernomordik et al., 2006), der Rab GTPase und bestimmten Phosphoinositid-Kinasen und -Phosphatasen (De Matteis und Godi, 2004; Larijani und Poccia, 2009).

Beim Aufbau der Kernhülle werden ebenfalls Proteine der inneren Kernmembran benötigt (Mansfeld et al., 2006; Anderson und Hetzer, 2007; Chi et al., 2007; Gorjanacz et al., 2007; Antonin et al., 2008). Sobald der Zellkern die ersten Importprozesse durchführen kann, wird der Großteil der Lamina zum Aufbau der Kernlamina in den Zellkern transportiert (Newport et al., 1990). Etwa acht Minuten nach dem Beginn der Anaphase können die ersten Importprozesse nachgewiesen werden (Dultz et al., 2008). Die Kernhülle wächst anschließend, bis sie die volle Größe des Zellkerns erreicht hat.

## **2.8 Assemblierung des Kernporenkomplexes**

Der Aufbau neuer NPC's erfolgt während eines Zellzyklus zweimal: Am Ende der Mitose werden NPC's aus im Zytoplasma gelösten Subkomplexen aufgebaut und in die jeweilige Kernhülle der Tochterzellen eingelagert. Während der Interphase wird die Anzahl der NPC's im Zuge des Zellwachstums aus neu synthetisierten Nukleoporinen verdoppelt.

Die mitotische Neubildung von NPC's beginnt während der späten Anaphase, wenn die Kernhülle um das Chromatin der Tochterzellen gelagert wird (Maul, 1977; Daigle et al., 2001; Belgareh et al., 2001; Burke und Ellenberg, 2002; Walther et al., 2003 a, b; Theisen et al., 2008). Die Neubildung von NPC's nach einer Zellteilung ist ein schrittweise ablaufender Prozess, welcher durch Zusammenlagerung der Subkomplexe bewerkstelligt wird und dabei hoch organisiert abläuft (Drummond et al., 2006; Dultz et al., 2008). Zudem verläuft der Aufbau der NPC's sehr schnell. Etwa 140 NPC's werden innerhalb einer Minute in *Xenopus* Eiextrakt aufgebaut (D'Angelo et al., 2006). Der Aufbau beginnt mit der Rekrutierung des Gerüstkomplexes Nup107-160 an Chromatin. Der Nup107-160-Komplex ist dabei essentiell für den Aufbau von NPC's (Walther et al., 2003 a). Bei der Rekrutierung dieses Komplexes spielt ELYS/Mel-28 eine entscheidende Rolle (Rasala et al., 2006; Gillespie et al., 2007; Franz et al., 2007). Durch ELYS/Mel-28 kann der Nup107-160-Komplex mit Chromatin interagieren. Die Assoziation von Nukleoporinen an Chromatin wird über die Transportrezeptoren Importin  $\beta$  und Transportin sowie die GTPase Ran reguliert (Walther et al., 2003 b; Franz et al., 2007; Rotem et al., 2009; Lau et al., 2009). Während der Mitose ist ELYS/Mel-28 an Importin  $\beta$  und Transportin gebunden und kann somit nicht mit Chromatin interagieren. Durch den an Chromatin assoziierten RanGDP/GTP-Austauschfaktor RCC1 entsteht eine hohe Konzentration von RanGTP in der Nähe des Chromatins. Die Bindung von RanGTP an Importin  $\beta$  und

Transportin sorgt schließlich für die Freisetzung von ELYS/Mel-28 in der Nähe von Chromatin und führt zu der schnellen Rekrutierung des Nup107-160-Komplexes während der späten Anaphase (D'Angelo und Hetzer, 2008). Nach dem gleichen Prinzip werden weitere Nukleoporine an die bereits angefügten Subkomplexe assoziiert. Es folgt die Rekrutierung einer kleinen Teilfraktion der Gesamtmenge an Nup153 und Nup50. Die früh assemblierten Nukleoporine bilden eine Interaktionsplattform für die Transmembran- und peripher lokalisierte Nukleoporine. Die spät assoziierten Nukleoporine werden teilweise auch erst nach dem Beginn der Transportfunktion des NPC integriert, was auf Transport-unabhängige Funktionen schließen lässt (Bodoor et al., 1999; Dultz et al., 2008). Die peripheren Bestandteile des NPC werden ebenfalls erst am Ende der Assemblierung integriert. Der nukleäre Korb, bestehend aus dem Nukleoporin Tpr, wird in Abhängigkeit von Nup153 zu den nukleären Filamenten zusammengesetzt (Frosst et al., 2002; Hase und Cardes, 2003; Krull et al., 2004). Die zytoplasmatischen Filamente, welche aus Nup358 zusammengesetzt sind, werden durch die Beteiligung von Nup214 und Nup88 aufgebaut (Bernad et al., 2004).

Eine wichtige Rolle beim Aufbau eines NPC spielt die Assemblierung des Zentralgerüsts. Bei Hefen lagern sich die acht Y-Komplexe in einen zyto- und einen nukleoplasmatischen Ring zusammen und bilden die Z-Achse des Zentralgerüsts (siehe Abb. 2.2). Für die Zusammenlagerung der Y-Komplexe gibt es momentan drei unterschiedliche Modelle. Im Zaun-Modell, erstellt anhand von Studien mit Hefe-NPC's, bildet sich aus vier Ringen, bestehend aus insgesamt acht Y-Komplexen, die zylindrische Form des Zentralgerüsts (Hsia et al., 2007; Debler et al., 2008). In einem computergenerierten Modell sind dagegen acht Y-Komplexe in zwei distinkte Ringe angeordnet, welche die zyto- und die nukleoplasmatische Seite einschließen. Die restlichen Nukleoporine sind in einen Membranring und Verbindungen zwischen den einzelnen Ringen sowie den FG-Domänen-tragenden Nukleoporinen aufgeteilt (Alber et al., 2007). Das Gittermodell basiert dagegen auf der Homologie von Proteinen mit einer ACE1-Domäne (siehe 2.4) im NPC von Hefen und in COPII-Vesikel-Hüllen (Brohawn et al., 2008). In dem Modell bilden acht Y-Komplexe einen zyto- und einen nukleoplasmatischen Ring, welche durch andere Nukleoporine zu einem Gitter verknüpft sind. Die ACE1-Domäne charakterisiert die Fähigkeit von Proteinen, stark gekrümmte Membranen zu stabilisieren, wie es bei Vesikelhüllen und der Kernpore der Fall ist (Brohawn und Schwartz, 2009).

Der Aufbau der NPC's erfolgt in Abhängigkeit von Calcium (Macaulay und Forbes, 1996). Calcium könnte dabei bei SNARE-vermittelten Fusionsprozessen eine wichtige Rolle spielen (Baur et al., 2007; Rafikova et al., 2009, siehe 2.7). Schon kurz nach der Anaphase beginnt der neu assemblierte NPC seine Transportfunktion. Der Aufbau der Permeabilitätsbarriere ist dagegen zeitlich versetzt und wird graduell innerhalb der ersten Stunden nach der Mitose erhöht (Dultz et al., 2009).

Im Gegensatz zu der Assemblierung von NPC's nach der Mitose ist über den Insertionsvorgang während der Interphase noch relativ wenig bekannt. Bei dem Neuaufbau von NPC's kommt es zu einem kontinuierlichen Einbau von NPC's von der G1- zur G2-Phase (Winey et al., 1997; Maeshima et al., 2006). Die Integration der NPC's erfordert die Assoziation von Nukleoporinen von der zyto- und nukleoplasmatischen Seite der Kernhülle (D'Angelo et al., 2006). Die transmembranen Nukleoporine, die am Aufbau des Zentralgerüsts beteiligt sind, werden jedoch nur in proliferierenden Zellen in die Kernhülle eingebaut. In Zellen, die sich nicht mehr teilen, werden die Nukleoporine des Zentralgerüsts deshalb nicht mehr ausgetauscht oder ersetzt (D'Angelo et al., 2009).

Einige Nukleoporine sind auch bei dem Aufbau von NPC's während der Interphase essentiell (Vasu und Forbes, 2001; Lusk et al., 2002; Madrid et al., 2006). Hierzu zählen das Transmembranprotein Ndc1 und die Nukleoporine Pom152 und Nup53. Ebenso wie bei dem Aufbau von NPC's nach der Mitose sind bei Hefen sowie bei Metazoa Importin  $\beta$ , bzw. Karypherin  $\beta$  und RanGTP entscheidend für den Prozess (D'Angelo et al., 2006 b Ryan et al., 2003; 2007). Im Gegensatz zu der noch unvollständig geschlossenen Kernhülle während der Mitose müssen sich NPC's während der Interphase jedoch auch in intakten Kernhüllen einlagern. Diese de novo Bildung von NPC's wurde in Kernhüllen von *Drosophila* Embryonen (Kiseleva et al., 2001) und in porenfreien Kernhüllenregionen in Hela-Zellen sowie in in vitro Systemen dargestellt (D'Angelo et al., 2006 a). Der Mechanismus der Einlagerung scheint jedoch partiell mit dem des Zusammenbaus neuer NPC's nach der Mitose übereinzustimmen. Eine wichtige Rolle bei der Insertion von NPC's in die intakte Kernhülle spielen Retikulons. Retikulons (RTN's in Vertebraten, RTNI's, bzw. reticulon-like proteins in anderen Eukaryoten) sind eine Gruppe von evolutiv konservierten Proteinen, die hauptsächlich im ER lokalisiert sind und an dem Transport zwischen ER und dem Golgiapparat, an der Bildung von Vesikeln und an der Morphogenese von Membranen beteiligt sind (Yang und Strittmatter, 2007). In Hefen und bei *Xenopus* wurde die Rolle von RTN's bei der Insertion von NPC's in Kernhüllen studiert. Bei diesem Prozess bewirken RTN's die Krümmung der Kernmembranen um die neu inserierten NPC's sowie die Stabilisierung der Porenmembran (Dawson et al., 2009).

## **2.9 Die Funktionen des Kernporenkomplexes und der Nukleoporine**

### **2.9.1 Der nukleo-zytoplasmatische Transport**

Die aktive nukleo-zytoplasmatische Translokation von Proteinen und Proteinkomplexen mit einer Größe über 40 kDa wird über die Interaktion von Transportrezeptormolekülen mit den FG-Domänen der Nukleoporine des Zentralkanals bewerkstelligt. Etwa 1/3 der Nukleoporine besitzt FG-Domänen (siehe 2.4). Die Interaktion während des Transports erfolgt über den

Phenylalaninring der FG-Wiederholungs-Domäne und hydrophoben Resten auf der Oberfläche der Transportrezeptoren (Lim und Fahrenkrog., 2008). Die hydrophilen Verbindungssegmente zwischen den einzelnen FG-Domänen regulieren dabei die Stärke der Interaktion. Mehrere FG-Domänen können simultan an einen Transportrezeptor binden (Liu und Steward, 2005). Die FG-Domänen liegen in vivo ungefaltet vor. Diese Konstitution ist von der Hefe bis zum Menschen konserviert (Denning und Rexach, 2007). Zudem sind die FG-Domänen innerhalb des NPC äußerst flexibel und mobil (Paulillo et al., 2005, 2006). Es ist jedoch bislang noch umstritten, wie die FG-Domänen die selektive Barriere des NPC formieren. Die Vorstellungen reichen von der Bildung eines gelartigen Netzwerkes, welches durch die hydrophoben Verbindungssequenzen zwischen den FG-Wiederholungen gebildet wird (Frey et al., 2006; Frey und Gorlich, 2007), bis zur Entstehung einer wolkenartigen Entropie-Barriere (Rout et al., 2000, 2003; Macara, 2001; Ribbeck und Gorlich, 2002; Patel et al., 2007; Peters, 2009).

Die FG-Domänen sind aber nicht die einzige Komponente der Transportmaschinerie des NPC, denn trotz eines Verlust von 50% der FG-Domänen-tragenden Nukleoporine eines NPC wird der nukleo-zytoplasmatische Transport nicht unterbunden (Lim et al., 2008). Außerdem gibt es FG-Domänen, die mit keinerlei Transportrezeptoren interagieren, wie beispielsweise bei Nup35 der Maus. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass die FG-Domänen nicht nur beim Transport, sondern auch für die Struktur des NPC eine Rolle spielen (Handa et al., 2006).

Die für die Translokation notwendigen Transportrezeptoren vermitteln den aktiven Transport (Stewart, 2007). Sie erkennen bestimmte Signalsequenzen der zu transportierenden Proteine, je nach Transportrichtung ein nukleäres Lokalisationssignal (nuclear localization signal, NLS) oder ein nukleäres Exportsignal (nuclear export signal, NES). Die Transportrezeptoren binden an diese Signalsequenzen. Der Import wird meist über den Transportrezeptor Importin  $\alpha$  vermittelt. Importin  $\alpha$  selbst ist das Adapterprotein für das Rezeptormolekül Importin  $\beta$ . Manche Proteine interagieren jedoch auch direkt mit Importin  $\beta$ . Vor einem Importprozess bildet sich ein Komplex aus Transportrezeptor und Cargo. Dieser Transportkomplex wird über die Interaktion mit den im Zentralkanal lokalisierten FG-Domänen in den Zellkern transportiert. Nach der Translokation des Rezeptor-Cargo-Komplexes bindet im Inneren des Zellkerns die kleine GTPase Ran an den Importrezeptor und es erfolgt die Freisetzung des importierten Cargos (Gorlich und Kutay, 1999; Macara, 2001; Weis, 2002).

Bei Exportprozessen bildet sich aus RanGTP, einem Exportrezeptor und dem zu transportierenden Molekül ein Komplex, welcher ebenfalls über die Wechselwirkungen des Transportrezeptors mit den FG-Domänen im Inneren des NPC nach außen befördert wird. Auf der zytoplasmatischen Seite des NPC befindet sich das RanGTPase-aktivierende Protein RanGAP in einem Komplex mit RanBP1 und Nup358/RanBP2, welcher die Hydrolyse von GTP bewirkt und zu einem großen Pool von RanGDP im Zytoplasma führt (Stewart, 2007; Weis, 2002).

Durch den Re-Import von RanGDP in den Zellkern durch den Ran-spezifischen Transportrezeptor NTF2, wird der RanGDP/GTP-Zyklus aufrechterhalten (Smith et al., 1998). Durch den am Chromatin lokalisierten RanGDP/GTP-Austauschfaktor RCC1 wird die hohe nukleäre Konzentration von RanGTP erzeugt (Azuma und Dasso, 2000) und somit der für die Transportprozesse notwendige Gradient von RanGDP zu RanGTP bewerkstelligt.

### **2.9.2 Transport-unabhängige Funktionen von Nukleoporinen**

Neben dem nukleo-zytoplasmatischen Transport wurden zahlreiche weitere zelluläre Funktionen von Nukleoporinen beschrieben (D'Angelo und Hetzer, 2006). Hierzu zählen die Sumoylierung und Desumoylierung von bestimmten Enzymen (Palancade und Poye, 2008). SUMO's (small ubiquitin-like modifier) sind eine Familie von kleinen Proteinen, die kovalent an ihre Zielproteine assoziiert und davon entfernt werden können und somit deren zelluläre Funktion beeinflussen. Beispielsweise ist Nup358, die Hauptkomponente der zytoplasmatischen Filamente, ebenso eine aktive E3-Ligase, welche an der Sumoylierungsreaktion beteiligt ist (Pichler et al., 2002, 2004). Durch die Sumoylierungsprozesse hat der NPC einen direkten Einfluss auf die Genexpression, DNA-Replikation, DNA-Reparatur, Chromosomensegregation sowie den Zelltod und Seneszenz (D'Angelo und Hetzer, 2008).

Einige Nukleoporine haben wichtige Funktionen während der Mitose. Nup170p/Nup155 spielt eine wichtige Rolle für die Kinetochorfunktion und die Chromosomensegregation (Kerscher et al., 2001). Auch der Nup107-160-Komplex und ELYS/Mel-28 sind während der Mitose an den Kinetochoren lokalisiert (Loiodice et al., 2004; Galy et al., 2006; Rasala et al., 2006; Zuccolo et al., 2007). In der Prometaphase von Säugetierzellen und in rekonstituierten Spindelapparaten in *Xenopus* Eiextrakt ist ein Teil der Nup107-160-Komplexe zudem an den Spindelpolen und den proximalen Spindelfasern assoziiert (Orjalo et al., 2006). Diese Interaktion wird über die Kinetochorkomponente des Ndc80-Komplexes und das Centromerprotein CENP-F gesteuert (Zuccolo et al., 2007). An Kinetochoren und der mitotischen Spindel assoziiert ist auch Nup358 in Kombination mit RanGAP1 (Matunis et al., 1998; Joseph et al., 2002, 2004). Diese Interaktion wird über den Exportrezeptor CRM1 (Chromosome region maintenance 1) vermittelt, welcher die Interaktionsplattform für den Nup358/RanGAP1-Komplex darstellt (Salina et al., 2003; Joseph et al., 2004; Arnaoutov et al., 2005). Der assoziierte Komplex spielt eine wichtige Rolle bei der Trennung der Chromosomen und der stabilen Assoziation der Mikrotubuli an die Kinetochore sowie deren Zusammenbau (Askjaer et al., 2002; Salina et al., 2003; Joseph et al., 2004). Beim Aufbau der mitotischen Spindel ist das mobile Nukleoporin Rae1 beteiligt (Pritchard et al., 1999; Rout et al., 2000; Cronshaw et al., 2002; Blower et al., 2005). Rae1 ist dabei Teil eines großen Ribonukleoproteinkomplexes, welcher die Dynamik des Mikrotubulinetzwerkes reguliert und eine wichtige Rolle beim Aufbau des Spindelapparates trägt

(Blower et al., 2005). Ebenso wird die Orientierung des Spindelapparates durch bestimmte Nukleoporine beeinflusst (Schetter et al., 2006). Über Nup358 kann ebenso die Dynamik des Mikrotubuli-Netzwerkes direkt reguliert werden (Joseph und Dasso, 2008). Somit spielt der NPC bei der Organisation des Zytoskelettes ebenfalls eine Rolle.

Eine weitere wichtige Funktion des NPC innerhalb des Zellkerns ist die Regulation der Chromosomenorganisation und der Genexpression (Brown und Silver, 2007; Kalverda et al., 2008). Die Inhibition der Genexpression erfolgt an der nukleären Peripherie (Shaklai et al., 2007; Akhtar und Gasser, 2007). Hier finden sich Bereiche aus Heterochromatin, Gen-arme chromosomale Regionen und stille Gendomänen. NPC's befinden sich nahe solcher stiller Chromatinregionen (Galy et al., 2000; Feuerbach et al., 2002) und wurden deshalb mit der Transkriptionseinhibition bestimmter Gene in Verbindung gebracht. Beispielsweise ist Nup93, eine Komponente des Zentralgerüsts, ebenso mit mehreren menschlichen Genomregionen assoziiert und sorgt durch die Relokalisation dieser Gene an die Kernporen für eine Inhibition der Genexpression (Brown et al., 2008). Daneben gibt es aber auch zahlreiche Belege für die NPC-vermittelte Aktivierung von Genen durch Rekrutieren von aktiv transkribierten Genen an die nukleäre Peripherie und die Blockade der Heterochromatinbildung (Ishii et al., 2002; Casolari et al., 2004, 2005; Menon et al., 2005; Cabal et al., 2006; Schmid et al., 2006; Luthra et al., 2007). Durch Nup2p wird in Hefen beispielsweise die Bildung von Heterochromatin in bestimmten Domänen blockiert und somit die Transkriptionseinhibition dieser Gene durch deren Lokalisation an NPC's aufgehoben (Ishii et al., 2002). Durch CHIP-Studien (Chromatin Immunpräzipitationen) mit Antikörpern gegen verschiedene Nukleoporine wurden zudem viele Interaktionen mit transkriptionell aktiven Genen nachgewiesen (Casolari et al., 2004). Die Aktivierung der Genexpression vermittelt der NPC hierbei durch eine Änderung in der Chromatinorganisation und -lokalisation der zuvor stillen Gendomänen. Ein Beispiel hierfür ist das Nukleoporin-assoziierte Protein Sus1, welches ein Mitglied des Histon-Acetylase-Komplexes SAGA ist, der bei der Transkriptionsinitiation beteiligt ist (Rodriguez-Navarro et al., 2004; Cabal et al., 2006). Ebenso ist die zelluläre Lokalisation mancher Nukleoporine abhängig von der Genexpression, wie bei den mobilen Nukleoporinen Nup153 und Nup98 (Griffis et al., 2002, 2004). Meist interagieren die an der Genexpression beteiligten Nukleoporine mit Genen, die über den Transkriptionsfaktor Rap1 aktiviert werden (Casolari et al., 2004). Bei Hefen erfolgt die Aktivierung hierbei am NPC durch den Nup84p-Komplex (Homolog zum Nup107-160-Komplex), was die Autoren zur der Hypothese veranlasste, dass nahe der NPC's eine Art Interaktionsplattform gebildet wird, an welche bestimmte Gene durch die zuvor fertig aufgebaute Transkriptionsmaschinerie exprimiert werden können, nachdem sie durch bestimmte Nukleoporine rekrutiert wurden (Menon et al., 2005). Auch in höheren Eukaryoten wurde die SAGA-abhängige Interaktion von Genen mit dem NPC gezeigt (Kurshakova et al.,

2007). Die Lokalisation von Genen an den NPC scheint somit ein evolutiv konservierter Mechanismus für die Regulation der Genexpression zu sein (Lim et al., 2008). Das Nukleoporin ELYS/Mel-28 wurde zudem als direktes DNA-Bindungsprotein und putativer Transkriptionsfaktor identifiziert und reguliert somit auch aktiv und direkt die Genexpression (Rasala et al., 2006; Lim und Fahrenkrog, 2008).

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Nup133 (ein Mitglied des Nup107-160-Komplexes) auch bei embryonalen Differenzierungsprozessen eine Rolle spielt (Lupu et al., 2008).

Einige Nukleoporine wurden zudem in einen Zusammenhang mit der Immunabwehr und der Verursachung von Erkrankungen gestellt. Zahlreiche Krankheiten beruhen auf Veränderungen der NPC-Komposition und nukleärer Transportprozesse und tragen durch den starken Einfluss auf zelluläre Prozesse auch der Entstehung von Krebs bei (Kau et al., 2004; Poon und Jans, 2005). Zudem wurde die seltene autosomal rezessive Krankheit Triple A Syndrom ebenso mit dem NPC in Verbindung gebracht (Cronshaw und Matunis, 2004). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass neben dem nukleo-zytoplasmatischen Transport weitere zelluläre Funktionen dem NPC und seinen Komponenten zugeschrieben werden können.

### **2.10 Annulate Lamellae**

Neben den Kernporenkomplexen existieren in bestimmten Zellen auch zytoplasmatisch lokalisierte Porenkomplexe, in den so genannten Annulate Lamellae. Hierbei handelt es sich um Anhäufungen von Membranstapeln, in welche zahlreiche Porenkomplexe eingelagert sind. Die Annulate Lamellae sind im Gegensatz zu NPC's nicht mit Chromatin assoziiert, beinhalten keine Lamina und finden sich in schnell proliferierenden Zellen, wie embryonalen Zellen, oder Tumorzellen (Kessel, 1992). Die Funktion dieser Organellen ist noch nicht vollständig geklärt, eine Hypothese ist jedoch die Bildung eines Vorrates an Kernporenmaterial, welcher bei sich schnell teilenden Zellen verbraucht würde. Es wurde jedoch in *Drosophila* Embryonen gezeigt, dass die Anzahl an Annulate Lamellae in den wachsenden Synzytien nicht abnimmt, obwohl stetig neue NPC's gebildet werden (Onischenko et al., 2004). Die Entstehung der Annulate Lamellae wurde im zellfreien System aus *Xenopus* Eiextrakt erforscht und konnte in Abwesenheit von Chromatin durch Zugabe eines ATP-regenerierenden Systems erzeugt werden (Dabauvalle et al., 1991). Auch die Blockade der Mitose durch den Wirkstoff Vinblastinsulfat führte in somatischen Zellen zur Bildung der Organellen (Ewald et al., 1996). Es zeigte sich zudem, dass für die Bildung der Annulate Lamellae keine Mikrotubuli notwendig sind, ganz im Gegensatz zur Bildung der Kernporenkomplexe (Ewald et al., 2001). Die Komposition der Annulate Lamellae gleicht der von NPC's. Bis auf die Transmembranproteine Pom121 und gp210 und die Hauptkomponente der nukleären Filamente Tpr (Cordes et al., 1997) sind alle anderen

Nukleoporine in den Organellen nachweisbar (Ewald et al., 1996) und auch der strukturelle Aufbau dieser Porenkomplexe ist homolog zu dem der NPC's.

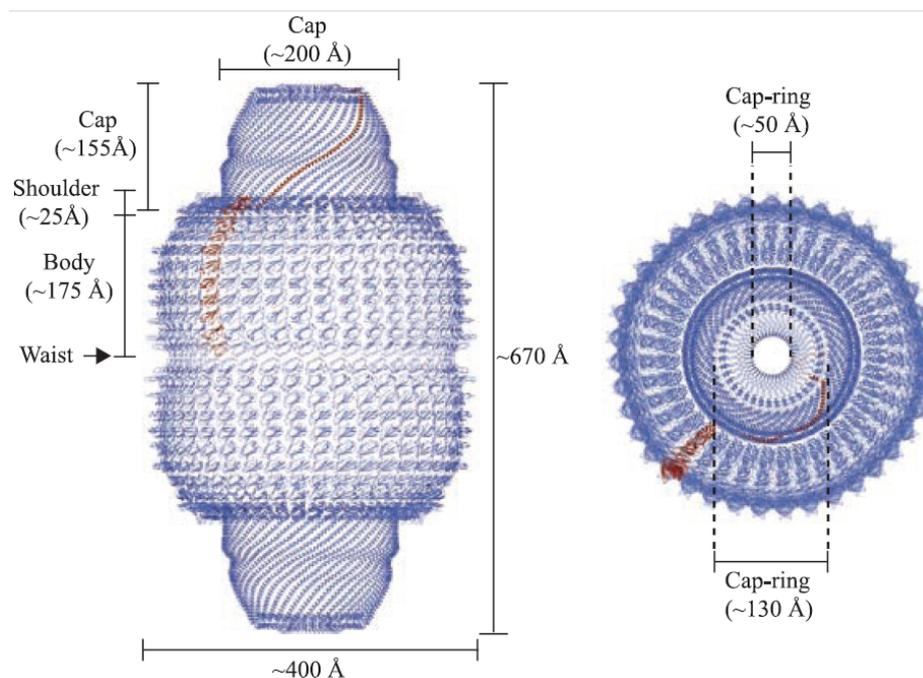
## 2.11 Der Vault-Komplex

1986 entdeckten Kedersha und Rome während der Isolierung und Negativkontrastierung von coated vesicles eine bislang unbekannte, eiförmige Struktur (Kedersha und Rome, 1986 a). Die Partikel konnten isoliert werden und wurden aufgrund ihrer Struktur, welche an die gewölbten Decken von Kathedralen erinnert, als Vaults benannt. Das Organell wurde erst so spät entdeckt, da es durch die herkömmliche Transmissions-Elektronenmikroskopie praktisch nicht sichtbar ist und erst durch Negativkontrastierung dargestellt werden konnte. Durch SDS-PAGE-Analysen wurde die Zusammensetzung der Vaults bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass ein Protein mit einer Molekularmasse von  $\sim 100$  kDa den Hauptteil der Vault-Masse ausmacht (Kedersha und Rome, 1986 b, Kedersha et al., 1991). Daneben wurden drei weitere Proteine und RNA als Vault-Bestandteile identifiziert. Somit handelt es sich um ein Ribonukleoproteinpartikel. Mit einer Größe von  $\sim 72 - 41$  nm, bei  $400 \times 400 \times 700$  Å und einer Gesamtmasse von 12,9 MDa, stellen die Vault-Komplexe die bislang größten entdeckten Ribonukleoproteinpartikel dar. Die Isolierung von Vaults aus unterschiedlichen Lebewesen offenbarte eine ubiquitäre Verteilung innerhalb eukaryotischer Organismen, von Säugetieren, Amphibien, Vögeln, Zitterrochen und Seeigel bis hin zu niederen Eukaryoten wie Schleimpilzen, Plattwürmern und Trypanosomen. Die Morphologie und Größe der Vaults bleibt dabei erhalten, ebenso wie die Proteinzusammensetzung und lässt somit auf eine starke Konservierung und essentielle Funktion schließen (Kedersha et al., 1990; Herrmann et al., 1996; Hamill et al., 1997; Mossink et al., 2002; Suprenant et al., 2007). Vaults wurden jedoch überraschenderweise in den bekannten Forschungsorganismen *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* bislang nicht nachgewiesen und auch in Pflanzen finden sich keine Vault-Partikel (Kickhoefer et al., 1996; Suprenant et al., 2002; van Zon et al., 2003).

Vault-Komplexe haben eine fassartige Form mit jeweils enger zulaufenden und herausragenden Enden und einer leichten Einschnürung in der Mitte. Der Komplex ist innen hohl und setzt sich aus zwei identischen tassenförmigen Hälften zusammen (Kong et al., 1999). Es zeigte sich, dass Vaults nach Gefrier-Ätzung von elektronenmikroskopischen Präparaten (freeze-etch) in blumenähnliche Strukturen aufklappen können (Kedersha et al., 1991). Dabei öffnet sich jede Vault-Hälfte in 8 Blätter, welche durch einen zentralen Ring miteinander verbunden sind. Jedes Blatt ist nochmals der Länge nach in drei einzelne Bereiche gegliedert (Querol-Audi et al., 2009). Die Symmetrie der Vault-Partikel ist jedoch bislang noch nicht exakt geklärt. Die Annahme, Vaults wären in einer achtfachen Symmetrie aufgebaut (Kong et al., 1999), wurde durch artifizielle

Komplexe aus rekombinanten Proteinen widerlegt. Diese rekonstituierten Komplexe ließen auf eine 48-fache Radiärsymmetrie schließen (Mikyas et al., 2004). Durch anschließend durchgeführte Kristallographien von Vault-Komplexen verschiedener Spezies konnte in Ratten eine sechsfache, bei Affen eine dreifache Bilateral-Symmetrie nachgewiesen werden, welche beide mit der zuvor postulierten 48-fachen Radiärsymmetrie konform sind (Querol-Audi et al., 2005). Neueste Studien mit kristallinem Vault offenbarten jedoch eine 39-fache Bilateral-Symmetrie, welche mit der zuvor beschriebenen dreifachen Symmetrie von Affen-Vaults übereinstimmt (Kato et al., 2008).

Die äußere Hülle des Vault-Komplexes besteht aus 78 Kopien des 104 kDa großen Major Vault Proteins (MVP, siehe Abb. 2.4), welches somit 75% der Gesamtmasse des Komplexes ausmacht. Dabei liegen je 39 MVP-Moleküle pro Vault-Hälfte parallel nebeneinander (Tanaka et al., 2009). Neben MVP beinhaltet der Vault-Komplex noch 2 weitere Polypeptide, Telomerase-assoziiertes Protein 1 (TEP-1; Kickhoefer et al., 1999 a) und Vault-Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (vPARP; Kickhoefer et al., 1999 b), sowie untranslatierte RNA, die vRNA (Kickhoefer et al., 1993). Die Anzahl von TEP-1 und vPARP pro Komplex kann variieren und bewegt sich in einem Spektrum von 2-4 Kopien für TEP-1 und 4-16 Kopien für vPARP, jedoch wird angenommen, dass 2 Kopien von TEP-1 und 8 von vPARP am häufigsten auftreten (Kong et al., 2000). Beide Proteine, sowie die vRNA, befinden sich in der Kappenstruktur der Vaults (Suprenant 2002; Berger et al., 2009). Der Komplex ist ungewöhnlich stabil und wird durch Solubilisation oder Denaturierung durch 2 M Harnstoff nicht zerstört (Kedersha und Rome, 1986 b).



**Abb. 2.4:** Struktur des Vault-Komplexes und Aufbau der äußeren Hülle aus MVP-Oligomeren. Je 39 MVP-Moleküle assoziieren zu je einer Vault-Hälfte. Ein einzelnes MVP Molekül ist in der computer-generierten Strukturanalyse rot markiert. Deutlich erkennbar ist die Tassenform jeder Vault-Hälfte (entnommen aus Tanaka et al., 2009).

Vaults kommen intrazellulär in großer Zahl vor. So wurden in differenzierten Zellen bis zu  $10^4$  (Kickhoefer et al., 1998), in embryonalen Zellen bis zu  $10^7$  Partikel pro Zelle gefunden (Hamill und Suprenant, 1997). In Tumorzellen findet man sogar noch eine wesentlich höhere Anzahl an Vault-Partikeln pro Zelle. In menschlichen Astrozyten wurden beispielsweise wesentlich weniger Vault-Partikel nachgewiesen, verglichen mit Tumorzelllinien, welche von Astrozyten abstammten (Berger et al., 2001).

Es wurden neben der tonnenförmigen Form von Vaults auch noch weitaus größere Strukturen beobachtet, die aus zusammen gelagerten Vault-Partikeln zu bestehen scheinen. Hierzu gehören die Vault-Tuben, die sich nach der Transfektion von Zellen mit GFP-markiertem MVP bei Raumtemperatur ausbilden. Bei einer Temperaturerhöhung auf  $37^\circ\text{C}$  dissoziieren diese röhrenartigen Gebilde wieder. Etwa 7.500 einzelne Vault-Komplexe formieren sich dabei zu den Vault-Tuben, die eine Länge von bis zu  $1\ \mu\text{m}$  einnehmen können. Die Funktion dieser Röhren ist bislang nicht bekannt, jedoch scheint die Entstehung hoch dynamisch und abhängig von Mikrotubuli zu sein (van Zon et al., 2003). Neben den Vault-Tuben konnten noch weitere aus Vaults aufgebaute Strukturen erforscht werden. Diese als Vaultosomen bezeichneten Gebilde sind irregulär geformt und können bis zu  $7\ \mu\text{m}$  im Durchmesser erreichen. Im Gegensatz zu Vault-Tuben formieren sich die Vaultosomen jedoch erst bei  $37^\circ\text{C}$  und bilden sich unabhängig vom Zytoskelett. Auch die Funktion dieser Vaultosomen ist bislang nicht geklärt (Suprenant et al., 2007).

### 2.12 Major Vault Protein (MVP)

Die Hauptkomponente der Vaults ist das Major Vault Protein. Es wurde erstmals als Lung Resistance-related Protein (LRP) beschrieben (Scheper et al., 1993), welches in P-Glykoprotein-negativen Tumorzellen überexprimiert wurde. Später konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesem Protein um das Major Vault Protein handelt (Scheffer et al., 1995). MVP besitzt speziesabhängig ein Molekulargewicht von  $100 - 110\ \text{kDa}$  und bildet die äußere Hülle des Vault-Komplexes (siehe 2.11). Das menschliche MVP-Gen liegt auf dem Chromosom 16p11.2 und beinhaltet 15 Exons, welche für ein Polypeptid mit 893 Aminosäuren kodieren. MVP in Ratten besitzt eine Länge von 898 Aminosäuren, bei einem isoelektrischen Punkt von 5,53 und in *Xenopus laevis* findet sich MVP mit einer Länge von 849 Aminosäuren, bei einem isoelektrischen Punkt von 5,16 (Kickhoefer und Rome, 1994).

MVP hat nur wenige Homologien zu anderen Proteinen, ist aber zwischen verschiedenen Spezies evolutiv stark konserviert. So findet sich innerhalb von Säugetieren eine 90% Homologie, zwischen Säugetieren und niederen Eukaryoten eine Homologie zwischen 40-60% (Kedersha et al., 1990; Mossink et al., 2003).

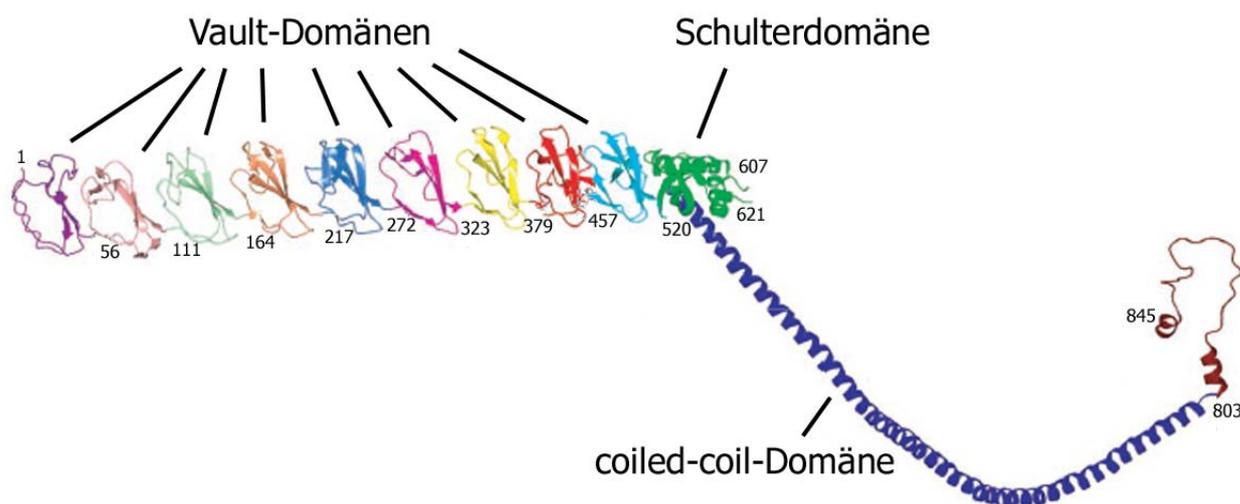
MVP ist in der Lage, sich spontan zu Vaults zusammenzulagern, auch ohne Vorhandensein anderer Vault-Bestandteile. Es konnte gezeigt werden, dass Vault-Komplexe in sf9-Zellen, einer immortalisierten Insekten-Zelllinie aus dem Ovar von *Spodoptera frugiperda*, nachgewiesen werden konnten, nachdem die transfizierten Zellen MVP exprimierten. Da Insektenzellen keine Vaults und auch kein MVP besitzen, zeigte der Versuch, dass zum Entstehen der äußeren Hülle eines Vault-Komplexes MVP ausreichend ist (Stephen et al., 2001; Poderycki et al., 2006).

Es existieren vielfältige Wege, die Expression von MVP während der Zellentwicklung und -differenzierung und auch durch krankheitsverursachte Transformation zu aktivieren und regulieren. Dem MVP-Promotor fehlt die für die meisten Eukaryoten-Gene typische TATA-Box (Mossink et al., 2002) und es fehlen auch weitere Core-Promotor-Elemente (Steiner et al., 2004; Lange et al., 2000). Die Promotorsequenz beinhaltet eine invertierte CCAAT-Box. Daneben findet sich eine GATA-Box, eine E-Box und ein GC-Box-Element (Steiner et al., 2004; Suprenant, 2002; Lange et al., 2000). Innerhalb der Promotorsequenz wurden Bindungsstellen für zahlreiche Transkriptionsfaktoren entdeckt. So finden sich Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor SP1, welcher die Expression von MVP durch Inhibition von Histon-Deacetylasen (HDAC's) induziert (Steiner et al., 2004; Emre et al., 2004). Der Einfluss der HDAC's lässt auf eine Expressionsregulation durch Umstrukturierung von Chromatin schließen. Der Transkriptionsfaktor STAT1 steuert die MVP-Expression nach Aktivierung durch das Interferon  $\gamma$  (Steiner et al., 2006) und innerhalb der CCAAT-Box kann über das Y-Box-binding-Protein1 (YB-1) ebenfalls die Expression von MVP induziert werden (Stein et al., 2005). Daneben finden sich noch Bindemotive für die Transkriptionsfaktoren MyoD und p53 (Lange et al., 2000; An et al., 2009).

Neben der Transkriptionsregulation wird das zelluläre Level von MVP auch durch posttranskriptionelle Mechanismen reguliert, wie der Stabilisierung der MVP mRNA (Laurencot et al., 1997). Die mRNA wird in zwei Varianten gespleißt. Die beiden Spleißvarianten unterscheiden sich nur in ihren 5'-Enden, wobei die längere mRNA ein kurzes Stück oberhalb des Leserasters einen Bereich enthält, der die Translation von MVP inhibiert (Holzmann et al., 2001). Außerdem zeigte sich, dass das intrazelluläre Level von MVP auch durch kleine Anstiege der Expression deutlich erhöht werden kann, da MVP nach dem Einbau in Vault-Partikel eine sehr hohe Halbwertszeit von bis zu drei Tagen besitzt (Zheng et al., 2005). Allerdings variiert die Stabilität des Proteins unter verschiedenen zellulären Konditionen (Steiner et al., 2006). Obwohl bislang keine Ubiquitylierung von MVP nachgewiesen werden konnte, zeigte sich

jedoch, dass das Protein durch Proteasomen abgebaut werden kann und somit ebenfalls die zelluläre Konzentration von MVP reguliert wird. Eine Inhibierung von Proteasomen durch den Inhibitor MG132 oder ALLN führte zur Aggregation von MVP bzw. Vault-Partikeln innerhalb des Zytoplasmas (Sutovsky et al., 2005; Suprenant et al., 2007).

Die Primärsequenz von MVP besitzt mehrere Phosphorylierungsstellen, wodurch MVP Substrat für diverse Kinasen wird. Hierzu zählt die Casein Kinase II, welche MVP in CHO- und PC12-Zellen phosphoryliert (Ehrnsperger et al., 2001). Daneben wurde die Phosphorylierung durch Src-Kinasen gezeigt (Kim et al., 2006) und im elektrischen Organ von Zitterrochen wurde die Aktivität der Proteinkinase C und von Tyrosinkinase an MVP nachgewiesen (Herrmann et al., 1997; 1998). Die Phosphorylierung von MVP erfolgt nach unterschiedlichen Signalen. Eine wichtige Rolle hierbei spielen Signale, die durch Wachstumsfaktoren übermittelt werden. Nachgewiesen wurde hierbei die Phosphorylierung von MVP nach der Aktivität von EGFR (Epidermal growth factor receptor; Kolli et al., 2004; Yi et al., 2005; Kim et al., 2006). Eine stressabhängige Phosphorylierung wurde nach Bestrahlung von Zellen mit UV-Licht nachgewiesen (Yi et al., 2005). Die physiologischen Auswirkungen dieser Phosphorylierungen konnten bisher jedoch nicht aufgeklärt werden (Suprenant, 2002). Die Dephosphorylierung von MVP erfolgt durch die Tyrosin-Phosphatase SHP2 (Kolli et al., 2004). Weitere posttranslationelle Modifikationen erfährt MVP die Poly-(ADP)-Ribosylierung durch vPARP (Kickhoefer et al., 1999). Diese Ribosylierung stellt dabei die einzig bekannte enzymatische Funktion von Vault-Partikeln dar.



**Abb. 2.5:** Die Tertiärstruktur von MVP, dargestellt anhand der computergenerierten Strukturanalyse von Ratten-MVP. Im N-terminalen Bereich von MVP sind die neun Vault-Domänen sichtbar, welche aus antiparallel angeordneten  $\beta$ -Faltblättern bestehen. Die Vault-Domänen bilden innerhalb des Vault-Komplexes die abgerundeten Seitenflächen. Auf die Schulterdomäne, welche sich im Komplex am Beginn der Kappenstruktur befindet, folgt die lange Kappen-Helix-Domäne, die durch eine coiled-coil-Bildung für die Interaktion zwischen den MVP-Oligomeren zum Aufbau des

Komplexes sorgt. C-terminal befindet sich die Interaktionsstelle von MVP mit vPARP. In dem Strukturmodell sind neben den jeweiligen Domänen die zugehörigen Aminosäuregrenzen angezeigt. Modell nach Tanaka et al., 2009.

In den letzten Jahren wurde die Tertiärstruktur von MVP eingehend studiert (siehe Abb. 2.5). Durch Kristallstrukturanalysen in einer Auflösung von 9 Å wurde zunächst angenommen, dass ein MVP-Monomer in 14 unterschiedliche Domänen gefaltet ist (Mikyas et al., 2004; Anderson et al., 2007). Durch Erhöhung der Auflösungsgrenze auf 3,5 Å konnte erst kürzlich an Ratten-MVP gezeigt werden, dass jedes MVP-Molekül in 12 Domänen aufgeteilt ist. Hierzu zählen 9 strukturell gleiche Repeat-Domänen, die sogenannten Vault-Domänen, eine Schulter-Domäne, eine Kappen-Helix- und eine Ring-Domäne (Tanaka et al., 2009). In anderen Spezies variiert die Anzahl dieser Vault-Domänen, von 8 bei *Xenopus laevis* und 7 bei humanem MVP (van Zon et al., 2002; Kozlov et al., 2006). Mit Hilfe von NMR-Analysen eines MVP-Fragments wurde die Struktur der Vault-Domänen näher untersucht. Jede der N-terminal liegenden Vault-Domänen besteht aus dreisträngigen  $\beta$ -Faltblättern, die antiparallel angeordnet vorliegen und über Schleifen miteinander verbunden sind (Kozlov et al., 2006). Jede dieser Repeat-Domänen ist ca. 50 Aminosäuren lang. Über die Funktion dieser Vault-Domänen ist bislang nichts bekannt, jedoch zeigte sich eine Homologie zu Proteinen der TelA-Familie (Toxic Anion Resistance Protein) von *Rhodobacter sphaeroides*, welche die gleiche Anordnung von  $\beta$ -Faltblättern besitzen und auf einen gemeinsamen Ursprung schließen lassen (Suprenant et al., 2007). MVP kann eine Reihe von intra- und intermolekularen Bindungen eingehen, wobei jeweils verschiedene Domänen für die jeweilige Bindung verantwortlich sind. Am carboxyterminalen Ende des Proteins wurde zwischen den Aminosäuren 648-800 eine coiled-coil-Region nachgewiesen, welche in ihrer Struktur deren von Myosinen, Tropomyosinen und Keratinen ähnelt (van Zon et al., 2001) und der zuvor genannte Kappen-Helix-Domäne entspricht. Über hydrophobe Reste innerhalb der coiled-coil-Domäne kann MVP oligomerisieren und somit die äußere Hülle des Vault-Komplexes aufbauen (van Zon et al., 2001). Es wurden 74 Interaktionen zwischen zwei MVP-Oligomeren nachgewiesen, davon 41 innerhalb der Kappen-Helix-Domäne (Tanaka et al., 2009). Diese intermolekularen Interaktionen ermöglichen das selbstständige Zusammenlagern der MVP-Oligomere und bilden die Grundlage für den Aufbau des Vault-Komplexes (vgl. 2.11). Die Schulterdomäne, welche sich an die Vault-Domänen anschließt, entspricht in ihrer Struktur der Core-Domäne von Stomatin (Yokoyama et al., 2008). Stomatin ist ein oligomeres Protein, welches an der Plasmamembran und an späten endosomalen Kompartimenten lokalisiert. Es ist darüber hinaus Hauptbestandteil von Erythrozytenmembranen (Hiebl-Dirschmied et al., 1991). Die Core-Domäne von Stomatin ist aus der Familie der Stomatin-Prohibitin-Flotillin-HfIK-C (SPFH)-Domän-Familie (Tavernarakis et al., 1999), welche mit der Bindung an Lipid Rafts in Verbindung gebracht wurde (Umlauf et al., 2004). Die

hydrophobe Domäne verankert das Protein in Lipidmembranen und ist dort mit Bereichen assoziiert, die sich in ihrer Lipidzusammensetzung von denen der restlichen Membranbereiche unterscheiden und als Lipid Rafts bezeichnet wurden (Snyers et al., 1999). In diesen Bereichen bindet die SPFH-Domäne an Cholesterol. Auch die zu der SPFH- homologe Schulter-Domäne von MVP bindet an Lipidmembranen und wurde mit der Assoziation von MVP an Lipid Rafts in Verbindung gebracht (Kowalski et al., 2007).

Nach dem erfolgreichen Assembly von je 39 MVP-Molekülen zu einer Vault-Hälfte bilden die N-terminalen Regionen, welche die Vault-Domänen beinhalten, die abgerundete Taille, wobei jeweils die N-terminale Spitze jedes Oligomers ins Innere des Komplexes ragt. Die C-terminale Region inklusive der coiled-coil-Region bildet die Kappenstruktur des Vault-Komplexes (Kickhoefer et al., 2005). Die beiden Vault-Hälften werden durch nicht-kovalente Wechselwirkung zwischen den N-Termini der MVP-Moleküle zusammengehalten (Mikyias et al., 2004).

Der Zusammenbau von MVP zu Vault-Partikeln erfolgt in Abhängigkeit von Calcium. Innerhalb der MVP-Sequenz wurden drei Helix-Loop-Helix-Motive ermittelt, die als EF-Hände angenommen wurden (van Zon et al., 2002). EF-Hände binden Calcium-Ionen über ihre Loop-Struktur. Eine Calcium-Bindung von MVP konnte auch direkt nachgewiesen werden. So wurde gezeigt, dass der Tumor Suppressor PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) Calcium-abhängig an Vaults binden kann (Yu et al., 2002). PTEN spielt eine Rolle bei der Regulation der Zellteilung, indem es als Phosphatase bestimmte second messenger dephosphoryliert und somit eine zu rasche Zellteilung verhindert (Maehama et al., 1998). Eine physiologische Funktion der Interaktion zwischen PTEN und MVP ist bislang noch unbekannt. NMR-Spektroskopie konnte die Existenz der vermuteten EF-Hände jedoch nicht bestätigen. Möglicherweise kann MVP Calcium aber auch durch alternative Mechanismen binden. Die hohe Zahl an sauren Resten in den langen  $\beta$ -Faltblatt-Loops der Vault-Domänen könnte hierfür verantwortlich sein (Kozlov et al., 2006). Eine weitere Möglichkeit wäre die Ausbildung einer Calcium-Bindungsstelle durch Oligomerisierung zweier MVP-Moleküle.

### **2.13 Vault-Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (vPARP)**

Durch einen Yeast-Two-Hybrid Screen wurden die Bestandteile eines Vault-Komplexes identifiziert. Dabei wurde auch ein Protein entdeckt, mit einer  $\sim 30\%$ igen Homologie zu der katalytischen Domäne von PARP's (Kickhoefer et al., 1999). Das 195 kDa große Protein wurde vPARP genannt und ist Mitglied der PARP-Proteinfamilie, von denen es beim Menschen bislang 7 beschriebene Mitglieder gibt (Ame et al., 2004). Diese Proteine werden meist im Zusammenhang mit DNA-Schäden aktiv. Sie katalysieren den kovalenten Transfer von ADP-Ribosen aus Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ) auf Glutamat- und Asparagin-Reste.

Die ADP-Ribosen können dabei zu langen verzweigten Ketten anwachsen, welche glykosidisch verbunden sind. Die Ribosylierung erfolgt auf PARP's selbst oder auf eine Vielzahl von Proteinen. Die Poly-(ADP)-Ribosylierung ändert die Interaktion des modifizierten Substrates mit anderen Proteinen und DNA (Smith, 2001; Schreiber et al., 2006) und spielt eine wichtige Rolle bei der Krebspathogenese sowie bei entzündlichen und neurodegenerativen Krankheiten. Die Funktion der PARP's umfasst die Stabilisierung und Reparatur der DNA sowie die Regulation der Telomer-Dynamik. Durch die Ribosylierung der Substrat-Proteine kann zudem die genomische Stabilität, die Kontrolle der Transkription und energetische Metabolismen sowie der Zelltod reguliert werden (Oliver et al., 1999; Smith und de Lange, 2000; Ame et al., 2004; Schreiber et al., 2006; Hassa und Hottinger, 2008). vPARP katalysiert jedoch nur die Poly-(ADP)-Ribosylierung auf sich selbst und auf MVP, obwohl vPARP nicht ausschließlich im Vault-Komplex lokalisiert ist, sondern ein weiterer löslicher Pool von vPARP zytoplasmatisch und nukleär verteilt vorliegt. Bei mitotischen Zellen ist vPARP außerdem am Spindelapparat lokalisiert (Kickhoefer et al., 1999). Bis auf die katalytische Domäne hat vPARP wenig Homologie zu den anderen Mitgliedern der PARP-Familie, was ein Hinweis auf die unterschiedlichen zellulären Aufgaben der einzelnen PARP's sein kann (Smith, 2001).

Das Gen für vPARP liegt auf dem Chromosom 13 und beinhaltet 34 Exons, die für ein Polypeptid mit 1724 Aminosäuren kodieren (Kickhoefer et al., 1999 b). Am C-Terminus des Proteins liegt die Interaktionsdomäne für MVP (Kickhoefer et al., 1999 b; van Zon et al., 2003). Daneben findet sich in vPARP eine BRCT-Domäne (BRCA1-C-Terminal), welche für Proteine charakteristisch ist, die an Zellzyklus-Checkpoints zum Überprüfen von DNA-Schäden beteiligt sind (Bork et al., 1997). Dieselbe Domäne findet sich auch in PARP1, dem bekanntesten Vertreter der PARP-Familie. vPARP wird jedoch nicht durch DNA-Schäden aktiviert (Kickhoefer et al., 1999 b) und vPARP - (-/-) Mäuse weisen keine chromosomale Instabilität auf (Liu et al., 2004). Die BRCT-Domäne zweier identischer Proteine ist in der Lage ein Dimer auszubilden. Daneben kann auch ein Heterodimer mit der BRCT-Domäne eines anderen Proteins gebildet werden (Zhang et al., 1998), was die Möglichkeit einer Heterodimer-Bildung der BRCT-Domäne von vPARP mit anderen Proteinen ergibt (Suprenant, 2002).

Neben der enzymatisch aktiven PARP- und der BRCT-Domäne besitzt das Protein noch eine Vault-Inter-alpha-Trypsin-Domäne (VIT) sowie eine von Willebrand-Faktor(vWF) Typ A-Domäne. Die Funktion der VIT-Domäne ist bislang unbekannt, sie findet sich jedoch auch in der schweren Kette von Proteinen der Inter-Alpha-Trypsin-Inhibitor-Familie (Choi-Miura et al., 1995). Die vWF-Domäne kommt hauptsächlich in Proteinen der extrazellulären Matrix vor und spielt bei Zell-Adhäsionen eine Rolle, indem es über die Bindung von Metall-Ionen die Bildung von Multi-Protein-Komplexen reguliert (Baldwin et al., 1998; Whittaker und Hynes, 2002). vPARP besitzt außerdem ein Kern-Lokalisations-Signal (nuclear localization signal, NLS).

Die Funktion von vPARP innerhalb des Vault-Komplexes ist bislang nicht vollständig geklärt. Die ADP-Ribosylierung von MVP könnte jedoch den Zugang von bestimmten Faktoren und Molekülen zum Inneren eines Vault-Komplexes regulieren, da durch die Ribosylierung negative Ladungen auf MVP übertragen werden und ein Zugang in den Vault-Komplex davon abhängig sein könnte (Suprenant, 2002). Innerhalb des Vault-Komplexes lokalisiert vPARP an der Seitenfläche und an den Kappenstrukturen und bindet am N-terminalen Ende der MVP-Oligomere, jedoch ist vPARP für den Aufbau des Komplexes nicht notwendig. Ebenfalls irrelevant ist die enzymatische Aktivität von vPARP für die Interaktion mit Vault-Partikeln (Zheng et al., 2005). Es ist somit nicht auszuschließen, dass vPARP über die Interaktion mit dem Vault-Komplex in verschiedene zelluläre Bereiche gebracht werden kann und die Assoziation mit Vaults nur dessen Transport dient (Berger et al., 2009). Hierfür spricht auch die zelluläre Verteilung von vPARP außerhalb des Vault-Komplexes.

#### **2.14 Telomerase-assoziiertes Protein 1 (TEP1)**

Neben vPARP wurde im Yeast-Two-Hybrid-Screen von Kickhoefer (Kickhoefer et al., 1999 a) ein zweites Vault-assoziiertes Protein ermittelt, welches nach Sequenzvergleichen als das Telomerase-assoziierte Protein 1 (TEP1) identifiziert wurde, welches zuvor im Zusammenhang mit Telomerase-assoziierten Proteinen beschrieben wurde (Harrington et al., 1997) und aufgrund der Sequenz-Homologie mit dem Telomerase-assoziierten Protein p80 von Ciliaten der Gattung *Tetrahymena* verwandt ist (Collins et al., 1995). Das Gen für TEP1 liegt auf dem Chromosom 14q11.2 und kodiert für ein Protein mit 2629 Aminosäuren, mit einer Molekularmasse von 240 kDa (Harrington et al., 1997). Eine funktionelle Notwendigkeit von TEP1 im Zusammenhang mit der Aktivität der Telomerase konnte nicht nachgewiesen werden und TEP1 ist auch kein Bestandteil des Telomerase-Core-Komplexes (Weinrich et al., 1997). Die Telomerlängen werden durch Abwesenheit von TEP1 in (-/-)-Mäusen nicht beeinflusst und die Mäuse sind wie die vPARP- und MVP(-/-)-Mäuse fertil und ohne Störungen in ihrer Entwicklung (Liu et al., 2004; Kickhoefer et al., 2001). Die Vault-Partikel von TEP1-Knockout-Mäusen zeigten jedoch im Vergleich mit anderen Vaults weniger elektronendichte Kappen, was auf eine Lokalisation von TEP1 in den Kappenstrukturen der Vault-Komplexe hindeutet (Kickhoefer et al., 2001; Mikyas et al., 2004). Außerdem zeigte sich, dass die Vaults der Knockout-Maus keine Vault RNA enthalten. Die Lokalisation und Stabilisierung der vRNA innerhalb der Vaults ist deshalb abhängig von TEP1, jedoch wurde ebenfalls gezeigt, dass TEP1 auch mit Telomerase RNA assoziiert sein kann (Kickhoefer et al., 1999 a; Harrington et al., 1997). Vault-Komplexe besitzen aber weder eine Telomerase-Aktivität, noch sind sie mit Telomerasen assoziiert. Interessanterweise wurde vPARP mit Vault-unabhängiger Telomerase-Aktivität in Zusammenhang gebracht, welche durch TEP1 reguliert wird (Liu et al., 2004). Beide Vault-

assoziierten Proteine können entweder zusammen oder alleine in Vault-Partikel integriert werden (Mikyas et al., 2004), jedoch hat MVP nur eine Bindungsstelle für vPARP (van Zon et al., 2002). Eine Bindungsstelle für TEP1 könnte sich somit erst innerhalb eines fertig zusammengelagerten Vault-Komplexes ausbilden (Mikyas et al., 2004; Poderycki et al., 2005). Bei der Assoziation von TEP1 mit Vaults ist die Interaktion mit vRNA nicht notwendig. Die Domäne zum Binden von RNA liegt bei TEP1 N-terminal (Poderycki et al., 2005). Sie wurde als TROVE-Modul bezeichnet, welches sich neben TEP1 in dem Telomerase-assoziierten Protein p80, in der Ro60-Proteinkomponente des RoRNP-Komplexes und in einigen uncharakterisierten Bakteriensequenzen findet (Deutscher et al., 1988; Bateman und Kickhoefer, 2003; Berger et al., 2009). Wie in vPARP findet sich auch in TEP1 eine vWF-Domäne (Bateman und Kickhoefer, 2003). Ein Entfernen dieser Domäne wirkt sich negativ auf die RNA-Bindfähigkeit von TEP1 innerhalb des TROVE-Moduls aus (Poderycki et al., 2005). Somit scheint es eine komplexe Interaktions-Vernetzung für die Assoziation der vRNA an TEP1 zu geben. Am carboxyterminalen Bereich von TEP1 wurden 16 WD40-Repeat-Regionen (Wiederholungen des Dipeptids Tryptophan-Asparaginsäure) identifiziert (Harrington et al., 1997). Diese Repeat-Domäne bildet propellerähnliche Strukturen aus, welche die Bindung und Zusammenlagerung von Multiprotein-Komplexen ermöglichen. Ein Beispiel hierfür findet sich in Histonen (Suganuma et al., 2008) oder in Zell-Signal-Molekülen (Cambright et al., 1996). Die WD40-Repeat-Domäne ist sehr elektronendicht und wurde an der Kappenstruktur der Vault-Partikel identifiziert (Kong et al., 2000), was auf eine strukturelle Aufgabe von TEP1 innerhalb des Komplexes schließen lässt. Jedoch ist TEP1, wie auch vPARP, für die Ausbildung der Vault-Komplexe nicht notwendig. Eine weitere Domäne innerhalb von TEP1 ist die NACHT-NTPase-Domäne, welche nach den fünf Proteinen benannt wurde, die diese Domäne tragen. Zu dieser Proteingruppe gehören der neuronale Apoptose Inhibitor (**NAIP**), der MHC Klasse II Transkriptions-Aktivator (**CIITA**), das *Podosporina anserina* Inkompatibilitäts Lokus Protein (**HET-E**) und TEP1 (Koonin und Aravind, 2000). Die Funktion der NACHT-NTPase von TEP1 innerhalb des Vault-Partikels könnte den Zugang zum Inneren des Komplexes regulieren (Suprenant, 2002).

## 2.15 Vault RNA (vRNA)

Neben den drei Proteinkomponenten enthält der Vault-Komplex noch RNA. Diese als Vault RNA (vRNA) benannte Nukleinsäure kommt in mindestens 6 Kopien pro Komplex vor und macht etwa 5% der Komplexgesamtmasse aus. vRNA ist dabei speziesabhängig unterschiedlich in ihrer Anzahl und Art (Kickhoefer et al., 1993; Kong et al., 2000; van Zon et al., 2001). Die Gene für die vRNA liegen tandemrepetiert auf Chromosom 5p innerhalb einer 16 kb großen Region (van Zon et al., 2001). Die Promotor-Elemente bestehen aus einer 2A- und einer B-Box und

sind evolutiv hoch konserviert (Kickhoefer et al., 1993; Kickhoefer et al., 2003; Vilalta et al., 1994). Daneben findet sich noch eine TATA-Box vom Typ 3 und externe Sequenzelemente (van Zon et al., 2001). Sowohl externe als auch interne Promotorelemente sind für die Transkription der vRNA durch die Polymerase III notwendig (Kedersha und Rome, 1986; Kickhoefer et al., 1993; Vilalta et al., 1994).

Mäuse und Ratten besitzen nur eine Art von vRNA, welche 141 Nukleotide lang ist, Ochsenfrösche haben dagegen zwei unterschiedliche vRNA's mit einer Länge von 88- und 94 Nukleotiden und Menschen besitzen drei vRNA's (hvg1-3) mit Längen zwischen 88- und 98 Nukleotiden. Der Mensch hat zudem ein zusätzliches vRNA-Gen (hvg4), welches auf dem X-Chromosom liegt und nicht transkribiert wird (van Zon et al., 2001). Erst kürzlich wurde zudem eine nicht-kodierende RNA (ncRNA) entdeckt, welche in ihrer Primär- und Sekundärstruktur denen der anderen vRNA's stark ähnelt und ebenfalls mit dem Vault-Komplex co-sedimentiert. Diese neue vRNA wurde zuvor als CBL-3 beschrieben, scheint jedoch eine weitere 4. vRNA zu sein (Mrazek et al., 2007; Nandy et al., 2009). Die Regulation der vRNA-Transkription ist noch nicht vollständig aufgeklärt, jedoch konnte gezeigt werden, dass eine Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) die Expression um bis zu 1200-fach verstärkt (Mrazek et al., 2007; Motsch et al., 2007), was eine mögliche Rolle bei der Immunabwehr in Frage kommen lässt. Obwohl die vRNA-Gene zwischen den Spezies nur wenig homologe Bereiche aufweisen, ist die Sekundärstruktur der vRNA jedoch hoch konserviert (Kickhoefer et al., 1993; van Zon et al., 2001). Durch das Vault-assoziierte Protein TEP1 wird die vRNA innerhalb des Vault-Komplexes integriert und stabilisiert. In den Vaults von TEP1-(-/-)-Mäusen kann deshalb keine RNA nachgewiesen werden (Kickhoefer et al., 2001). Auch wird die vRNA durch TEP1 vor Degradation geschützt und die Halbwertszeit erheblich verlängert. Neben TEP1 konnte auch ein weiteres Protein in Verbindung mit der vRNA gebracht werden, das La RNA-Bindungsprotein (Kickhoefer et al., 2002), welches mit den N-terminalen Enden neu synthetisierter kleiner RNA's interagieren kann. Dabei spielt die Sequenz UUU-OH die entscheidende Rolle, welche während der Transkriptionstermination der RNA-Polymerase III erzeugt wird und vom La Protein erkannt wird (Maraia und Bayfield, 2006). Da neu synthetisierte vRNA keiner posttranskriptionellen Modifikation unterzogen wird, bleibt der 3'-Polyuridylat-Schwanz erhalten und kann durch das La Protein gebunden werden. Das La RNA Bindungsprotein ist an der Prozessierung und der Zusammenlagerung von untranslatierten RNA's in Ribonukleoproteinpartikel beteiligt (Maraia et al., 2001; Maraia et al., 2002). Daneben findet man das La Protein assoziiert mit der RNA-Komponente des Telomerase-RNP-Komplexes (Ford et al., 2001).

Die Funktion der vRNA innerhalb des Vault-Komplexes ist bislang noch nicht aufgeklärt. Die Gene hvg1-3 werden co-exprimiert, jedoch zu unterschiedlichen Anteilen, wobei die Menge an hvR1 klar dominiert (van Zon et al., 2001). In den Vaults konnten alle drei vRNA-Typen

lokalisiert werden, es ist jedoch nicht bekannt ob ein Vault-Partikel nur jeweils eine der drei vRNA's trägt oder auch alle drei zusammen. Die RNA-Komponente der Vaults könnte demnach die Art des Vault-Komplexes bestimmen. Die vRNA scheint für den korrekten Aufbau und Form der Komplexe nicht notwendig zu sein. So konnte in RNase-behandelten Vaults keine Änderung der Partikelstruktur festgestellt werden (Kedersha et al., 1991; Kong et al., 2000), jedoch zeigte sich die Kappenstruktur der Vaults nach der Behandlung weniger elektronendicht, was auf eine Lokalisation der RNA in der Kappenstruktur der Vaults schließen lässt. Ebenfalls ungeklärt bleibt die Tatsache, dass nur etwa 20% der vRNA mit Vaults assoziiert ist und daneben auch in einem gelösten Pool innerhalb der Zelle lokalisiert (Kickhoefer et al., 2002; Berger et al., 2009). Es besteht deshalb die Möglichkeit, dass vRNA neben der Bildung des Vault-Komplexes noch weitere zelluläre Aufgaben übernehmen kann. Nicht-kodierende RNA scheint eine wichtige Rolle in der Regulation und Ausführung zellulärer Vorgänge zu spielen. Sie kann beispielsweise aktiv Einfluss auf die Regulation der Genexpression nehmen (Hüttenhofer et al., 2005). Die starke Exprimierung von vRNA nach viraler Infektion lässt auf regulative Aufgaben schließen (Mrazek et al., 2007; Nandy et al., 2009). Ebenso konnte kürzlich gezeigt werden, dass humane vRNA regulatorische kleine RNA's (svRNA's) erzeugt, welche ebenfalls an der Regulation der Genexpression beteiligt sind (Persson et al., 2009). Somit ergibt sich die Möglichkeit, dass der Vault-Komplex nur der Transporter für die vRNA in verschiedene zelluläre Bereiche darstellt.

## **2.16 Lokalisation und Transport von Vaults**

Der Hauptanteil (über 90%) der Vault-Partikel sind im Zytoplasma lokalisiert (Kickhoefer et al., 1996; van Zon et al., 2003; Steiner et al., 2006). Neben der zytoplasmatischen Verteilung wurden Vault-Partikel zudem auch an der Kernhülle und im Innern des Zellkerns nachgewiesen (Kickhoefer et al., 1998; Berger et al., 2000; Mossink et al., 2003; Slesina et al., 2005; van Zon et al., 2006). An der Kernhülle scheinen Vaults in der Nähe von bzw. direkt an Kernporenkomplexen zu lokalisieren (Chugani et al., 1993; Dickenson et al., 2007). Diese Assoziation an den Kernporen ist wahrscheinlich Calcium-abhängig. Durch Analysen von verschiedenen Gewebetypen unterschiedlicher Spezies zeigte sich, dass die innerzelluläre Lokalisation der Vault-Komplexe vom Zelltyp und der Spezies abhängig ist. Untersuchungen von Glioblastomzellen (U373-Zellen) zeigten beispielsweise im Vergleich zu anderen Zelltypen einen deutlich erhöhten Anteil von Vaults innerhalb des Zellkerns. Etwa 5% der Vault-Partikel waren hierbei innerhalb des Nukleus anzutreffen (Slesina et al., 2005). Ebenso zeigte sich eine starke nukleäre Akkumulation von Vaults in Tumorzellen des menschlichen Magens (Kim et al., 2006). In menschlichen Fibroblasten konnte dagegen durch subzelluläre Fraktionierung eine gleichmäßige Verteilung von Vaults innerhalb des Zytoplasmas und des Zellkerns festgestellt werden (Ryn et al., 2008). Neben den Unterschieden zwischen verschiedenen Spezies und

Zelltypen konnten auch differenzierungsabhängige Unterschiede aufgezeigt werden. Im Seeigel beispielsweise ist die Lokalisation der Vault-Komplexe während der Embryonalentwicklung reguliert. So steigt der nukleäre Anteil an Vaults ab dem Blastula-Stadium bis zur Gastrulation an, was auf eine Rolle von Vaults während der Zelldifferenzierung schließen lässt. In adulten Seeigel-Zellen akkumulieren die Vault-Komplexe dann schließlich rund um die Nukleolen (Hamill und Suprenant, 1997; Stewart et al., 2005).

Im Bezug auf den Transport von Vault-Partikeln wurden verschiedene Transportwege und -prozesse beschrieben. Aufgrund einer Studie, die den Transport von Vault in Abhängigkeit der Temperatur gestellt hat, wurde zunächst vermutet, dass Vault-Partikel nicht über Mikrotubuli transportiert werden, sondern durch passive Diffusion an ihren Bestimmungsort gelangen (van Zon et al., 2003). Die schiefe Größe der Vault-Komplexe spricht jedoch gegen die passive Diffusion für den Transport in bestimmte subzelluläre Bereiche (Luby-Phelbs et al., 1987; Luby-Phelbs, 2000). Trotz der widersprüchlichen Ergebnisse lässt sich die passive Diffusion deshalb für einen gerichteten Transport, wie z.B. während der Seeigel-Entwicklung, nahezu ausschließen. Eine Interaktion von Vaults mit dem Zytoskelett konnte schon recht bald durch Kedersha und Rome nachgewiesen werden. In den Außenbereichen der Zelle und im Bereich der Zell-Adhäsions-Kontakte assoziierten Vaults mit Aktinfilamenten (Kedersha und Rome, 1990). Auch in den Nervenenden cholinergischer Synapsen wurde eine Co-Lokalisation mit dem Aktinfasernetzwerk gezeigt (Herrmann et al., 1996). Ein direkter Nachweis der Bindung von Vaults an Aktinfasern ist bislang jedoch noch nicht erbracht worden. Im Gegensatz zum Aktinfilament wurde in verschiedenen Zelltypen aber eine Interaktion mit dem Mikrotubuli-Netzwerk dargestellt. So co-lokalisierten Vaults mit Mikrotubuli an den Enden von PC12-Neuriten (Herrmann et al., 1999) und durch eine Gradientenzentrifugation wurde eine Co-Sedimentation von Vaults und Tubulin-Untereinheiten festgestellt (Hamill und Suprenant, 1997). In Tumorzellen aus der menschlichen Lunge konnte durch eine Co-Immunpräzipitation zudem eine Interaktion von MVP mit Tubulin bewiesen werden (van Zon et al., 2006). Die Interaktion von Vault-Partikeln mit dem Mikrotubuli-Netzwerk findet dabei über die Kappenstruktur der Komplexe statt und scheint relativ stabil zu sein. Selbst nach Auflösung des Mikrotubuli-Netzwerkes durch die Droge Nocodazol bleiben die Vaults an den Tubulin-Di- und Oligomeren gebunden (Eichenmüller et al., 2003). Die Stabilisierung der Mikrotubuli durch Taxol führt dazu, dass in Immunpräzipitationen verhältnismäßig mehr Tubulin an Vaults assoziiert bleibt (van Zon et al., 2006). Der aktive und gerichtete Transport der Vault-Komplexe innerhalb der Zelle konnte durch Einsatz eines GFP-markierten MVP-Fusionsproteins zudem direkt dargestellt werden (Slesina et al., 2006). Die Bewegung der GFP-markierten Vaults zeigte eine schnelle, möglicherweise saltatorische Fortbewegung, welche mit einer Geschwindigkeit von bis zu 10  $\mu\text{m}$  pro Sekunde verläuft (Slesina et al., 2006) und dem anterograden, axonalen

Transport von synaptischen Vesikeln gleicht (Berger et al., 2009). Ein Transport von Vaults innerhalb von Axonen wurde in der Tat nachgewiesen (Li et al., 1999), jedoch zeigte sich auch, dass MVP dabei mit größeren granulären Strukturen assoziiert ist, die wesentlich größer sind als Vault-Komplexe. Daraus lässt sich schließen, dass beim Transport von Vaults entweder mehrere Vault-Komplexe aggregieren oder jeweils mit größeren Organellen bzw. granulären Komponenten in Verbindung stehen. Der schnelle gerichtete Transport über das Zytoskelett befähigt Vaults zur Translokation zu subzellulären Bereichen wie den synaptischen Endköpfchen, präsynaptischen Kompartimenten oder Lipid Rafts (Herrmann et al, 1996; 1999; Berger et al., 2001; Slesina et al., 2005). Durch die Blockierung der Mikrotubuli-Polymerisation mit Hilfe von Nocodazol wurde der Transport von Vault-Komplexen jedoch nicht vollständig unterbunden, sondern nur erheblich reduziert (van Zon et al., 2003). Deshalb ist es wahrscheinlich, dass es neben dem aktiven Transport von Vaults über große zelluläre Distanzen auch den ungerichteten Weg über kürzere Distanzen mit Hilfe der passiven Diffusion gibt, welcher auch zunächst von van Zon postuliert wurde (van Zon et al., 2003). Außerdem scheint der Transport von Vaults über Aktinfilamente ebenfalls stattzufinden, auch wenn dieser bislang noch nicht direkt bewiesen wurde.

### **2.17 Zelluläre Funktion der Vault-Komplexe**

Über die Funktion der Vault-Komplexe wurde bislang sehr viel spekuliert. Die außergewöhnliche Form, die hohe evolutive Konservierung und die ubiquitäre Expression lassen jedoch auf wichtige zelluläre Funktionen schließen. Aufgrund der hohlen, fassartigen Struktur, der schnellen Bewegung und der distinkten subzellulären Lokalisation wurden die Vaults zunächst als zelluläre Transporter eingestuft (Rome et al., 1991; Kickhoefer et al., 1996; Suprenant, 2002; Steiner et al., 2006). Ihre schiere Größe würde ein Vault-Partikel dazu befähigen, drei gesamte Ribosomen im Innern aufzunehmen. Diese Annahme wurde durch das frequentierte Auftreten einer Masse im Inneren von Vault-Komplexen bekräftigt (Kong et al., 1999). Da Vaults mit dem Zytoskelett assoziieren und innerhalb des Zytoplasmas und des Nukleus lokalisieren, könnten sie eine Rolle im nukleo-zytoplasmatischen Transport übernehmen. Für diese Transportfunktion sprechen mehrere Befunde, wie der Import des Tumorsuppressors PTEN (Chung und Eng, 2005; Chung et al., 2005), der Import von Hormonrezeptoren (Abbondanza et al., 1998) oder der Transport von Medikamenten und Wirkstoffen (Kitazono et al., 1999; Kitazono et al., 2001). Der beidseitige Transport wurde durch die Relokalisation von Vaults aus dem Zytoplasma an die Kernhülle bekräftigt (van Zon et al., 2006). Da Vaults in adulten Seeigelzellen in der Nähe der Nukleolen lokalisieren, wurde auch ein Transport von Ribosomenuntereinheiten, bzw. Ribonukleoproteinen (RNP's) aus dem Zellkern ins Zytoplasma in Erwägung gezogen (Hamill und Suprenant, 1997). Neben RNP's könnten Vaults auch

Transkriptionsfaktoren sowie Kinasen und Phosphatasen zwischen Kern und Zytoplasma transportieren (Suprenant, 2002).

Neben dieser Transportfunktion wurden Vaults in den letzten Jahren jedoch auch eine Vielzahl von weiteren zellulären Funktionen zugeschrieben, die zum Teil auch auf die Vault-assoziierten Proteine TEP1, vPARP und die vRNA zurückzuführen sind (Kickhoefer et al., 1996; Suprenant, 2002; Mossink et al., 2003). Eine wichtige Beobachtung war die Tatsache, dass das Lung Resistance Protein LRP, welches in einer Vielzahl von Chemotherapie-resistenten Zellen überexprimiert wird, identisch mit MVP ist (Scheffer et al., 1995; Izquierdo et al., 1996). Deshalb wurde MVP schon früh eine Rolle bei der Arzneimittel-Resistenz (Multiple Drug Resistance, MDR) zugesprochen (Suprenant, 2002; Mossink et al., 2003; Steiner et al., 2006). MVP wird in Zellen, die ständig verschiedensten Umwelteinflüssen ausgesetzt sind, häufig stark exprimiert. Hierzu zählen der Verdauungstrakt, das Lungenepithel und frühe Entwicklungsstadien (Izquierdo et al., 1996; Sutovsky et al., 2005; Bouhamyia et al., 2007). Daneben wird MVP auch in verschiedenen chemoresistenten menschlichen Krebszelltypen überexprimiert (Scheper et al., 1993; Scheffer et al., 1995; Kickhoefer et al., 1998; Schroeijers et al., 2000). Die Funktionsweise von Vaults bei dem Aufbau einer Multiple Drug Resistance wurde dem Export von Arzneistoffen aus dem Zellkern in das Zytoplasma zugeschrieben. Einen Hinweis auf eine derartige Beteiligung von MVP bei der Entstehung einer Multiple Drug Resistance gibt die Co-Lokalisation von MVP mit dem Wirkstoff Doxorubicin in zytoplasmatischen Vesikeln (Meschini et al., 2002). Doxorubicin kann seine Wirkung nur innerhalb des Zellkerns entfalten. Wird der Wirkstoff jedoch durch MVP in zytoplasmatische Vesikel relokalisiert, so kann sich eine Resistenz gegen den Wirkstoff aufbauen. Weitere Hinweise auf eine Beteiligung von MVP bei einer Multiple Drug Resistance können durch die Inhibition von MVP erbracht werden. Die Zugabe eines putativen MVP-Inhibitors (PAK-104P, ein Pyridin-Analogon) bewirkt die Akkumulation von Arzneistoffen im Zellkern und somit die Re-Sensibilisierung auf chemotherapeutische Behandlung (Kitazono et al., 1999; 2001). Die Inhibition von MVP mit MVP-Antikörpern erzielte einen homologen Effekt (Kitazono et al., 1999). Ebenso kann durch die Blockierung von MVP durch siRNA die Multiple Drug Resistance in menschlichen Blasenkrebs-Zellen rückgängig gemacht werden (Herlevsen et al., 2007). Daneben wurde auch der lysosomale Transportweg behindert, was auf eine Rolle von MVP in der Aufrechterhaltung der Lysosomen-Biogenese hindeutet. Bekräftigt werden konnte diese Hypothese durch die partielle Co-Lokalisation von MVP mit dem lysosomalen Marker CD63 in menschlichen dendritischen Zellen (Schroeijers et al., 2002).

Die Beteiligung von MVP bei der Multiple Drug Resistance wird jedoch noch kontrovers diskutiert. So führt die bloße Verstärkung der MVP-Expression nicht zu einem MDR-Phänotyp (Siva et al., 2001). Außerdem spricht die Tatsache, dass die MVP (-/-)-Knock-Out-Maus nicht

hypersensitiv gegenüber chemotherapeutischen Wirkstoffen ist, auch gegen einen direkten Einfluss von MVP auf die Ursache der MDR (Mossink et al., 2002). Innerhalb der Knock-Out-Maus bleiben die Arzneistoffe im Vergleich zum Wildtyp normal verteilt und selbst eine Induktion der MVP-Expression in diesen Zellen änderte die Verteilung nicht (van Zon et al., 2004). Ebenso kann die Inhibition von MVP in Doxorubicin-resistenten Lungenkrebs-Zellen die Akkumulation des Wirkstoffes im Zellkern und die daraus folgende Chemosensitivität nicht wiederherstellen (Huffman und Corey, 2005). Die genaue Funktion von MVP bei der Multiple Drug Resistance ist aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse deshalb bislang noch nicht geklärt.

Neben der Beteiligung an der Chemoresistenz wurden Vaults auch mit intrazellulären Signalwegen in Verbindung gebracht. Durch Yeast-Two-Hybrid-Screens oder Immunpräzipitationen wurde MVP mehrfach als Interaktionspartner mit Bestandteilen von Signalkomplexen identifiziert (Yu et al., 2002; Kolli et al., 2004; Yi et al., 2005; Kim et al., 2006). Die Funktion von Vaults bei der intrazellulären Signalregulation wurde beispielsweise durch die Interaktion mit dem Tumorsuppressor Phosphatase PTEN gezeigt (Yu et al., 2002). PTEN ist an der Regulation des Zellzyklus direkt beteiligt (Chung und Eng, 2005) und besitzt vier putative, ungewöhnliche NLS, mit welchen PTEN Calcium-abhängig an MVP bindet und anschließend in den Zellkern importiert wird (Minaguchi et al., 2006). Bei der Mutation von mindestens zwei dieser NLS findet keine Interaktion zwischen MVP und PTEN statt und PTEN verbleibt im Zytoplasma. Somit ermöglicht MVP die nukleäre Tumor-Suppressor-Funktion von PTEN. Erst kürzlich wurde zudem gezeigt, dass nukleär lokalisiertes PTEN auch an der Aufrechterhaltung der Chromosomenstabilität beteiligt ist (Shen et al., 2007). Somit wirkt MVP auch indirekt chemisch induzierten DNA-Schäden entgegen, indem PTEN importiert werden kann.

Ein weiterer Zellsignalweg, der in Verbindung zu MVP steht, ist die EGFR-induzierte MAP-Kinase-Signalkaskade (Kolli et al., 2004). MVP kann an bestimmte Effektoren der EGFR-MAPK-Kaskade binden und diese somit regulieren. Die jeweiligen Bindungspartner von MVP bestimmen dabei, ob die Signalkaskade durch MVP positiv oder negativ beeinflusst wird (Kim et al., 2006; Berger et al., 2009).

Vaults werden auch in Zusammenhang mit der Immunabwehr gestellt. Eine Beteiligung von Vaults bei der Immunabwehr wurde durch den starken Anstieg der vRNA-Expression nach der Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus postuliert (Mrazek et al., 2007; Motsch et al., 2007). In Makrophagen und dendritischen Zellen wurden zudem hohe Expressionslevel von MVP nachgewiesen (Izquierdo et al., 1996; Schroeijers et al., 2002; Sunnaram et al., 2003). Eine Inhibition von MVP durch MVP-Antikörper äußerte sich hierbei in einer reduzierten Lebensdauer von dendritischen Zellen. In der MVP(-/-)-Knock-Out-Maus wurden jedoch keine vergleichbaren

Veränderungen nachgewiesen, was für speziesabhängige Unterschiede in den Mechanismen in der durch dendritische Zellen regulierte Immunabwehr spricht (Mossink et al., 2003).

Eine weitere zelluläre Aufgabe von MVP scheint in der Regulation des programmierten Zelltodes zu liegen. MVP ist in menschlichen seneszenten Fibroblasten und in gealterten Organen überexprimiert (Ryu et al., 2008). Durch Einsatz von MVP-siRNA konnte die Apoptose-Resistenz dieser Zellen aufgehoben werden. Vieles spricht für eine spezies- und zelltypabhängige Funktion von MVP, die sich erst im Laufe der Evolution entwickelt hat. Die jeweiligen Interaktionspartner von MVP definieren dabei die Art und Weise, wie MVP zelluläre Aufgaben übernimmt. In niederen Spezies wie dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* scheint MVP eine essentielle Rolle zu spielen. Das Ausschalten beider im Schleimpilz enthaltenen MVP-Gene führt zu starken Wachstums- und Morphologiedefekten (Vasu und Rome, 1995).

Erst kürzlich konnte in unserer Arbeitsgruppe überraschenderweise eine Beteiligung von MVP bei der Bildung der Kernporenkomplexe im zellfreien System, basierend auf *Xenopus laevis* Eiextrakt gezeigt werden (Dissertation Friederike Vollmar). Um Faktoren zu identifizieren, die an der Bildung von NPC's beteiligt sind, wurden verschiedene Membranfraktionen aus *Xenopus* Eiextrakt isoliert und es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe einer der Membranfraktionen zu porenlosen Kernen die Bildung von NPC's induzieren kann. Die unterschiedlichen Membranfraktionen wurden anschließend mit Hilfe von Immunblots mit verschiedenen Antikörpern analysiert. Nach einer 2D-gelelektrophoretischen Auftrennung und dem Vergleich der in den Membranfraktionen enthaltenen Proteine wurde ein Protein aus der poreninduzierenden Membranfraktion isoliert. Eine massenspektrometrische Untersuchung identifizierte dieses Protein überraschenderweise als das Major Vault Protein (Dissertation Friederike Vollmar).

## **2.18 Zielsetzung der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit war es, die Beteiligung von MVP bei der NPC-Bildung im zellfreien System von *Xenopus laevis* näher zu untersuchen. Bislang waren für MVP und Vault-Komplexe eine Vielzahl verschiedener zellulärer Funktionen postuliert worden, einige davon werden noch stark debattiert (siehe 2.17). Die Beteiligung von MVP bei der Bildung der NPC's stellt eine bislang noch unbekannt Funktion von MVP dar, die noch nicht untersucht wurde. Ausgangspunkt der Arbeit war dabei die Analyse der zuvor aus *Xenopus* Eiextrakt isolierten Membranfraktionen auf ihre jeweilige Rolle bei der Kernhüllenbildung. Hierbei sollten die Membranfraktionen und ihr Verhalten im zellfreien System durch fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Aufnahmen visualisiert werden. Um die Funktion von MVP bei der NPC-Bildung im zellfreien System zu analysieren, sollte ein MVP-Fusionsprotein verwendet werden, welches in Kombination mit den isolierten Membranfraktionen Aufschluss über die Beteiligung von MVP bei der

Kernhüllenbildung geben sollte. Daneben sollte die Verwendung von aufgereinigten Vault-Partikeln Erkenntnisse darüber liefern, inwiefern MVP bei der NPC-Bildung beteiligt ist. Ein weiteres wichtiges Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der bei diesem Prozess stattfindenden molekularen Mechanismen. Hierfür sollten durch die Verwendung des MVP-Fusionsproteins an artifiziellen Membranen und durch ultrastrukturelle Untersuchungen die an den Lipidmembranen stattfindenden Prozesse erforscht werden. Zudem sollten durch verschiedene Protein-Protein-Bindungsstudien zelluläre Interaktionspartner von MVP identifiziert werden. Hierbei war insbesondere die Interaktion von MVP mit für die NPC-Bildung notwendigen Proteinen Gegenstand der Untersuchung. Um die Funktion von MVP in *Xenopus laevis* näher zu untersuchen, sollte außerdem die zelluläre Verteilung von MVP in verschiedenen Geweben und Organen durch fluoreszenzmikroskopische und Immunblot-Analysen bestimmt werden. Zudem galt es, die Bedeutung von MVP bei der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* durch Mikroinjektionsversuche und der Inhibierung des MVP-Gens zu analysieren. Neben der Funktion von MVP war die Beteiligung des Mikrotubulinnetzwerkes bei der Bildung der NPC's und die dabei assoziierten Faktoren näher zu untersuchen. Durch die Verwendung von fluoreszierenden Mikrotubuliuntereinheiten und Membranfarbstoffen sollte die Kinetik der *Xenopus* Membranfraktionen in Bezug auf das Mikrotubulinetzwerk visualisiert werden. Ebenso war es das Ziel, die Interaktion von MVP und Mikrotubuli bei der MVP-vermittelten NPC-Bildung zu ermitteln und die daran beteiligten Motorproteine zu identifizieren.

### 3. Material

#### 3.1 Biologisches Material

##### 3.1.1 Versuchstiere

Der südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* wurde von einer französischen Tierfarm bezogen (Xenopus Express France, F-43270 Vernassal, [www.xenopus.com](http://www.xenopus.com)), oder wurde im Institut gezüchtet.

##### 3.1.2 Bakterienstämme

*E.coli* XL 1-Blue                      Stratagene, Heidelberg  
*E.coli* Rosetta™(DE3)pLys        Novagen, Darmstadt

##### 3.1.3 Zelllinien

PtK2:                      Diese Linie wurde von der Niere einer männlichen australischen Beutelratte (*Potorous tridactylis*) angelegt. Die epithelähnlichen Zellen wachsen adhärent und sind sehr flach.

##### 3.1.4 Antikörper

###### 3.1.4.1 Primärantikörper

Antigen	Herkunft	Verdünnung	Quelle
Nup62	polyklonal Meerschwein	IF: 1:1000	Ewald et al., 1997
Fibrillarin (72B9)	monoklonal Maus	IF: 1:25	Reimer et al., 1987
β-Tubulin	monoklonal Maus	IF: 1:200, IB: 1:1000	Sigma
MAb414	monoklonal Maus	IF: 1:100, IB: 1:5000	Hiss Diagnostics GmbH
MVP	monoklonal Maus	IF: 1:100, IB: 1:5000	Biotrend
xMVP	polyklonal Meerschwein	IF: 1:20, IB: 1:1000	Dissertation Dr. F. Vollmar
Histidin	monoklonal Maus	IB: 1:50	Quiagen
Eg5	polyklonal	IF: 1:200	Pr. Dr. T. U. Mayer
MKIP1	polyklonal	IF: 1:200	Pr. Dr. T. U. Mayer
MKIP2	polyklonal	IF: 1:200	Pr. Dr. T. U. Mayer

Tab. 3.1: Verwendete Primärantikörper

### 3.1.4.2 Sekundärantikörper

Antigen	Herkunft	Fluorophor/Enzym	Verdünnung	Quelle
Maus	Ziege	Texas-Red	IF: 1:100	Dianova
Maus	Ziege	Cy-2	IF 1:50	Dianova
Maus	Ziege	AMCA	IF: 1:100	Dianova
Maus	Ziege	Meerettich-Peroxidase	IB: 1:8000	Dianova
Meerschwein	Ziege	Texas-Red	IF: 1:100	Dianova
Meerschwein	Ziege	DTAF	IF: 1:25	Dianova
Meerschwein	Ziege	Meerettich-Peroxidase	IB: 1:8000	Dianova

Tab. 3.2: Verwendete Sekundärantikörper

## 3.2 Molekularbiologisches Material

### 3.2.1 Expressionsvektoren

pEYFP-Tub, Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg

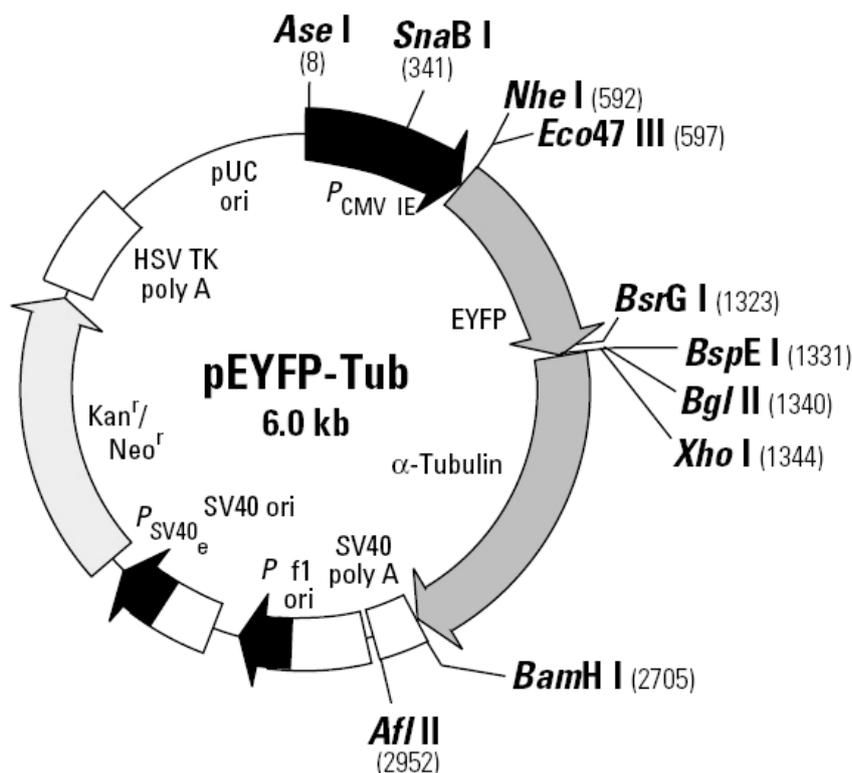


Abb. 3.1: Vektorkarte von pEYFP-Tub, Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg.

Der pEYFP-Tub-Vektor kodiert für ein Fusionsprotein bestehend aus dem Fluorophor EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) und menschlichem Alpha-Tubulin. EYFP ist die gelb-grüne Variante von GFP aus *Aequorea victoria* (Extinktions-Maximum bei 513 nm; Emissions-Maximum bei 527 nm). Durch die SV40-Region des Vektors wird ein Polyadenylierungs-Signal an das Transkript angefügt. Zur Selektionierung enthält der Vektor die Resistenzgene für Kanamycin und Neomycin. Der Vektor wurde designt, um das Fusionsprotein in Vertebraten-Zellen einzubringen. Es wird zusammen mit endogenen Tubulinuntereinheiten in Mikrotubuli eingebaut und ermöglicht so die Betrachtung von Mikrotubuli in lebenden und fixierten Zellen.

pDrive Cloning Vector, Qiagen, Hilden

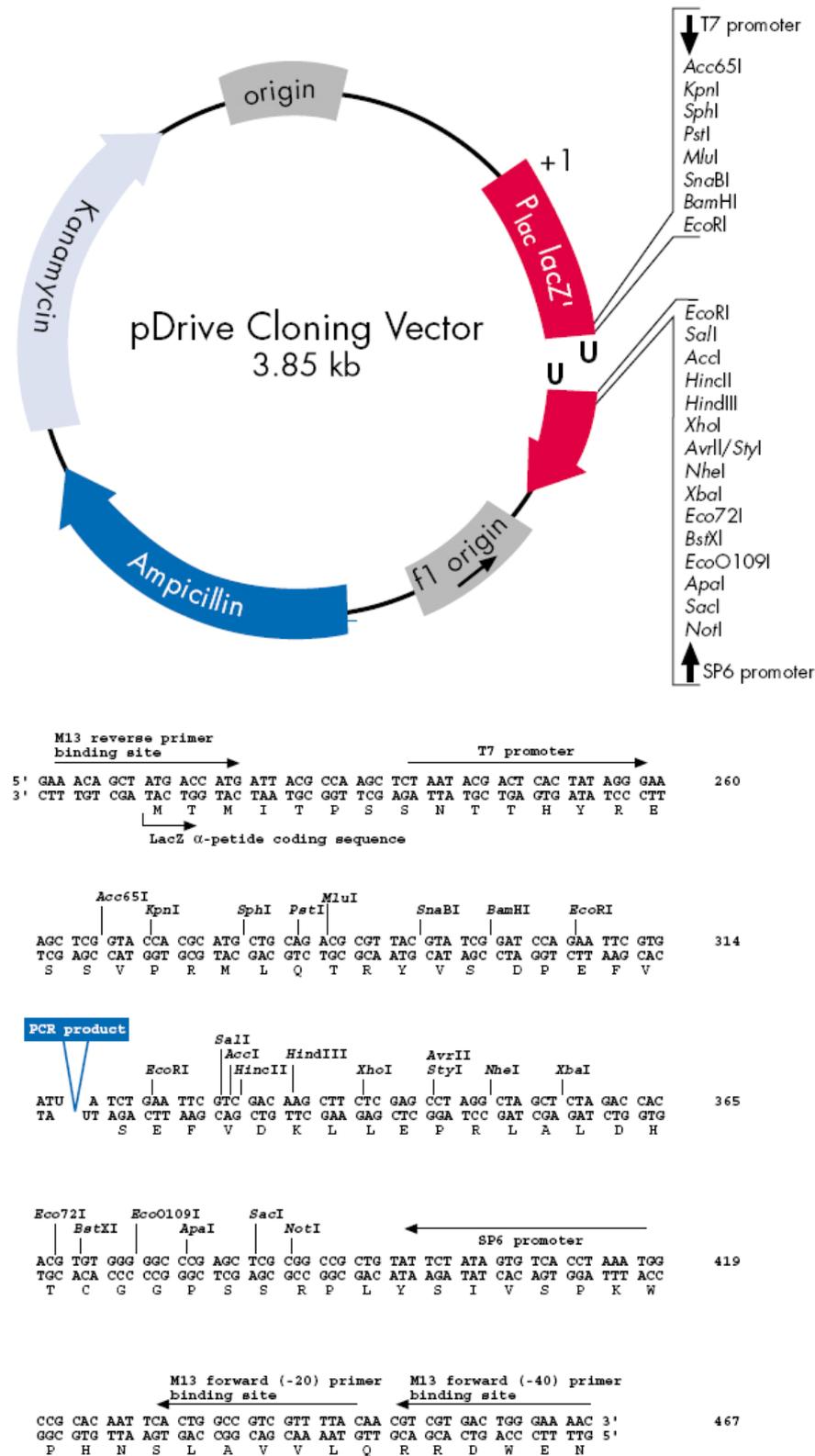
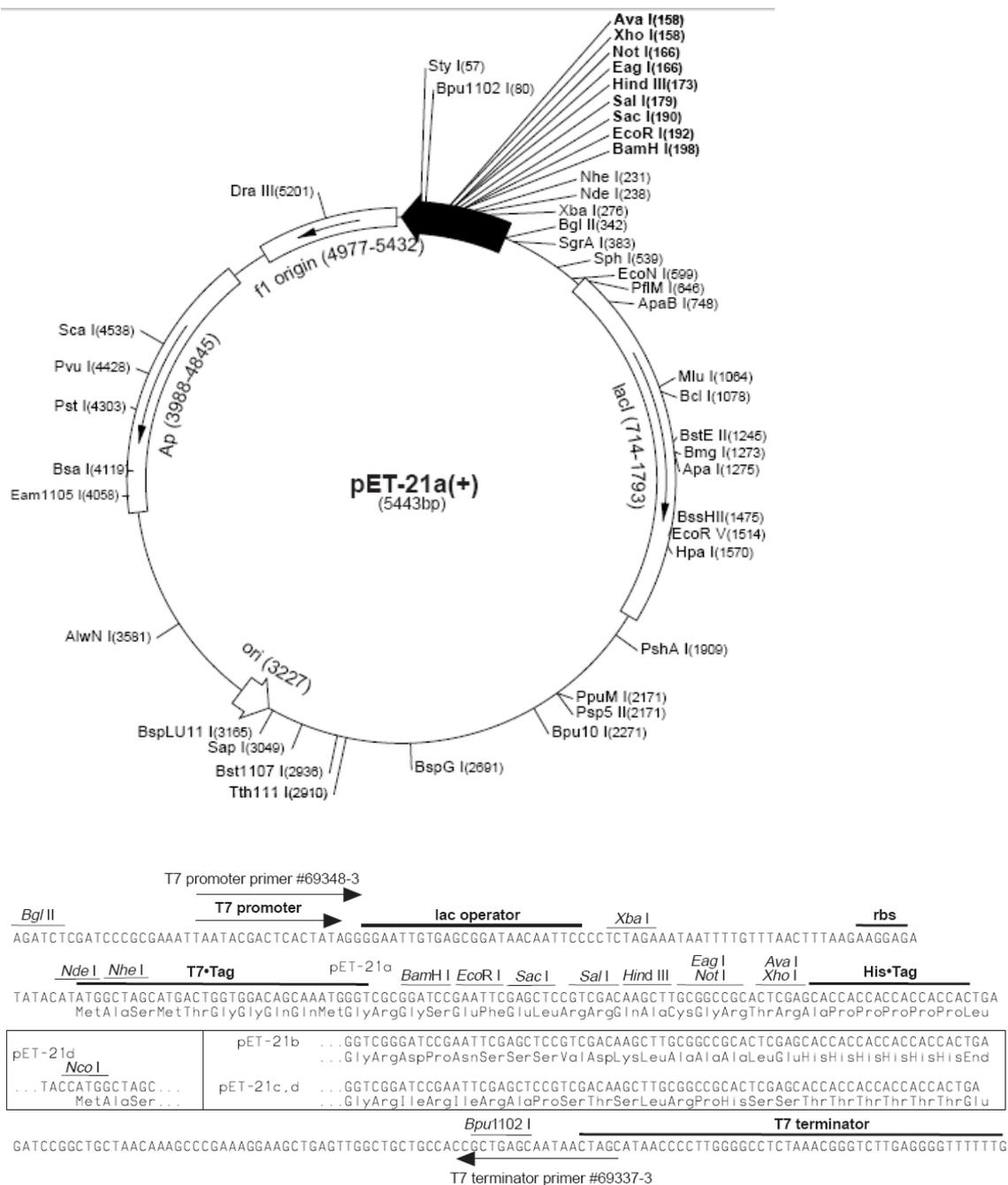


Abb. 3.2: Vektorkarte und Multiple Cloning Site (MCS) von pDrive Cloning Vektor, Qiagen, Hilden

Dieser Vektor ist Bestandteil des PCR Cloning Kits der Firma Qiagen. Er wurde für eine Klonierung von PCR-Produkten durch Adenosin-Überhänge (AT-Cloning) konzipiert. Zur

Selektion der positiven Klone enthält dieser Vektor neben dem Lac-Operon, das eine Blau-Weiss-Selektion transformierter Bakterienklone ermöglicht, eine Ampicillin- und eine Kanamycinkassette.

**pET-21a(+), Novagen, Darmstadt**



**Abb. 3.3:** Vektorkarte und MCS des pET-21a(+)-Vektors, Novagen, Darmstadt.

Durch den pET-21a(+)-Vektor können Fusionsproteine aus einem PCR-Produkt mit einem C-terminalen His-Tag, bzw. einem N-terminalen T7-Tag erstellt werden. Über eine 5'-Klonierung mit der Restriktionsstelle NdeI lässt sich der N-terminale T7-Tag entfernen. Die Selektion von positiven Klonen erfolgt über die Resistenzgene für Ampicillin und die Blau-Weiss-Selektion über das Lac-Operon.

### 3.2.2 Enzyme

Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase	Finnzymes, Frankfurt/Main
Taq-DNA-Polymerase	Institutseigene Herstellung
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsenzyme, div.	MBI Fermentas, St. Leon-Rot; New England Biolabs Frankfurt/Main

### 3.2.3 Oligonukleotide

Die für die DNA-Amplifikationen und Sequenzierungen verwendeten Oligonukleotide wurden bei der Firma Thermo Electron GmbH (Ulm) in Kartuschen-reiner Qualität bezogen.

Bezeichnung	Sequenz
Yfp-Tub-NdeI-5'	5'- AACATATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG -3'
Yfp-Tub-HindIII-3'	5'- GGTGAGGAAGAAGGAGAGGAATACAAGCTTAA - 3'
Kolonie-PCR-1-3'	5'- CAAGTTTGACCTGATGTATGCC -3'
Kolonie-PCR-2-3':	5'- CCTACACTAACCTTAACCGCCT -3'
Seq1-5'	5'- CAACTACAAGACCCGCGC -3'
Seq2-3'	5'- ACCATTGGGGGAGGAGAT -3'
Seq3-5'	5'- GAGCTCTACTGCCTGGAACAC -3'
Seq4-5'	5'- GAATTCGCAAGCTGGCTG -3'
Seq5-3'	5'- TGCCACCATCAAACCAAG -3'
Seq6-5'	5'- GAGTTCGTGACCGCCGC -3'

Tab. 3.3: Verwendete Oligonukleotide

### 3.2.4 Größenstandards

Lambda DNA/EcoRI+HindIII, Marker 3	MBI Fermentas , St. Leon-Rot
Precision Plus Protein™ Standards, Dual Color	Bio-Rad, München
High Range SDS-Page Standards	Bio-Rad, München
Low Range SDS-Page Standards	Bio-Rad, München

### 3.2.5 Kits und Kitbestandteile

ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Amersham ECL™ Advance Western Blotting Detection Kit	Amersham, Braunschweig
E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Effectene™ Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Lipofectamine™ Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
Protein G Sepharose	Amersham, Braunschweig
PCR-Cloning Kit	Qiagen, Hilden

### 3.3 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden, wenn im Text nicht anders vermerkt, von den Firmen Applichem (Darmstadt), Calbiochem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Fluka (Berlin) oder Sigma (Deisenhofen) in Analysenqualität bezogen. Ethanol und Methanol wurden für die Wasch- und Entfärbelösungen in technischer Qualität verwendet.

### 3.4 Geräte

Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank, CO <sub>2</sub> -Auto-Zero	Heraeus-Holding, Hanau
Cytospin 2-Zentrifuge	Shandon, Frankfurt
Drehtisch, regelbar	Heidolph, über Hartenstein, Würzburg
Eismaschine AF10	Scotsman, über Hartenstein, Würzburg
Elektronenmikroskop Zeiss EM10	Zeiss, Oberkochen
Elektrophoresesystem für Minigele	BIO-RAD, München
Feinwaage AC100	Mettler, Gießen
Feinwaage H110	Sartorius, Göttingen
Flachbettscanner Perfection V700 Photo	Epson
Fluoreszenzmikroskop Axiophot	Zeiss, Oberkochen
Stereo HB 050 mit Quecksilberlampe	
Gefriermikrotom 2800 Figocut E	Reichert-Jung
Graphit-Blotkammer	LMS, über Hartenstein, Würzburg
Heizblock	Liebisch, über Hartenstein, Würzburg
Kippschüttler WS5	Edmund Bühler, Tübingen
Kühlschrank	Liebherr
Kühlzentrifuge Minifuge RF und GL	Heraeus-Christ, Osterode
Kühlzentrifuge RC 5B	Sorvall, Du Pont, Bad Homburg
Laborwaage PB 3002 Delta Range	Mettler, Gießen
Magnetrührer M 23	GLW, Würzburg
Magnetrührer Model L-81	Labinco, über Hartenstein, Würzburg
Mikroinjektor Femto Jet express	Eppendorf, Hamburg
Mikromanipulator	Brinkmann, Mannheim
Mikroplatten-Reader	Tecan Infinite® M200
Mikroschmiede De Fonbrune	Bachofer, Reutlingen
pH-Meter pH 525	WTW, über Hartenstein, Würzburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg

Proteingelkammer PerfectBlue Twin S	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Proteingelkammer Mini V8	Gibco BRL
Schüttler Certomat R und S B.	Braun Biotech international, über Hartenstein, Würzburg
Schwenktisch 3013	GLF, über Hartenstein, Würzburg
Sequenzierer ABI PRISM™ 310	Applied Biosystems GmbH,
Sonifier B12	Branson Ultrasonics Corperation, Danbury, über Gerhard Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Sonifier 250	Branson Ultrasonics Corperation, Danbury
Stabilisierte Netzgeräte	Fischer, Heidelberg und Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Stereomikroskop Wild M8	Leica, Heidelberg
Thermocycler	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Thermocycler Gradient	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Tiefkühlschrank (-20°C)	Privileg, Quelle
Tiefkühltruhe (-70°C) C585	New Brunswick Scientific
Tischzentrifuge 5415 R, kühlbar	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Hettich, über Hartenstein, Würzburg
Ultramikrotom Microm HM500 OM	Zeiss
Ultramikrotom RMC	Tuson, USA
Ultraschall-Bad 2200	Branson Ultrasonics Corperation, Danbury
Ultrazentrifuge L7-80	Beckmann Inc., Fullerton, USA. Deutsche Vertretung, München
Umkehrmikroskop IM 35	Zeiss, Oberkochen
UV-Transilluminator Typ IL-350.M	Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
Vortexer L46	GLW, über Hartenstein, Würzburg
Wasserbad WNB22	Memmert GmbH, Schwabach
Wasserbad WTH 500	Köttermann, über Hartenstein, Würzburg

## 4 Methoden

### 4.1 Mikrobiologische Methoden

#### 4.1.1 Flüssigkultur von Bakterien

##### *Lösungen:*

LB-Medium 1 L:	10 g Bacto™ Trypton (Applichem) 5 g Hefeextrakt (Roth) 10 g NaCl ⇒ pH 7,5 (NaOH) ⇒ autoklavieren
TB-Medium 4,5 L:	60 g Trypton 120 g Hefeextrakt 20 mL Glycerin ⇒ autoklavieren
10 x pi-Lösung 1 L:	23,14 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 125,41 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ⇒ autoklavieren
Antibiotika-Stammlösungen:	100 mg/mL Ampicillin in H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> 50 mg/mL Kanamycin in H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> 15 mg/mL Tetracyclin in EtOH (100 % p.a.)

##### *Durchführung:*

Für eine Übernachtskultur (ÜNK) wurden 7 mL LB-Medium in ein 15 mL Falcon-Röhrchen gefüllt. Zur Selektion des verwendeten Bakterienstammes wurde jeweils das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Ampicillin wurde in einer Endkonzentration von 100 µg/mL, Kanamycin in einer Endkonzentration von 50 µg/mL und Tetracyclin in einer Konzentration von 15 µg/mL eingesetzt. Um die mit Antibiotika versetzte Lösung mit dem jeweiligen Bakterienstamm anzupflanzen, wurden von einer Glycerinkultur mit einer keimfreien Pipettenspitze Bakterienzellen übertragen. Die angeimpfte Lösung wurde nun über Nacht mit 200 rpm bei 37°C geschüttelt. Wurden große Expressionsvolumina benötigt, so wurde zunächst eine Übertag-Kultur angeimpft. Diese entsprach einer Übernachtskultur, nur wurden anstatt 7 mL LB-Medium nur 2 mL angeimpft. Mit dieser Übertag-Kultur wurde dann eine großvolumige ÜNK angeimpft, die aus 216 mL TB-Medium, 24 mL 10 x pi-Lösung und der entsprechenden Endkonzentration Antibiotika bestand. Die Inkubation erfolgte bei 200 rpm und 37°C ÜN.

#### 4.1.2 Bestimmung der Bakteriendichte einer Flüssigkultur durch photometrische Messung

Um die Zelldichte einer Bakterienlösung zu jedem beliebigen Zeitpunkt festzustellen, wurde der Extinktionskoeffizient bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Besitzt die Messküvette eine Dicke von 1 cm, so entspricht der Wert der optischen Dichte (OD) von 1 in etwa  $8 \times 10^8$  Zellen pro Millimeter. Der Referenzwert wurde mit sterilem Selektionsmedium festgesetzt.

### 4.1.3 Glycerinkultur

Um Bakterienzellen über einen längeren Zeitraum sicher aufzubewahren, wurden Glycerinkulturen hergestellt. Dabei wurden 900  $\mu\text{L}$  einer Flüssigkultur mit 100  $\mu\text{L}$  sterilem Glycerin vermischt und bei  $-70^\circ\text{C}$  in einem 1 mL Reaktionsgefäß aufbewahrt. Um aus solch einer Glycerinkultur eine Flüssigkultur herzustellen, wurde mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze über die Glycerinkultur gestrichen und diese in die vorbereiteten Selektionsmedien überführt.

### 4.1.4 Herstellung von Agar-Selektionsplatten

Für die Herstellung von Agarplatten wurde 1% (w/v) Agar-Agar (Roth) in LB-Medium beigemischt und das Gemisch autoklaviert. Nach dem Abkühlen der Lösung auf etwa  $50^\circ\text{C}$  wurde das gewünschte Antibiotikum dazugegeben. Die Endkonzentration von Ampicillin lag hierbei bei  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ , die von Kanamycin bei  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$  und bei Tetracyclin bei einer Konzentration von  $15 \mu\text{g}/\text{mL}$ . Die so vorbereitete Lösung wurde anschließend in sterile Petrischalen gegossen und zum Auspolymerisieren bei Raumtemperatur stehen gelassen. Um zu verhindern, dass sich Kondenswasser auf dem Boden der Agarplatten sammeln konnte, wurden die Petrischalen nach dem Auspolymerisieren mit der Öffnung nach unten gestellt. Nach etwa 6 h waren die Agarplatten getrocknet und konnten bei  $4^\circ\text{C}$  für etwa 4 Wochen bis zur Benutzung gelagert werden.

Um Bakterienzellen auf den vorbereiteten Agarplatten wachsen zu lassen, wurde auf je einer Platte 100  $\mu\text{L}$  Bakterienkultur mit Hilfe eines zuvor abgeflammtten Drygalski-Spatels gleichmäßig verteilt und die Platte anschließend mit dem Deckeln nach unten bei  $37^\circ\text{C}$  über Nacht inkubiert, um ein Ansammeln von Kondenswasser auf dem Agar zu verhindern.

### 4.1.5 Herstellung von chemisch kompetenten Bakterien

Damit Bakterien Vektoren aus dem sie umgebenden Milieu aufnehmen können, müssen sie dafür kompetent sein. Besitzt das Bakterium diese Kompetenz nicht, so kann diese durch eine chemische Modifikation ihrer äußeren Zelldoppelmembran eingebracht werden (Chung et al., 1989).

*Lösungen:*

LB-Medium (siehe 4.1.1)

TSS (Transformation and Storage Solution): LB-Medium  
+ 10 % (w/v) PEG 3350  
+ 5 % (v/v) DMSO  
+ 50 mM  $\text{Mg}^{2+}$  ( $\text{MgSO}_4$  oder  $\text{MgCl}_2$ )  
⇒ pH 6,5  
⇒ sterilfiltrieren und aliquotiert lagern bei  $-20^\circ\text{C}$

Tetracyclin:  $15 \text{ mg}/\text{mL}$  in EtOH (100 % p.a.)

*Durchführung:*

Mit Hilfe eines abgeflammtten Drygalski-Spatels wurde der gewünschte Bakterienstamm auf eine Agar-Selektionsplatte ausgestrichen und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  mit dem Deckel nach unten inkubiert. Am folgenden Tag wurde eine ÜNK mit einer gepickten Einzelkolonie der Selektionsplatte angeimpft. Mit 2 mL der ÜNK wurden am nächsten Morgen 200 mL LB-Medium

mit der entsprechenden Endkonzentration zugehörigem Antibiotika angeimpft und bei 200 rpm und 37°C bis zu einer OD von 0,6 vermehrt. Anschließend wurden die Bakterienzellen bei 1000 x g und 4°C für 10 min. abzentrifugiert und das Zellsediment in  $1/40$  Volumen eisgekühltem TSS aufgenommen. Nach dem Resuspendieren des Sediments wurde das Gemisch zu je 100 µL in vorgekühlte 1 mL Reaktionsgefäße aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die nun kompetenten Bakterien konnten bei -70°C für mehrere Wochen bis zur Verwendung aufbewahrt werden.

#### 4.1.6 Bestimmung der Kompetenz

Die Bakterien, die nach einer Transformation mit Plasmid-DNA Kolonien bilden, werden als *colony forming units* (cfu) bezeichnet. Teilt man nun die Anzahl der cfu durch die Menge an eingesetzter Plasmid-DNA in Mikrogramm, so ergibt sich ein Wert, der im Idealfall zwischen  $10^7$  und  $10^9$  cfu/µg liegen sollte. In einer Testreihe wurden je 10, 100 und 1000 pg eines Kontrollvektors (pUC18-Vektor) in die Bakterien transformiert (siehe 4.1.7) und der Ansatz auf einer Agar-Selektionsplatte ausgestrichen. Am nächsten Tag wurden die gewachsenen Einzelkolonien gezählt und somit die Transformationsrate für 1 µg des Kontrollvektors berechnet.

#### 4.1.7 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

Für einen Transformationsansatz wurden 100 µL kompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde die gewünschte Plasmid-DNA zu den Bakterien gegeben und der Ansatz für 1 h auf Eis inkubiert. Nach einem 42°C Hitzeschock für 70 sek. folgte eine weitere Inkubation für 2 min. auf Eis. Zu den Bakterienzellen wurde nun 900 µL LB-Medium ohne Antibiotika zugefügt und der Ansatz für 1 h bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Während dieses Zeitraums bauen die Bakterien ihre spezifische Resistenz auf. In der Zwischenzeit werden zwei Agar-Selektionsplatten mit dem zu den Bakterien passenden Antibiotikum bei 37°C vorinkubiert. Auf eine der beiden Selektionsplatten werden 100 µL des Transformationsansatzes mit Hilfe eines abgeflamten Drygalski-Spatels ausplattiert. Der restliche Ansatz wird für 5 min. bei 7.000 x g sedimentiert und der Überstand bis auf 100 µL abgenommen. Das Bakteriensediment wird nun mit den verbleibenden 100 µL resuspendiert und auf der zweite Selektionsplatte ausplattiert. So erhält man eine Platte mit einer  $1/10$ -Verdünnung und eine Platte mit einer  $9/10$ -Verdünnung des Transformationsansatzes, was aufgrund zweier unterschiedlicher Wachstumsdichten für das spätere Picken eines Klons von Vorteil sein kann. Beide Selektionsplatten werden zum Wachstum der Kolonien über Nacht bei 37°C mit dem Deckeln nach unten inkubiert.

### 4.2 Molekularbiologische Methoden

#### 4.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA wurde mit dem E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid MiniPrep Kit I der Firma Peqlab Biotechnologie GmbH nach Herstellerprotokoll ausgehend von 10 mL Übernachtskultur durchgeführt. Vor der Isolierung der DNA werden die Bakterienzellen über eine alkalische Lyse aufgeschlossen und die DNA anschließend unter Hochsalzbedingungen an eine Silikagel-Matrix absorbiert. Die Elution der aufgereinigten Plasmid-DNA erfolgte danach über 50 µL ddH<sub>2</sub>O und erbrachte Konzentrationen von 100- 300 ng/µL.

#### 4.2.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Ausbeute an isolierter DNA wurde durch Absorptionsmessung photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt, bei welcher Nukleinsäure ihr Absorptionsmaximum besitzt. Eine OD von 1 entspricht dabei bei dsDNA 50 µg/mL. Durch das Verhältnis der gemessenen optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 und 280 (OD<sub>260</sub> bzw. OD<sub>280</sub>) erhält man außerdem Auskunft über die Reinheit der Nukleinsäure, da das Absorptionsmaximum von Proteinen bei OD<sub>280</sub> liegt. Über das Verhältnis von OD<sub>230</sub> und OD<sub>260</sub> kann man die Verunreinigung mit aromatischen Verbindungen, Phenol, Peptiden oder Kohlenhydraten messen. Im Folgenden sind die bei einer OD von 1 zu erwartenden Konzentrationen verschiedener Nukleinsäuren und deren erforderliche Reinheiten dargestellt.

	Konzentration bei OD <sub>260</sub> = 1	OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>	OD <sub>260</sub> /OD <sub>230</sub>
dsDNA	50 µg/mL	1,8	2,2
ssDNA	37 µg/mL	1,8	2,2
RNA	40 µg/mL	2,0	2,2
Oligonukleotide	30 µg/mL	1,8	2,2

Tab. 4.1: Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

#### 4.2.3 Herstellung von Oligonukleotid-Primern

Bei der Wahl einer geeigneten Nukleotidsequenz eines Primers muss auf mehrere wichtige Faktoren geachtet werden. Ein entscheidendes Kriterium ist die Länge der Primersequenz. Mit der Länge der Sequenz wächst die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) des Primers linear an.  $T_m$  gibt an, bei welcher Temperatur die Hälfte der komplementären Nukleotidsequenzen in der Lösung als Doppelstrang vorliegen. D.h. unterhalb der spezifischen Schmelztemperatur kann der Primer mit seiner DNA-Matrize hybridisieren, über der Schmelztemperatur löst sich der Primer ab. Ist  $T_m$  zu hoch, können die verwendeten Enzyme denaturieren, ist  $T_m$  zu niedrig, so häufen sich unspezifische Bindungen an nicht-homologe Sequenzen.

Neben der Primer-Länge ist die Nukleotid-Zusammensetzung ebenfalls entscheidend für die spezifische Schmelztemperatur. Da G/C-Basenpaarungen durch drei Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden, T/A-Basenpaarungen jedoch nur über zwei, sind G/C-Basenpaarungen thermo-dynamisch stabiler. Die Schmelztemperatur nimmt also mit der Anzahl an G-Nukleotiden und C-Nukleotiden zu.

$T_m$  lässt sich über folgende Formel ermitteln:

$$T_m = 4 \sum (G,C) + 2 \sum (A,T) - 5$$

Um ein PCR-Produkt in einen Klonierungsvektor zu inserieren, wurden an den vorgesehenen Enden der Primer geeignete Schnittstellen für spezifische Restriktionsenzyme angehängt. Außerdem wurden nach der Schnittstelle noch je 2 Adenin-Basen angehängt, um ein fehlerfreies Einsetzen der Restriktionsenzyme zu gewährleisten.

Alle Primer wurden mit der Software *Oligo* designt, wobei besonders darauf geachtet wurde, dass die Primer nicht mit sich selbst hybridisieren oder an andere Primer binden können. Außerdem wurden die Sequenzen so gewählt, dass sich keine Haarnadelstrukturen ausbilden und dass die komplementäre Sequenz in der eingesetzten DNA nur einmal vorkommt. Die gewählten Nukleotidsequenzen wurden bei der Firma Thermo Elektron GmbH in Ulm bestellt und in Kartuschen-gereinigter Qualität geliefert.

#### 4.2.4 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um einen spezifischen DNA-Abschnitt in großer Zahl zu vervielfältigen, wurde die 1985 von Kary Mullis erfundene (Saiki et al., 1985) PCR verwendet. Die zu vervielfältigende Sequenz wird dabei durch Oligonukleotid-Primer festgelegt. Die Entdeckung einer thermostabilen DNA-Polymerase in Archaeobakterien (z.B. *Thermus aquaticus*; Chien et al. 1976) ermöglichte die Erweiterung des enzymatischen Wirkungsgrades *in vitro* auf 96°C. Bei diesen Temperaturen kann doppelsträngige DNA in zwei Einzelstränge getrennt werden. Die thermostabilen Polymerasen können bei einer PCR zyklisch DNA-Einzelstränge synthetisieren und mit den Produkten jedes Zyklus eine exponentielle Vervielfältigung spezifischer Sequenzen erreichen. Neben den Oligonukleotid-Primern benötigt die Polymerase noch Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), welche den neu synthetisierten DNA-Strang bilden. Ein einzelner Zyklus gliedert sich in drei Schritte:

1. *Denaturierung* (Melting) der doppelsträngigen DNA bei 94-95°C durch Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen. Meist wird zu Beginn des ersten Zyklus die DNA für einige Minuten erhitzt (initiale Denaturierung), um sicherzustellen, dass sowohl die Ausgangs-DNA als auch die Primer vollständig voneinander getrennt sind und nur noch Einzelstränge vorliegen.
2. *Primerhybridisierung* (Annealing) der überschüssig vorliegenden Oligonukleotid-Primer bei der spezifischen Annealing-Temperatur (50- 65°C). Die genaue Temperatur wird über die Primerlänge und den G/C-Gehalt bestimmt (siehe 4.2.3). Die Primer bilden dabei das 5'-Ende der neu zu synthetisierenden Komplementärstränge.
3. *Elongation* (Verlängerung) des komplementären Tochterstranges mit dNTP's durch die DNA-Polymerase bei 72°C. Die Primer bilden dabei den Anfang des neuen Einzelstranges. Da die jeweiligen Produkte eines Zyklus ihrerseits wieder Matrize für weitere Strangsynthese liefern, verläuft die PCR exponentiell. In der Praxis wird jedoch nach 25-35 Zyklen die Reaktion abgebrochen, da sich auch kürzere Fragmente als die gewünschte Ziel-DNA anhäufen würden.

##### *Durchführung:*

Um mit einer PCR spezifische DNA-Fragmente zu vervielfältigen, wurde entweder die Taq-Polymerase der Firma Promega oder die High Fidelity Polymerase Phusion der Firma Finnzymes verwendet. Die Syntheseleistung der Taq-Polymerase beträgt dabei etwa 1000 Basen pro Minute, die der Fusion-Polymerase 1000 Basen pro 15-30 Sekunden. Im Gegensatz zur Taq-Polymerase besitzt die Phusion-Polymerase zudem eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, um eventuelle Fehler zu korrigieren. Es handelt sich hierbei um eine Polymerase-Art aus *Pyrococcus furiosus* (Pfu-Polymerase), an welche eine spezifische ds-DNA-Bindedomäne angefügt ist, die somit die Affinität zu doppelsträngiger DNA erhöht.

Alle beschriebenen PCR-Ansätze wurden jeweils auf Eis in einem 0,5 mL PCR-Reaktionsgefäß zusammen pipettiert, wobei die DNA-Polymerase zum Schluss hinzugefügt wurde. Nach gründlichem Vermischen wurde der Ansatz abzentrifugiert und direkt in den Thermocycler platziert.

Um die exakte Annealing-Temperatur der Primer zu ermitteln, wurde zunächst ein PCR-Ansatz im Gradienten-Cycler durchgeführt, wobei verschiedene Temperaturen ausgewählt werden können.

*Pipettierschema für den Mastermix für 7 Ansätze a 25 µL:*

21 µL	Template-DNA	5-100 ng
35 µL	Phusion-HF-Puffer (5 x)	Finnzymes
1,4 µL	Phusion-Polymerase	2 <sup>U</sup> /µL, Finnzymes
3,5 µL	dNTP-Mix	10 mM SL je Nukleotid, MBI
3,5 µL	5'-Primer	10 <sup>pmol</sup> /µL SL, Thermo Fisher
3,5 µL	3'-Primer	10 <sup>pmol</sup> /µL SL, Thermo Fisher
2,625 µL	DMSO (1,5%)	
auf 175 µL mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen		

Im Thermocycler wurde folgendes PCR-Programm programmiert:

6 Schritte als Temperaturgradient im Gradienten-Cycler:

1	2	3	4	5	6
55,9°C	58,1°C	60,6°C	62,8°C	65,7°C	68,2°C

Mittlere Temperatur: 62,5°C

initiale Denaturierung	98°C	1 min.	35 Zyklen
Denaturierung	98°C	20 sek.	
Annealing	62,5°C Gradient	15 sek.	
Elongation	72°C	35 sek.	
Finale Elongation	72°C	7 min.	
Kühlung auf 4°C			

Die Auswertung der PCR-Produkte erfolgte im 1%igen Agarose-Gel (siehe 4.2.6)

Da die Taq-Polymerase die Fähigkeit besitzt, am 3'-Ende des PCR-Produktes Adenosin-Überhänge anzufügen, wurde nach der PCR mit der Phusion-Polymerase eine PCR mit den aus dem Agarosegel extrahierten Banden (siehe 4.2.7) durchgeführt.

*Pipettierschema eines PCR-Ansatzes für die Taq-Polymerase (50 µL):*

40 µL	Template-DNA (aus Gelextraktion)	5-100 ng
5 µL	Taq-Puffer (10x)	Promega
0,5 µL	Taq-Polymerase	3 <sup>U</sup> /µL, Promega
1 µL	dNTP-Mix	10 mM SL je Nukleotid, MBI
3µL	MgCl <sub>2</sub>	
auf 50µl mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen		

Zum Anfügen der Adenosin-Überhänge wurde der Ansatz in den Thermocycler für 10 min. bei 72°C inkubiert.

Anschließend konnte der Ansatz bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert werden.

#### 4.2.5 Kolonie-PCR

Um zu überprüfen, ob DNA-Fragmente erfolgreich in Klonierungsvektoren ligiert wurden, kann man die auf einer entsprechenden Selektionsplatte gewachsenen Bakterienkolonien direkt als Ausgangs-DNA für einen PCR-Ansatz verwenden. Neben dem Nachweis, ob sich das DNA-Fragment im Klonierungsvektor befindet, kann auch getestet werden, ob das DNA-Fragment in der gewünschten Orientierung vorliegt. Durch die Bindung spezifischer Vektor-Primer außerhalb bzw. innerhalb des Inserts kann die Orientierung des DNA-Fragments festgestellt werden (5'-Primer bindet an einen flankierenden Bereich des Vektors und 3'-Primer innerhalb der Insert-Sequenz oder umgekehrt).

*Pipettierschema für eine Kolonie-PCR (25 µL Ansatz):*

1 gepickte Bakterienkolonie als DNA-Ausgangsmaterial

0,1 µL	Taq-Polymerase	5 <sup>U</sup> /µL, institutseigen
0,5 µL	Taq-Puffer (10x)	institutseigen
0,2 µL	5'-Primer	10 <sup>pmol</sup> /µL, biomers.net GmbH
0,2 µL	3'-Primer	10 <sup>pmol</sup> /µL, biomers.net GmbH
0,1 µL	dNTP-Mix	10 mM SL je Nukleotid, MBI
0,3 µL	MgCl <sub>2</sub>	
auf 25 µL mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen		

Der Ansatz wurde als Mastermix für die entsprechende Anzahl zu untersuchender Bakterienkolonien angesetzt und anschließend zu je 25 µL auf 0,5 mL PCR-Reaktionsgefäße verteilt. Anschließend wurden mit einer sterilen Pipettenspitze von den auf der Selektionsplatte gewachsenen Bakterienkolonien einzelne Kolonien gepickt und in jeweils einem vorgelegten PCR-Ansatz resuspendiert. Die Pipettenspitze diente außerdem zum Animpfen einer ÜNK (siehe 4.1.1) der jeweilig gepickten Klone, um bei korrekt ligierten DNA-Fragmenten am folgenden Tag sofort mit den passenden Klonen weiterarbeiten zu können.

*Programm einer Kolonie-PCR:*

initiale Denaturierung	96°C	2 min.	25 Zyklen
Denaturierung	96°C	30 sek.	
Annealing	50°C	30 sek.	
Elongation	72°C	140 sek.	
Finale Elongation	72°C	2 min.	
Kühlung auf 4°C			

Die Auswertung der PCR-Produkte erfolgte im 1%igen Agarose-Gel (siehe 4.2.6).

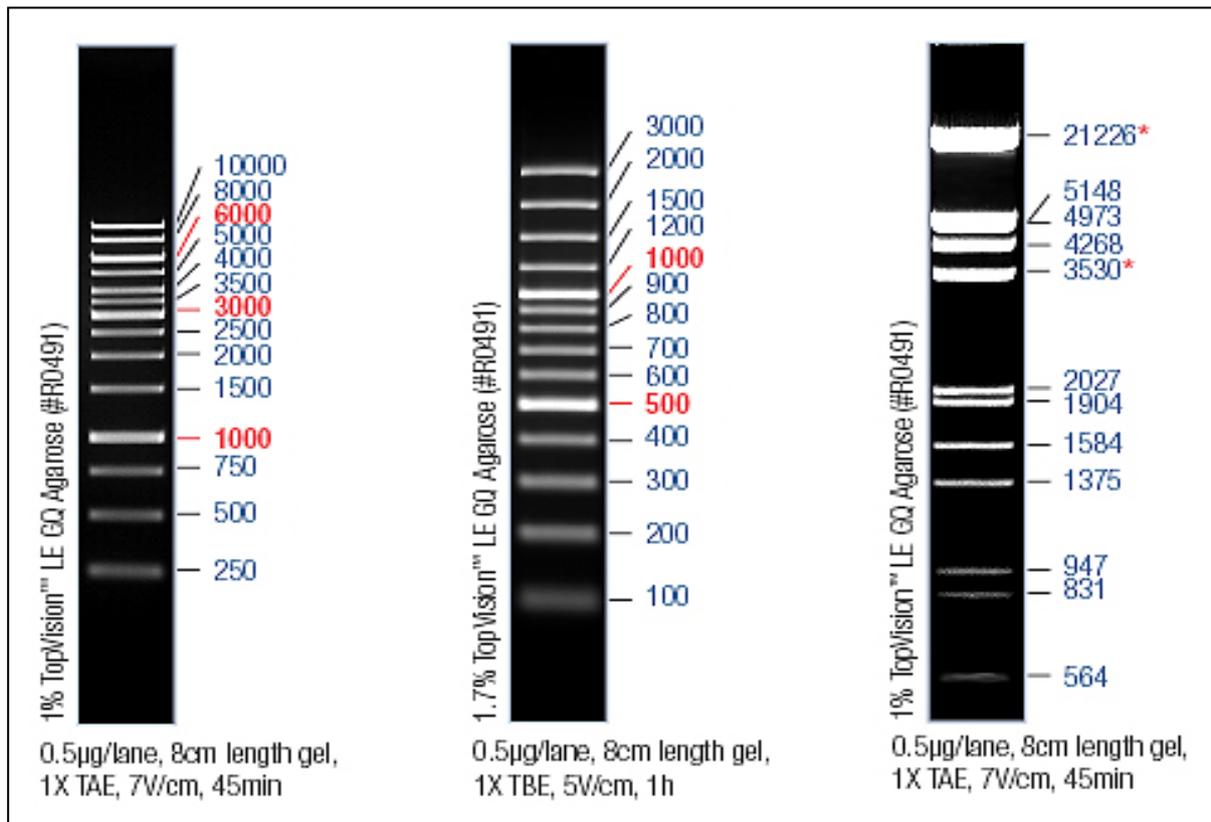
#### 4.2.6 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese

Verschiedene Nukleinsäurefragmente können in einem Agarose-Gel anhand ihrer Basenlänge aufgetrennt werden. Da die Nukleotide über Phosphodiesterverbindungen miteinander verknüpft sind, trägt die Nukleinsäure eine negative Nettoladung. Deshalb wandern DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld stets zur positiv geladenen Anode. Die Gelmatrix bildet Agarose, ein Polysaccharid aus D-Galaktose mit glykosidisch verbundener 3,6-Anhydro-L-Galactose. Agarose wird vor allem aus den Rotalgengattungen *Gelidium* und *Gracillaria* gewonnen. Die Agarosekonzentration innerhalb des Gels wird je nach Molekülgröße festgelegt. Hierbei kann zwischen niedrigen Konzentrationen 0,3-0,7% Agarose (scharfe Auftrennungsgrenzen für große DNA-Fragmente von 5- bis 50 kb Größe) und hohen Konzentrationen von 1-2% Agarose (scharfe Auftrennungsgrenze für kleine DNA-Fragmente von 0,2-10 kb Größe) gewählt werden. Die Agarose wird in Elektrophoresepuffer gelöst und polymerisiert zu einem Gel.

##### Lösungen:

20-fach SB-Puffer (Brody et al., 2004) 1 L:	200 mM	NaOH
	650 mM	Borsäure
	⇒ pH einstellen auf 8,5	
50-fach TAE-Puffer 1 L:	2 M	Tris-HCl
	1 M	Eisessig
	50 mM	EDTA
5-fach TBE-Puffer 1 L:	445 mM	Tris-HCl
	445 mM	Borsäure
	10 mM	20 mL 0,5 M EDTA
	⇒ pH einstellen auf 8,0	
6-fach DNA-Ladepuffer:	10 mM	Tris-HCl pH 7,6
	60 mM	EDTA
	60%	Glycerin
	0,03%	Bromphenolblau
	0,03%	Xylencyanol
Bromphenolblau wandert im 1%igen Agarosegel bei einer Höhe von 300 bp, Xylencyanol bei 4.000 bp.		
Laufpuffer (1-fach SB-Puffer)		
Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/mL	in ddH <sub>2</sub> O

## Verwendete DNA-Marker:



**Abb. 4.1:** Verwendete DNA-Marker. Links: GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, Fermentas GmbH; Mitte: GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas GmbH; Rechts: Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker 3, ready-to-use, Fermentas GmbH.

*Durchführung:*

Die für das Agarose-Gel verwendeten Gelschlitten wurden beidseitig mit Klebeband abgedichtet und an der dafür vorgesehenen Stelle ein Kamm eingesteckt.

Zur Herstellung eines 1%igen Elektrophoresegels wurden 0,5 g Agarose (peqGOLD™ Universal-Agarose, Peqlab Biotechnologie GmbH) in 50 mL des gewünschten DNA-Elektrophoresepuffers über dem Bunsenbrenner aufgeköcht. Nach dem Abkühlen der Lösung auf etwa 50°C wurde 1 µL der Ethidiumbromid-Stammlösung beigemischt und in den vorbereiteten Gelschlitten luftblasenfrei eingegossen. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurde der Gelschlitten in die Gelkammer eingesetzt und mit dem zum Gel passenden Lauffuffer überschichtet. Anschließend konnte der Kamm vorsichtig aus dem Gel gezogen werden. Die aufzutrennenden Proben wurden mit dem entsprechenden Volumen des 6-fachen DNA-Ladepuffers vermengt und in die Geltaschen pipettiert. Neben den zu analysierenden Proben wurde auch eine Gelspur mit einem Marker beladen, einem Gemisch aus DNA-Fragmenten bekannter Molekülgröße (siehe oben). Durch Anlegen einer konstanten Spannung (abhängig vom verwendeten Lauffuffer; bei SB-Puffer 200 V, bei TAE- und TBE-Puffer je 100 V) wurden die DNA-Fragmente aufgetrennt. Die Lauffront ergab sich durch das im Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau. Die Elektrophorese wurde beendet, nachdem die Lauffront etwa  $\frac{3}{4}$  des Gels durchwandert hatte. Die im Gel beigemischten Ethidiumbromidmoleküle interagieren mit DNA- und RNA-Molekülen, indem sie sich im Abstand von zehn Basenpaaren in die Nukleinsäuremoleküle einlagern. Hierdurch ändert sich das Anregungsspektrum von Ethidiumbromid, wodurch die Fluoreszenz durch Anregung mit UV-Licht stark erhöht wird. Die Nukleinsäurefragmente können somit unter UV-Licht als Banden sichtbar gemacht werden, während der Rest des Gels dunkel bleibt. Die Banden wurden nach

Beendigung der Elektrophorese unter einem UV-Transilluminator angeregt und zur Dokumentation über eine Photokamera digital abfotografiert.

#### **4.2.7 Extraktion von Nukleinsäure aus Agarose-Gelen**

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde mit dem E.Z.N.A. Gel Extraction Kit (peqlab Biotechnologie GmbH) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die gewünschten Banden wurden mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel herausgetrennt, in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und die DNA anschließend aus dem Gel extrahiert. Die finale Elution der DNA erfolgte je nach Verwendung in 40-80 µL ddH<sub>2</sub>O. Die DNA konnte nach der Elution unmittelbar ohne weitere Bearbeitungsschritte für nachfolgende Versuche verwendet werden.

#### **4.2.8 Fällung von Nukleinsäuren**

Die Fällung von DNA erfolgte mit Natriumacetat und Ethanol. Zuerst wurde die gelöste DNA mit  $\frac{1}{10}$  Volumen 3 M Na-Acetat (pH 4,6) vermengt und mit ddH<sub>2</sub>O auf 100 µL aufgefüllt, da die Fällungen im Normalfall in einem 100 µL Volumen durchgeführt wurden. Anschließend wurden 2,5 x Volumina 100 % Ethanol (p.A.) zugegeben. Der Ansatz wurde gemischt und anschließend 30 Minuten bei 16.000 x g zentrifugiert. Nach der Sedimentation der DNA wurde der Überstand verworfen und die DNA zweimal mit je 350 µL 70 % Ethanol gewaschen und für je zehn Minuten bei 16.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut entfernt, das Sediment für 45 min. bei 37°C getrocknet und anschließend in einem geeigneten Volumen ddH<sub>2</sub>O oder entsprechendem Puffer aufgenommen.

#### **4.2.9 Sequenzierung von Nukleinsäuren**

Die in dieser Arbeit sequenzierte DNA wurde nach der Didesoxymethode des zweifachen Nobelpreisträgers Frederick Sanger (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Das Prinzip beruht auf einer enzymatischen Kettenabbruch-Synthese, bei welcher Dideoxy-Nukleosid-Triphosphate (ddNTPs) benötigt werden. Ihnen fehlt die 3'-Hydroxylgruppe an der Desoxyribose. Mit Hilfe einer DNA-Polymerase wird wie bei einer Polymerase-Kettenreaktion (siehe 4.2.4) von einem Primer ausgehend ein bestimmter Einzelstrang-Abschnitt verlängert. Werden die ddNTP's in den neu synthetisierten Strang eingebaut, stoppt die Verlängerung durch die DNA-Polymerase. Durch das Fehlen des 3'-Hydroxylendes kann keine weitere Phosphodiesterbindung geknüpft und somit keine weiteren Desoxyribonukleotide (dNTPs) eingebaut werden. Der Einbau erfolgt zufällig, so dass mit statistischer Wahrscheinlichkeit DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge entstehen, die an ihrem 3'-Ende mit einem ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP) enden. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Arbeitssystem (ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Applied Biosystems, Weiterstadt) sind die ddNTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt, wodurch die synthetisierten DNA-Fragmente unterschiedlichster Länge mit einer spezifischen Farbe markiert sind. Dabei tragen Fragmente gleicher Länge den gleichen Farbstoff. Die Mischung dieser DNA-Moleküle wird in einem Kapillar-Gelsystem elektrophoretisch aufgetrennt. Ein Laser bringt an einem Messfenster die Fluoreszenz-Farbstoffe zum Leuchten, wobei ein angeschlossenes Fotoelement die Wellenlänge des emittierten Lichts aufnimmt. Die registrierten Messdaten werden an einen Computer weitergeleitet, der die einzelnen Fluoreszenz- Signale über eine geeignete Software schließlich zu einer Sequenz zusammensetzt.

*Durchführung:**Pipettierschema für einen 20 µL Ansatz:*

300 ng Plasmid-DNA  
 5 µL Premix (Big Dye™, Applied Biosystems)  
 10 pm Sequenzierungsprimer (5' oder 3')  
 mit ddH<sub>2</sub>O auf 20 µL auffüllen

*PCR-Programm:*

initiale Denaturierung	94°C	2 min.	25 Zyklen
Denaturierung	94°C	30 sek.	
Annealing	55°C	30 sek.	
Elongation	60°C	3 min.	

Kühlung auf 4°C

Nach Beendigung des PCR-Programms wurde die sequenzierte DNA mit Natriumacetat und Ethanol gefällt (siehe 4.2.8) und das getrocknete Sediment in 25 µL HiDi Formamid (Applied Biosystems) für eine Minute resuspendiert oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die in Lösung gebrachte DNA wurde anschließend in ein Sequenzierungsgefäß mit aufgesetztem Septum überführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der Software Bioedit geöffnet und durch Sequenzvergleich mit einem frei zugänglichen Internetprogramm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi> oder <http://genome.cs.mtu.edu/align/align.html>) ausgewertet.

#### 4.2.10 UA-Klonierung von PCR-Fragmenten

Mit Hilfe des QUIAGEN PCR Cloning Kits ist es möglich, PCR-Produkte mit einem überhängendem Adenosin-Rest an den 3'-Enden in einen linearisierten Vektor zu klonieren. Polymerasen ohne Exonuklease-Aktivität, wie die Taq- oder die Tfl-Polymerase, fügen durch ihre terminale Transferase-Aktivität an den 3'-Enden ein überhängendes Adenosin an. Der in dem Kit enthaltene pDrive Klonierungsvektor liegt zunächst linearisiert vor und besitzt an den Enden jeweils ein überhängendes Uracil. Somit kann mit Hilfe der spezifischen U-A-Basenpaarung das gewünschte PCR-Fragment in den Klonierungsvektor eingebracht werden. Für eine spätere Selektion kodiert der pDrive-Vektor für eine Ampicillin- und Kanamycin-Resistenz. Wurde das PCR-Fragment erfolgreich in den Klonierungsvektor eingefügt, so können die positiven Bakterienklone nach der Transformation des Vektors anhand einer Blau-Weiß-Selektion detektiert werden. Wurde das Fragment in den zuvor linearisierten Vektor integriert, so ist das im Vektor enthaltene lacZ-Gen nicht mehr funktionsfähig, da der Einbau des PCR-Inserts innerhalb der lacZ-Gensequenz stattfindet. Die Bakterien können somit das vom lacZ-Gen kodierte Enzym β-Galaktosidase nicht mehr exprimieren und deshalb X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid) als Substrat nicht mehr spalten. Durch die Spaltung von X-Gal färben sich Klone, die einen Vektor ohne integriertem PCR-Insert aufgenommen haben blau, während Klone mit integriertem Insert im Vektor weiß bleiben.

*Durchführung:**Pipettierschema für einen 10 µL Ansatz:*

4 µL PCR-Produkt  
1 µL pDrive-Vektor  
5 µL pDrive-Ligationspuffer (2 x)

Der Ansatz wurde für 30 min. bei 12°C inkubiert. Anschließend wurde die Ligase-Aktivität durch einen 10 min. Hitzeschock bei 70°C gestoppt und der Ansatz weitere 2 min. auf Eis inkubiert. Nach dem Ligieren des PCR-Produktes in den pDrive-Vektor konnte dieser nun in chemisch kompetente Bakterien eingebracht werden.

Damit die positiven Klone nach der Transformation (siehe 4.1.7) selektiert werden konnten, wurden Selektionsplatten (siehe 4.1.4) mit je 25 µL X-Gal in Dimethylformamid (DMF, 100 mg/mL) bestrichen. Zum Abdampfen von DMF wurden die Platten danach für 15 min. bei 37°C und leicht geöffnetem Deckel inkubiert. Danach wurden die Selektionsplatten mit je 100 µL 10 mM IPTG bestrichen und nochmals für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend konnten die Bakterienzellen des Ligationsansatzes auf den vorbereiteten Selektionsplatten ausplattiert werden und über Nacht bei 37°C anwachsen. Am nächsten Tag konnten weiß gefärbte, positive Klone von der Platte gepickt werden.

#### 4.2.11 Transformation von Klonierungsvektoren

*Lösungen:*

SOB (Super Optimal Broth)-Medium: (Hanahan, 1983)	0,5%	Hefeextrakt
	2%	Trypton
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	10 mM	MgSO <sub>4</sub>

SOC-Medium: SOB-Medium + 20 mM Glucose

*Durchführung:*

Direkt nach der Ligation eines PCR-Fragmentes in einen Klonierungsvektor wurde dieser in chemisch kompetente Bakterien (siehe 4.1.5) transformiert. Ein Aliquot der kompetenten Bakterien (100 µL) wurde während der Stoppreaktion der Ligation (siehe 4.2.15) auf Eis aufgetaut. Die vorbereiteten Bakterien wurden dann in den Ligationsansatz gegeben und gemischt. Es folgte eine Inkubation für 1 h auf Eis, anschließend 90 sek. Hitzeschock bei 42 °C. Danach wurden die Bakterien sofort für 2 min. auf Eis abgekühlt. Zu dem Ansatz wurden 250 µL SOC-Medium gegeben und für 1 h bei 200 rpm und 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen auf vorbereiteten Selektionsplatten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

#### 4.2.12 Restriktionsverdau

DNA kann durch Restriktionsenzyme an bestimmten Positionen geschnitten werden. Jede Restriktionsendonuklease erkennt dabei eine spezifische DNA-Basensequenz. Nach ihren

Eigenschaften lassen sich die Restriktionsendonukleasen in drei unterschiedliche Typen einteilen:

- Typ I: schneidet die DNA an einer zufälligen Stelle und transferiert eine Methylgruppe von S-Adenosyl-Methionin. Typ I benötigt hierfür ATP.
- Typ II: schneidet die DNA innerhalb oder in unmittelbarer Nähe der Erkennungssequenz. Typ II benötigt kein ATP und hat keine Methyltransferase-Aktivität.
- Typ III: schneidet die DNA etwa 20 bis 25 Basenpaare von der Erkennungssequenz entfernt. Typ III benötigt ATP und transferiert eine Methylgruppe von S-Adenosyl-Methionin.

In der Molekularbiologie finden im Normalfall allerdings nur Restriktionsenzyme vom Typ II Verwendung. Je nach verwendetem Enzym können nach einem Restriktionsverdau Enden mit überhängenden DNA-Basen (sticky ends) oder Enden ohne Überhang (blunt ends) entstehen. Der Vorteil von sticky ends liegt in der dadurch entstehenden Möglichkeit eines spezifischen Einbaus in Klonierungsvektoren über komplementäre Basenendungen. Werden bei der Klonierung zwei verschiedene Restriktionsenzyme verwendet, so ermöglichen die beiden unterschiedlichen Enden des DNA-Fragments den gerichteten Einbau in einen Vektor.

*Durchführung:*

*Pipettierschema für einen Restriktionsansatz a 20 µL:*

1,5 µg Plasmid-DNA	
2 µL Restriktionspuffer (10 x)	MBI Fermentas GmbH
1 µL Restriktionsenzym	5 U/µL, MBI Fermentas GmbH
mit ddH <sub>2</sub> O auf 20 µL auffüllen	

Nach gründlicher Vermischung des Reaktionsansatzes wurde dieser für 1 h bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert. Es folgten 1 ¾ Umdrehungen in der Mikrowelle und ein anschließender Hitzeschock für 10 min. bei 70°C. Danach wurde der Restriktionsansatz auf Eis gestellt und konnte nach dem Zufügen von DNA-Beladungspuffer direkt für eine Agarose-Gel-Analyse verwendet werden (siehe 4.2.6). Zur weiteren Verwendung konnten die Gelbanden wieder aus dem Agarose-Gel extrahiert werden (siehe 4.2.7).

### 4.2.13 Gewinnung des Inserts

Um die zu klonierende DNA-Sequenz in einen geeigneten Expressionsvektor einzubringen, wurde das zuvor in einen pDrive-Vektor eingebrachte Fragment (siehe 4.2.10) mit Hilfe von Restriktionsenzymen anhand der über die Primer designten (siehe 4.2.3) Schnittstellen ausgeschnitten. Der Restriktionsverdau wurde anschließend über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und das verdauten Insert aus dem Gel extrahiert (siehe 4.2.7). Um den für die spätere Ligation mit dem Zielvektor benötigten Überschuss von 3:1 des Inserts zu erlangen, wurde ein doppelter Reaktionsansatz mit je 2 µg DNA verdaut und über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Bande des verdauten Inserts wurde aus dem Gel extrahiert (siehe 4.2.7) und konnte anschließend über die vorhandenen komplementären Überhänge in den zuvor ebenfalls verdauten Zielvektor eingebracht werden.

### 4.2.14 Dephosphorylierung von Klonierungsvektoren

Zur Minimierung der Autoligation eines Klonierungsvektors wurde der zuvor mit Restriktionsenzym geschnittene Vektor dephosphoryliert. Um zwei DNA-Moleküle über eine

Esterbindung zu verknüpfen, benötigen DNA-Ligasen phosphorylierte Enden. Werden die Enden eines DNA-Moleküls dephosphoryliert, so kann der linearisierte Vektor nicht mehr von der Ligase miteinander verbunden werden und somit findet keine Autoligation statt. Als Negativ-Kontrolle werden deshalb nicht dephosphorylierte Vektoren verwendet, die nach der Autoligation durch die DNA-Ligase zu Falschpositiven Bakterienklonen führen.

*Durchführung:*

*Pipettierschema für einen 10 µL Ansatz:*

300 ng	linearisierter Vektor	
1 µL	SAP-Puffer (10 x)	MBI Fermentas GmbH
1 µL	Shrimp Alkalische Phosphatase	1 <sup>U</sup> /µL, MBI Fermentas GmbH
mit ddH <sub>2</sub> O auf 10 µL auffüllen		

Der Ansatz wurde nach dem gründlichen Vermischen für 1 h bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert. Durch einen Hitzeschock für 10 min. bei 70°C wurde die enzymatische Aktivität der Phosphatase inaktiviert. Der dephosphorylierte Vektor wurde anschließend bei -20°C gelagert oder bis zur folgenden Weiterverwendung auf Eis gestellt.

#### 4.2.15 Ligation

Durch eine Ligation können das 3'-Hydroxy- und das 5'-Phosphat-Ende einer Nukleinsäure mit Hilfe eines Enzyms, einer Ligase, kovalent verbunden werden. Die zuvor durch spezifische Restriktionsenzyme geschnittenen DNA-Fragmente, also z.B. ein Klonierungsvektor und das zu integrierende Insert, werden durch einen durch die Ligase katalysierten Prozess miteinander verbunden und es bildet sich somit ein ringförmiges Plasmid, welches das Insert trägt. Das Verhältnis von linearisiertem Vektor und Insert sollte dabei 1:3 betragen.

*Durchführung:*

*Pipettierschema für einen 20 µL Ansatz:*

100 ng	linearisierter und aufgereinigter Vektor	
300 ng	Insert (mit Restriktionsenzymen geschnitten und aufgereinigt)	
2 µL	T4-Ligase Puffer (10 x)	MBI Fermentas GmbH
1 µL	T4-DNA Ligase	5 <sup>U</sup> /µL, MBI Fermentas GmbH
mit ddH <sub>2</sub> O auf 20 µL auffüllen		

Der Ansatz wurde nach gründlicher Durchmischung für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ligation konnte nun für eine Transformation in chemisch kompetente Bakterien verwendet werden (siehe 4.1.7).

### 4.3 Proteinbiochemische Methoden

#### 4.3.1 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Thomas und Kornberg (1975)

Die eindimensionale Auftrennung von Proteingemischen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelsystem in Gegenwart von SDS

(Sodium-Dodecyl-Sulfat). Die Wandergeschwindigkeit von Molekülen im elektrischen Feld hängt von deren Größe, ihrer Form und ihrer elektrischen Ladung ab. Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) ist jedoch ausschließlich die Masse von Bedeutung, da die Proteine durch Zugabe von SDS, einem stark amphipatischen Detergenz, denaturiert werden. An die entfalteten Peptid-Ketten binden SDS-Moleküle und verleihen ihnen eine starke negative Ladung. Die Eigenladung der Proteine kann deshalb vernachlässigt werden. Zur vollständigen Denaturierung wird zusätzlich noch  $\beta$ -Mercaptoethanol zugegeben, das alle Disulfidbrücken im Protein spaltet. Durch Erhitzen der Proteinproben auf 95°C werden zudem alle Sekundär- und Tertiärstrukturen zerstört.

Die Kombination aus Trenn- und Sammelgel, welche sich in der Acrylamidkonzentration und im pH-Wert unterscheiden, ermöglicht eine optimale lokale Fokussierung und anschließende Auftrennung der Polypeptide. Durch den pH-Sprung zwischen Sammel- und Trenngel entsteht ein diskontinuierlicher Feldstärkegradient, wodurch die Proteine beim Übergang der beiden Gele konzentriert werden. Im Trenngel werden die Polypeptide dann anhand ihrer spezifischen Molekularmasse aufgetrennt. Um eine optimale Auftrennung der Proben zu erzielen, wurde das Gel- und Puffersystem nach Thomas und Kornberg (1975) je nach Proteingröße mit den Acrylamidkonzentrationen 12, 15 und 18% verwendet. Für die Elektrophorese wurden Plattengelapparaturen der Firmen Gibco BRL (München), PEQLAB Biotechnologie GmbH und institutseigene Geräte verwendet.

### *Lösungen:*

- Lösung A: Acrylamid-Bis-Lösung für das Trenngel:  
30% (w/v) Acrylamid  
0,15% (w/v) Bis (N,N'-methylen-diacrylamid)
- Lösung A': Acrylamid-Bis-Lösung für das Sammelgel (nach Laemmli, 1970)  
30% (w/v) Acrylamid  
0,8% (w/v) Bis (N,N'-methylen-diacrylamid)
- Lösung B: Trenngelpuffer, pH 8,8  
3 M Tris-HCl  
0,4% (w/v) SDS
- Lösung C: Sammelgelpuffer, pH 6,8  
0,75 M Tris-HCl  
0,4% (w/v) SDS

10% (w/v) Ammoniumpersulfat-Lösung (APS) in ddH<sub>2</sub>O

TEMED (Tetramethylethylen-diamin)

### *Herstellung eines Minigels:*

Für die Herstellung eines Minigels wurden zwei Glasplatten, zwei Spacer und ein Kamm benötigt, die zunächst mit Ethanol gereinigt wurden. Anschließend wurden die Glasplatten übereinander gelegt und die Spacer seitlich eingelegt. Bei der Apparatur von Peqlab wurden die Platten dann in den Gießstand eingesetzt, so dass die beiden Platten an der Unterseite bündig abschlossen. Das Trenngel konnte nun mit Hilfe einer Pasteurpipette eingefüllt werden. Damit sich eine gleichmäßige Polymerisationsgrenze bilden konnte, wurde das Trenngel mit ddH<sub>2</sub>O überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurde das Wasser abgegossen und das Sammelgel bis zur Obergrenze der Glasplatten eingefüllt. Der mit Ethanol gereinigte Kamm wurde in das noch flüssige Sammelgel luftblasenfrei eingeführt. Nach dem Auspolymerisieren

des Sammelgels wurde der Gießstand in das vertikale Gellaufsystem eingehängt und mit Elektrophoresepuffer überschichtet.

Für das Gelsystem der Firma Gibco wurden die beiden Glasplatten nach der Reinigung und Zusammensetzung mit den beiden Spacern von unten mit Tesafilm abgedichtet und eine etwa 0,5 cm hohe Schicht 1%iger Agarose in ddH<sub>2</sub>O mit einer Pisteurpipette eingefüllt. Nach der Polymerisierung der Agarose konnten Trenn- und Sammelgel wie oben beschrieben eingefüllt werden.

	Gelsystem Peqlab, Menge für ein Minigel			Gelsystem Gibco, Menge für ein Minigel		
	12%	15%	18%	12%	15%	18%
Lösung A	2,6 mL	3,25 mL	3,9 mL	2 mL	2,5 mL	3 mL
Lösung B	1,625 mL	1,625 mL	1,625 mL	1,25 mL	1,25 mL	1,25 mL
ddH <sub>2</sub> O	2,21 mL	1,56 mL	910 µL	1,7 mL	1,2 mL	0,7 mL
TEMED	4,44 µL	4,44 µL	4,44 µL	3,32 µL	3,32 µL	3,32 µL
APS	130 µL	130 µL	130 µL	100 µL	100 µL	100 µL

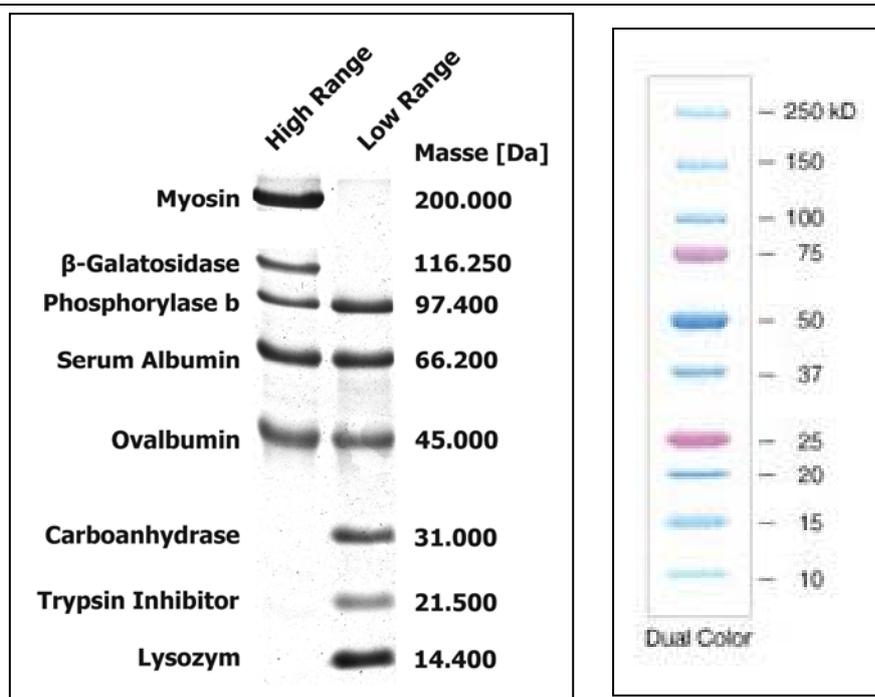
Tab. 4.2: Pipettierschema für ein Trenngel eines Minigels

	Gelsystem Peqlab	Gelsystem Gibco
	3,9%	3,9%
A'	325 µL	325 µL
C	625 µL	625 µL
ddH <sub>2</sub> O	1,55 µL	1,55 µL
TEMED	2,5 µL	2,5 µL
APS	75 µL	75 µL

Tab. 4.3: Pipettierschema für ein Sammelgel eines Minigels

### *Vorbereitung und Auftragen der Proteinproben*

Proteinproben, die mit Aceton oder Ethanol gefällt worden sind (siehe 4.3.11.1), wurden für 15 min. bei 5.000 x g und 4°C abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig verworfen und die sedimentierten Proteine luftgetrocknet. Die zu analysierenden Proteinproben wurden nach der Trocknung in einer geeigneten Menge SDS-Probenpuffer aufgenommen. Proteine, die nicht in Aceton oder Ethanol gefällt wurden, konnten direkt in Probenpuffer aufgenommen werden. Für das Gelsystem von Peqlab wurden die Proben in einem Endvolumen bis zu 30 µL, für das Gelsystem von Gibco bis zu 20 µL aufgenommen. Vor dem Beladen des Gels wurden alle Proben bei 95°C für 5 min. aufgekocht und anschließend kurz abzentrifugiert. Leere Geltaschen wurden mit Bromphenolblau in Probenpuffer beladen. Durch Bromphenolblau kann die Lauffront sichtbar gemacht werden. Zur Bestimmung der Molekularmasse der Polypeptide wurden folgende Referenzproteine parallel zu den Proben aufgetragen:



**Abb. 4.2:** Verwendete Protein-Größenmarker für die SDS-Page. Links: High- und Low-Range Marker. Rechts: Precision Plus Protein™ Dual Marker. (Beide Marker von Bio-Rad Laboratories GmbH)

#### *Elektrophorese:*

Nachdem die Gele beladen waren, wurde das Gerät an ein stabiles Netzgerät angeschlossen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA für ein Minigel bei etwa 45 Laufzeit (je nach Konzentration des Gels). Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Lauffront etwa 0,5 cm oberhalb des unteren Endes der Glasplatten angekommen war. Anschließend wurde das Gel aus der Kammer genommen und das Sammelgel entfernt. Das Trenngel wurde nun entweder für einen Western-Blot (siehe 4.3.4) oder für eine Coomassie-Färbung (siehe 4.3.2.1) weiterverwendet.

### 4.3.2 Färben von Proteingelen

#### 4.3.2.1 Herkömmliche Coomassie-Färbung

##### *Lösungen:*

Färbelösung: 0,1% (w/v) Serva Blau R250  
20% (v/v) Methanol  
7,5% Essigsäure

Entfärbelösung: 20% (v/v) Methanol  
7,5% (v/v) Essigsäure

##### *Durchführung:*

Nach dem Beenden der Gelelektrophorese wurde das Trenngel in ein Schälchen mit Färbelösung gegeben und für mind. 3 h oder über Nacht inkubiert. Der Coomassie-Farbstoff lagert sich an basische und aromatische Seitenketten von Aminosäuren an und weist Proteine

somit unspezifisch nach. Anschließend wurde die Färbelösung abgegossen und Hintergrundfärbung des Gels mit Entfärbelösung reduziert. Zur Beschleunigung des Entfärbeprozesses konnten Zellstofftücher in die Lösung gegeben werden. Nach der Färbung konnte das Gel im Durchlicht eingescannt werden.

#### 4.3.2.2 Modifizierte Coomassie-Färbung

*Lösungen:*

modifizierte Färbelösung:	0.02 %	Coomassie-Brilliant-Blue-G250 (Roth)
	5 %	Aluminiumsulfat-(14-18)-Hydrat
	10 %	Ethanol (96 %)
	2 %	ortho-Phosphorsäure (100 %)

Entfärbelösung für modifizierte Färbelösung:	10 %	Ethanol (96 %)
	2 %	ortho-Phosphorsäure (100 %)

oder alternativ ddH<sub>2</sub>O

*Durchführung:*

Um Proteinbanden sensitiver anzufärben als mit dem herkömmlichen Protokoll, wurde ein modifiziertes Färbeprotokoll, das auf der von Kang beschriebenen kolloidalen Coomassie-Färbung basiert (Kang et al., 2002), verwendet. Der Vorteil liegt hierbei an der sehr sensitiven Anfärbung von Protein bis zu einer Konzentration von nur 2 ng. Sie ist daher ähnlich sensitiv wie eine Silberfärbung. Vor der Färbung wurden die Proteingele 3 x für je 10 min. in ddH<sub>2</sub>O gewaschen, um das SDS aus den Gelen zu entfernen. Hierdurch konnte eine mögliche Hintergrundfärbung maximal reduziert werden. Anschließend wurden die Gele in die Färbelösung transferiert und je nach Proteinkonzentration konnten bereits nach 15 min. Proteinbanden sichtbar gemacht werden. Nach 1 h waren 80% der Proteine angefärbt und nach 3 h waren alle Banden gesättigt. Das Gel konnte nun zur Dokumentation eingescannt werden.

#### 4.3.2.3 Page-Blue™-Färbung

*Durchführung:*

Um Proteingele ähnlich schnell und sensitiv anzufärben wie mit der modifizierten Coomassielösung, konnte auf die Färbelösung PageBlue™ (MBI Fermentas GmbH) zurückgegriffen werden. Hierbei konnten Proteinkonzentrationen bis zu 5 ng angefärbt werden. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Trenngel in ein Glasschälchen mit ddH<sub>2</sub>O transferiert und 3 x für je 1 min. bei maximaler Leistung in der Mikrowelle inkubiert. Anschließend wurde es jeweils für 4 min. auf dem Wiegetisch gewaschen. Nach den Waschsritten wurde das restliche Wasser abgekippt und das Gel mit PageBlue™-Färbelösung überschichtet. Nach 30 sek. Inkubation in der Mikrowelle wurde das Gel für 20 min. auf dem Wiegetisch inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung entfernt und das Gel mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen, bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Das Gel konnte nun zur Dokumentation eingescannt werden.

#### 4.3.2.4 Silberfärbung von Proteingelen

##### Lösungen:

Fixierlösung:	3,8 g 8 mL	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> (Dinatriumtetraborat) in 192 mL ddH <sub>2</sub> O 25% Glutaraldehyd
Silberfärbelösung:	3,7 mL 3,9 mL 184 mL	1 M NaOH NH <sub>4</sub> OH ddH <sub>2</sub> O langsam unter Rühren Zugabe von 20% AgNO <sub>3</sub> (1,55 g auf 8 mL ddH <sub>2</sub> O)
Reduktionslösung:	20 mL 1,2 mL 1% 40 µL 37% mit ddH <sub>2</sub> O auf 200 mL auffüllen	Ethanol p.A. Zitronensäure Formaldehyd

Vor der eigentlichen Silberfärbung wurde das Gel mit Coomassie angefärbt (siehe 4.3.2.1), da sich dadurch die Hintergrundfärbung deutlich reduzieren ließ und das Gel nicht extra fixiert werden musste. Nach der Coomassiefärbung wurde das Gel 2 x für je 20 min. in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und danach für 15 min. in die Fixierlösung gegeben. Nach dreimaligem Waschen des Gels für je 20 min. erfolgte die Inkubation mit der Silberfärbelösung für 20 min., welche zuvor frisch angesetzt wurde. Danach wurde das gefärbte Gel dreimal für je 5 min. in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und schließlich mit der Reduktionslösung inkubiert. Die Inkubation erfolgte so lange, bis sich an den Proteinbanden ein rotbrauner Niederschlag aus Silbercarbonat bildete. Die Reaktion wurde nach etwa 5 min. durch häufiges Waschen mit reichlich ddH<sub>2</sub>O abgestoppt. Alle Färbe- und Waschschrte fanden in einer Glasschale auf einem Wiegetisch statt. Nach Abschluss der Färbung konnte das Gel im Durchlicht eingescannt werden.

#### 4.3.3 Trocknen von Proteingelen

Zur Dokumentation und Aufbewahrung der hergestellten und gefärbten Polyacrylamidgele wurden diese meist direkt nach der Färbung eingescannt. Anschließend wurden die Gele luftblasenfrei zwischen zwei in Wasser eingeweichten Zellophan-Folien gelegt und locker in einen Plastikrahmen eingespannt. Nachdem die Gele über Nacht getrocknet waren, wurden sie aus dem Rahmen genommen und archiviert.

#### 4.3.4 Western-Blot

Die Identifizierung von Antigenen erfolgte nach der von Towbin et al. (1979) beschriebenen Immunblot-Methode. Die zu analysierenden Proteingemische werden durch ein- oder zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Polypeptide anschließend elektrophoretisch von den Gelen auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Unspezifische Bindungsstellen wurden nach dem Transfer mit Magermilch abgesättigt. Die somit auf der Membran immobilisierten Proteine wurden dann mit einem Primärantikörper inkubiert, der über die spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion am Epitop des Polypeptids bindet. Über einen Sekundärantikörper, der sich gegen den Primärantikörper richtet und an Peroxidase gekoppelt ist, lässt sich dann das Protein über das *Enhanced Chemical Luminescence Detectionsystem* (ECL, siehe 4.3.5.2) nachweisen.

*Lösungen:*

TBST:	140 mM 10 mM 0,05% (v/v)	NaCl Tris-HCl, pH 7,4 Tween-20 (Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen)
TBS:	140 mM 10 mM	NaCl Tris/HCl
Graphitblotpuffer 1:	25 mM 20% (v/v) pH 10,4	Tris Methanol
Graphitblotpuffer 2:	300 mM 20% (v/v) pH 10,4	Tris Methanol
Graphitblotpuffer 3:	25 mM 40 mM 20% (v/v) pH 9,4	Tris DL-Norleucin (Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen) Methanol

Es wurde das auf Towbin basierende semi-dry-Verfahren nach Kyhse-Anderson (1984) angewandt. Nach Beendigung der Gelelektrophorese (siehe 4.3.1) wurde das Gel aus der Kammer genommen, das Sammelgel entfernt und das Trenngel ausgemessen. Danach wurde das Trenngel für 15 min. in Graphitblotpuffer 3 äquilibriert. Während der Inkubation wurden eine Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell, Dassel) und 18 Filterpapiere für Chromatographie (Whatman-Filterpapier, Schleicher & Schuell, Dassel) auf die ausgemessene Gelgröße zugeschnitten. Anschließend wurde der Western-Blot nach folgendem Schema aufgebaut:

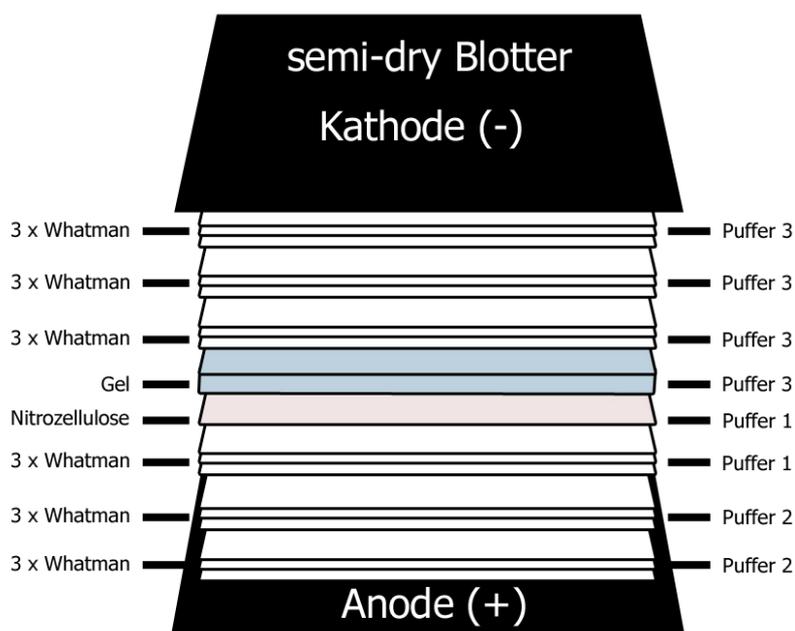


Abb. 4.3: Schematischer Aufbau eines Westernblots

Um zu verhindern, dass Luftblasen den vollständigen Transfer aller Proteine stören, wurde nach je 3 Lagen Filterpapier die jeweils untere Schicht mit einer Glaspipette unter leichtem Druck abgerollt. Der elektrophoretische Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA/cm<sup>2</sup> für 1,5 h bei RT.

#### 4.3.5 Nachweis von transferierten Proteinen auf einer Nitrozellulosemembran

Nach der Beendigung des elektrophoretischen Transfers (siehe oben) wurden die auf die Nitrozellulose übertragenen Polypeptide mit Ponceau S-Lösung (gebrauchsfertige 0,2%-Lösung in 3% TCA, Serva) sichtbar gemacht. Hierfür wurde die Nitrozellulose mit Ponceau-S-Lösung überschichtet und für 2-5 min. auf einem Wiegetisch inkubiert. Überschüssige Lösung wurde mit ddH<sub>2</sub>O abgewaschen. Die Banden der Referenzproteine wurden mit einem Bleistift markiert und eine Ecke der Nitrozellulose zur Orientierung abgetrennt. Anschließend konnte die Nitrozellulose zur Dokumentation in Frischhaltefolie eingescannt werden.

##### 4.3.5.1 Immunreaktion

Nach einem Western-Blot (siehe 4.3.4) wurde die Nitrozellulose für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C mit Magermilchpulver in TBST bzw. TBS (pH 7,4) abgesättigt. Die Konzentration der Magermilch (w/v) wurde dabei an den Primärantikörper (siehe 3.1.4.1) angepasst, meist lag sie jedoch bei 5 oder 10%. Anschließend wurde die Membran 3 x für je 10 min. in TBST bzw. TBS gewaschen und die Nitrozellulose mit dem Primärantikörper inkubiert. Dafür wurde die Membran zusammen mit der Antikörperlösung luftblasenfrei in Folie eingeschweißt und auf einem Drehtisch für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Nitrozellulose 3 x für 10 min. in TBST bzw. TBS gewaschen, um ungebundene Primärantikörper vollständig zu entfernen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper, welcher an Peroxidase gekoppelt war. Die Verdünnung richtete sich wiederum nach dem jeweils verwendeten Antikörper (siehe 3.1.4.2). Der Sekundärantikörper wurde in der Absättigungslösung verdünnt und entweder auf einem Drehtisch in Folie eingeschweißt oder in einem Glasschälchen auf einem Wiegetisch für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen für je 10 min. in TBST wurden die gebundenen Sekundärantikörper mit Hilfe des ECL-Detektionssystems (siehe 4.3.5.2) nachgewiesen.

##### 4.3.5.2 Das Enhanced Chemical Luminescence Detectionssystem (ECL)

*Lösungen:*

Lösung A:	200 mL 0,1M	TRIS-HCl (pH 8,6)
	50 mg	Luminol, Sigma
Lösung B:	11 mg	para-Hydroxycoumarinsäure (Sigma) in 10 ml DMSO
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (35 %)	
gebrauchsfertige Lösungen:	ECL, Amersham Buchler, Braunschweig	

*Durchführung:*

Bei der ECL-Reaktion kommt es unter alkalischen Bedingungen zur Peroxidase-katalysierten Oxidation des zyklischen Diacylhydrazids Luminol. Dabei befindet sich Luminol kurzzeitig in einem angeregten Zustand. Dabei wird im Beisein von chemischen Verstärkern Licht in Form von chemischer Lumineszenz emittiert. Bei den gebrauchsfertigen Lösungen wurde nach Herstellerprotokoll verfahren, bei den selbst hergestellten Lösungen wurde 1 ml Lösung A mit 100 µL Lösung B und 0,3 µL 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zusammen pipettiert und die Nitrozellulose 2 min. lang mit der Lösung inkubiert. Anschließend wurde die Lösung von der Membran abgetropft und der Blot in Folie gelegt. In der Dunkelkammer wurde dann ein Röntgenfilm (Agfa Cronex 5) auf die ECL-behandelte Nitrozellulose gelegt und der Film durch das emittierte Licht an den Stellen, wo der Antikörper gebunden hat, geschwärzt. Die Expositionsdauer richtete sich dabei nach der Stärke des Lichtsignals. Im Allgemeinen wurden Belichtungszeiten zwischen 1 und 30 min. gewählt. Nach der Exposition wurde der Röntgenfilm in ein Entwicklerbad getaucht, bis die Banden sichtbar wurden. Nach kurzem Spülen in Wasser wurde der Röntgenfilm in Fixierlösung getaucht und für etwa 30 sek. inkubiert. Dann wurde der Film nochmals in Wasser abgespült und getrocknet. Anschließend konnten die zuvor auf der Nitrozellulose markierten Markerbanden auf den Röntgenfilm übertragen werden. Die Membran wurde mit TBST gespült und konnte eingeschweißt bei 4°C für mehrere Monate aufbewahrt werden.

#### 4.3.6 Entfernen gebundener Antikörper eines Blots (Strippen)

*Lösungen:*

Strip-Puffer:	100 mM	Tris/HCl, pH 7,6
	100 mM	β-Mercaptoethanol
	2% SDS	

TBST (siehe 4.3.4)

*Durchführung:*

Um gebundene Antikörper von einer Nitrozellulose zu entfernen, wurde die Membran zunächst in TBST gewaschen. Anschließend wurde die Membran in Strip-Puffer bei 50°C für 30 min. in einem Wasserbad mit Schüttler inkubiert. Danach wurde die Membran 3 x mit reichlich TBST für je 10 min. gewaschen. Vor einer erneuten Inkubation mit einem Primärantikörper musste die Nitrozellulose nochmals abgesättigt werden.

#### 4.3.7 Overlay-Blot-Assay

Die Methode beruht auf der von Kremer et al. (1988) entwickelten Technik zur Identifikation von Bindungspartnern durch Gelelektrophorese, dem Transfer der zu analysierenden Proteine auf eine Nitrozellulose und der Inkubation der Membran mit dem aufgereinigtem Protein als Bindungspartner. Durch eine nachfolgende Immunreaktion mit einem Antikörper gegen das aufgereinigte Protein können die Bindungspartner auf der Nitrozellulose sichtbar gemacht werden.

*Lösungen:*

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

TBST (siehe 4.3.4)

*Durchführung:*

Um Bindungspartner von MVP innerhalb des Zytosols zu ermitteln, wurde 10 µL aufgereinigtes Zytosol (siehe 4.5.2) mit SDS-Probenpuffer versetzt und in einem 15%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe 4.3.1). Anschließend wurden die Proteinbanden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (siehe 4.3.4) und der Blot nach Beendigung der Elektrophorese über Nacht in Renaturierungspuffer bei 4°C auf einem Wiegetisch inkubiert, damit sich die Polypeptide auf der Membran in eine möglichst native Form renaturieren konnten. Am folgenden Tag wurde der Renaturierungspuffer durch zweimaliges Waschen der Membran in Bindungspuffer für je 15 min. entfernt. Im Anschluss wurde die Nitrozellulose mit 2- 5 µg aufgereinigtem His-MVP (siehe 4.3.8) und 100 µM GTP in Bindungspuffer inkubiert. Damit sich Bindungspartner auf der Nitrozellulose finden konnten, wurde die Nitrozellulose in Folie eingeschweißt für 1 h bei RT auf einem Drehtisch inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen in Bindungspuffer und zweimaligem Waschen in TBST für je 10 min. wurde die Nitrozellulose für 1 h bei RT mit 5% Magermilch in TBST abgesättigt. Anschließend folgte die Inkubation mit den Antikörpern (siehe 4.3.5).

#### 4.3.8 Herstellung und Aufreinigung von Fusionsproteinen

Zur Herstellung eines Histidin-Fusionsproteins wurde der entsprechende kodierende DNA-Abschnitt unter Berücksichtigung des Leserasters in den Expressionsvektor pet21a der Firma Novagen inkloniert. Der Expressionsvektor konnte anschließend in einen E. coli Bakterienstamm transformiert werden. Exprimieren die Bakterien das Fusionsprotein, so entsteht ein Protein, welches an seinem C-Terminus sechs angefügte Histidinreste trägt. Über diesen His-Tag kann das Protein im Anschluss an die Expression über eine Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Als Trägermatrix dienen bei einem Histidin-Fusionsprotein Agarosekügelchen, an die Nickel-Ionen gekoppelt sind. Deswegen spricht man von einer *Immobilized metal ion affinity chromatography* (IMAC). Histidin besitzt eine hohe Affinität zu Nickel-Ionen und dadurch wird das Fusionsprotein bei der Aufreinigung über eine Ni-Agarose-Säule an die Matrix gebunden, während Proteine, die keine Abfolge von Histidinen besitzen, mobil bleiben und durch verschiedene Waschschriffe aus der Matrix entfernt werden. Durch eine anschließende Absenkung des pH-Wertes wird die Affinität der Histidine an die

Nickel-Ionen reduziert und das Fusionsprotein wird bei einem bestimmten pH-Wert von der Matrix gelöst.

#### 4.3.8.1 Expression eines Fusionsproteins mit His-Tag

*Lösungen:*

LB-Medium: (siehe 4.1.1)

TB-Medium: (siehe 4.1.1)

pi-Medium: (siehe 4.1.1)

IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-Thiogalactosid, Appllichem): 1 M in ddH<sub>2</sub>O

Eine Flüssigkultur (entweder in LB- oder TB-Medium) wurde mit einer ÜNK angeimpft (siehe 4.1.1) und bei 37°C und 200 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 0,9 inkubiert. Die Expression des Fusionsproteins konnte anschließend mit der Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert werden. Vor der Zugabe wurde eine Probe von der Flüssigkultur abgenommen, um in einem Kontrollgel die Induktion der Proteinexpression überprüfen zu können. Die induzierte Flüssigkultur wurde je nach Fusionsprotein für 3 bis 4 h inkubiert. Es wurde zur Kontrolle der Expression eine weitere Probe abgenommen und die gesamte Kultur bei 5.000 x g für 10 min. und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment wurde bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert.

#### 4.3.8.2 Gewinnung von Fusionsproteinen aus Einschlussvesikeln (Inclusion Bodies)

Die nach der Expression in Bakterien oft unvollständig oder fehlerhaft gefalteten Fusionsproteine werden innerhalb der Bakterienzellen in Inclusion Bodies angesammelt. Um die Fusionsproteine für eine anschließende Aufreinigung vollständig in Lösung zu bekommen, konnten die Inclusion Bodies zunächst aufgereinigt werden.

*Lösungen:*

Wasch-Puffer: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5  
150 mM NaCl

Extraktions-Puffer: 10 mM Tris, pH 8,0  
150 mM NaCl  
1 mM EDTA  
0,5 mM PMSF  
<sup>1</sup>/<sub>1000</sub>  $\beta$ -Mercaptoethanol

Lysispuffer: Extraktions-Puffer + 1% Triton

*Durchführung:*

Nach einer Expression wurden die Bakterienzellen bei 6.000 rpm und 4°C für 10 min. in einer Sorvall-Zentrifuge abzentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in Waschpuffer aufgenommen und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde 2 x wiederholt. Das Sediment konnte zur

Aufbewahrung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren werden. Anschließend wurde das Sediment in Extraktionspuffer resuspendiert und 5 x für 1 min. sonifiziert. Dazwischen erfolgte je eine 1 min. Ruhephase auf Eis. Das Sonifikat wurde für 30 min. bei 11.500 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  in einer Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert und in Lysispuffer aufgenommen. Nach erneutem dreimaligen Sonifizieren wurde die Suspension zentrifugiert und das Sediment mehrmals mit Extraktionspuffer gewaschen. Die aufgereinigten Inclusion Bodies konnten bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert oder für eine Proteinaufreinigung direkt in Harnstoffpuffer aufgenommen werden (vgl. 4.3.8.3).

#### 4.3.8.3 Aufreinigung von Fusionsproteinen mit einem Histidin-Tag unter denaturierenden Bedingungen

Die Aufreinigung aller verwendeten Fusionsproteine erfolgte unter denaturierenden Bedingungen durch die Verwendung von 8 M Harnstoff in den verwendeten Puffern. Nach einer Aufreinigung konnten die Polypeptide durch schrittweise Dialyse des Harnstoffs gegen einen Nidrigsalzpuffer renaturiert werden.

*Lösungen:*

Ni-NTA-Agarose, Quiagen

Lysispuffer/Waschpuffer A:      8 M            Harnstoff  
   100 mM         $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
   10 mM        Tris/HCl  
    $\Rightarrow$  mit NaOH auf pH 8 einstellen

Waschpuffer B:                    8 M            Harnstoff  
   100 mM         $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
   10 mM        Tris/HCl  
    $\Rightarrow$  mit HCl auf pH 6,3 einstellen

Elutionspuffer C:                8 M            Harnstoff  
   100 mM         $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
   10 mM        Tris/HCl  
    $\Rightarrow$  mit HCl auf pH 5,9 einstellen

Elutionspuffer D:                8 M            Harnstoff  
   100 mM         $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
   10 mM        Tris/HCl  
    $\Rightarrow$  mit HCl auf pH 4,5 einstellen

#### 4.3.8.4 Vorbereitung der Säulenmatrix

Die Menge an verwendeter Nickel-NTA-Agarose richtete sich nach dem Expressionsvolumen. Meist wurden Säulenvolumen von 1 mL verwendet. Hierfür wurden 2 mL von der in 30% Ethanol bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagerten Ni-NTA-Agarose in eine leere 5 mL Plastiksäule (Quiagen) pipettiert. Die Agarose wurde mit 5 mL Waschpuffer A überschichtet und durch Entfernen der unteren Kappe der Säule konnte die Pufferflüssigkeit ablaufen, während die Agarose auf dem Säulenfilter sedimentierte. Die Säule wurde anschließend mit dem 10-fachen Matrixvolumen Waschpuffer A äquilibriert und konnte daraufhin mit dem Lysat der aufgeschlossenen Bakterien befüllt werden.

#### 4.3.8.5 Aufschluss der Bakterien

Das aus der Proteinexpression gewonnene Bakteriensediment (siehe 4.3.8.1) wurde zunächst auf Eis aufgetaut oder direkt nach der Zentrifugation in Lysispuffer aufgenommen. Hierbei wurden pro Gramm Sediment 5 mL Puffer eingesetzt. Das Sediment wurde vollständig resuspendiert. Um das in Einschlussvesikeln befindliche Fusionsprotein in Lösung zu bringen, wurde die Suspension 5 x für je 10 sek. sonifiziert. Zwischen den Sonifikationsschritten wurden je 10 sek. Pausen auf Eis eingelegt, damit sich die Suspension nicht erhitzen konnte. Alle Sonifikationsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Anschließend wurde das Sonifikat für 1 h bei RT unter Rotation lysiert. Durch eine nachfolgende 15 min. Zentrifugation bei 10.000 x g wurde die bakterielle DNA und unlösliche Bestandteile sedimentiert und der Überstand konnte auf die zuvor äquilibrierte Ni-NTA-Agarose gegeben werden. Zur Kontrolle ob das Fusionsprotein durch die beschriebenen Arbeitsschritte in Lösung gebracht werden konnte, wurden jeweils Proben vor der Zentrifugation des Bakterienlysats und danach abgenommen. Das Fusionsprotein sollte sich hauptsächlich im Überstand befinden.

#### 4.3.8.6 Aufreinigung über eine Ni-NTA-Agarose-Matrix

Der Überstand des zentrifugierten Sonifikats wurde auf die zuvor äquilibrierte Ni-NTA-Agarose gegeben. Der Durchlauf wurde vollständig aufgefangen und eine Probe zur Kontrolle der Bindung des Fusionsproteins an die Säulenmatrix abgenommen. Der Durchlauf konnte bei -20°C für einen längeren Zeitraum gelagert werden. Anschließend wurde die Säule durch zwei Waschschriffe von bakteriellen Proteinen gereinigt und danach wurde das Fusionsprotein durch Einsetzen der Elutionspuffer von der Matrix gelöst und in definierten Einzelfraktionen aufgefangen. Die Aufreinigung erfolgte nach folgendem Schema:

40faches Säulenvolumen Waschpuffer A	pH 8,0
20faches Säulenvolumen Waschpuffer B	pH 6,3
15faches Säulenvolumen Elutionspuffer C	pH 5,9
10faches Säulenvolumen Elutionspuffer D	pH 4,5

Zu jeder Fraktion ab pH 6,3 wurde  $\frac{1}{10}$  Volumenanteil 1 M Tris/HCl pH 9,5 zur Neutralisation vorgelegt. Das Eluat wurde zu je 1,5 mL aufgefangen und von jeder Fraktion eine Probe für ein Kontrollgel abgenommen. Die eluierten Fusionsproteine konnten in dem denaturierten Zustand mehrere Tage bei 4°C gelagert werden.

#### 4.3.8.7 Aufbereitung der Ni-NTA-Agarose

Die Ni-NTA-Agarose konnte für mehrere Proteinaufreinigungen verwendet werden, jedoch sollte eine Säule nicht für unterschiedliche Fusionsproteine dienen. Direkt nach jeder Aufreinigung wurde die Säule mit reichlich Waschpuffer A gespült und für 30 min. mit 0,5 M NaOH-Lösung inkubiert. Anschließend wurde die NaOH-Lösung aus der Säule entfernt und die Säule mehrmals mit 30% Ethanol gespült. Sie konnte in der Ethanol-Lösung bei 4°C bis zur nächsten Verwendung gelagert werden, um mikrobielles Wachstum zu verhindern.

#### 4.3.8.8 Renaturierung von Proteinen durch Dialyse

Durch die Aufreinigung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen (siehe 4.3.8.3), lagen die Polypeptide entfaltet in Harnstoff-Puffer vor. Durch sukzessive Entfernung des Harnstoffs aus der Lösung können die sich entfalteten Proteine schrittweise rückfalten und ihre ursprüngliche Konstitution annehmen. Die Dialyse findet in einer semipermeablen Membran statt, deren Porengröße sich nach dem zu dialysierenden Protein richtet. Im Gegensatz zu dem Protein können die im Puffer enthaltenen Ionen die Membran passieren. Durch eine langsame Absenkung der Harnstoffkonzentration in dem den Dialyseschlauch umgebenden Medium strömt der Harnstoff aufgrund des osmotischen Gradienten durch die Membran nach außen.

##### *Lösungen:*

PBS:	140 mM	NaCl
	6,4 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	2,6 mM	KCl
	1,4 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

##### *Durchführung:*

Es wurde je nach Protein zwischen einem engporigem (für Proteine bis zu einem Molekulargewicht von > 8.000 Da) oder einem weitmaschigem Dialyseschlauch (für Proteine bis zu einem Molekulargewicht von > 50.000 Da) gewählt (Dialyseschläuche Spectra/Por<sup>®</sup> Dialysis Membrane, Spectrum<sup>®</sup> Laboratories Inc.). Der Dialyseschlauch wurde vor der Verwendung in der passenden Länge zugeschnitten und für 10 min. in ddH<sub>2</sub>O gespült. Ein Ende wurde mit einer Klammer fest verschlossen und die zu dialysierende Proteinlösung eingefüllt. Das andere Ende des Schlauches wurde dann ebenfalls mit einer Klammer verschlossen, wobei darauf geachtet wurde, dass sich genügend Raum für einströmende Lösung innerhalb des Schlauches befand. Die Dialyse wurde in einem großen Gefäß bei 4 °C unter ständigem Rühren nach folgendem Schema durchgeführt:

- Dialyse gegen 6 M Harnstoff in PBS (2 L)
- Alle 30 min. Zugabe 200 mL PBS bis zu einer Konzentration von 1 M Harnstoff in PBS
- Über Nacht Dialyse gegen 1 x PBS in frischem Behälter (2 L)

Das renaturierte Protein wurde am folgenden Tag zur Erhöhung der Konzentration in eine Filtersäule überführt (Amicon<sup>®</sup> Ultra, bzw. Microcon<sup>®</sup>, der Firma Millipore) und auf ein Endvolumen von etwa 100 µL eingengt (nach Herstellerprotokoll). Anschließend wurde die Konzentration mit Hilfe einer BSA-Reihe bestimmt (siehe 4.3.9). Das Protein konnte aliquotiert bei -20°C gelagert werden.

#### 4.3.9 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Zur Bestimmung der Konzentration eines Proteins wurde eine BSA-Standardreihe von 100 ng bis 2 µg BSA angefertigt und diese parallel mit dem zu untersuchenden Protein in einer SDS-Page aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt (siehe 4.3.1 und 4.3.2.1). Nach der Färbung konnte über einen visuellen Vergleich der Proteinbanden die Konzentration des zu untersuchenden Proteins abgeschätzt werden. Alternativ konnte die Konzentration auch photometrisch über den OD<sub>280</sub>-Wert bestimmt werden.

### 4.3.10 Extraktion von Proteinen aus Geweben

Um Proteine aus verschiedenen Gewebetypen eines Organismus zu isolieren, wurde ein Gesamtproteinextrakt nach einem Protokoll von John Newport (Newport and Dunphy, 1992) hergestellt. Die hierfür verwendeten Gewebe und Organe wurden aus einem zuvor getöteten Krallenfrosch entnommen.

#### *Lösungen:*

PBS	(siehe 4.3.8.8)
Anästhesiermedium:	MS 222 (3-Aminobenzoessäure-ethylester-methansulfonat) 0,2% in Leitungswasser
Homogenisierungs-Puffer:	250mM      Sucrose 2,5 mM      MgCl <sub>2</sub> 50 mM      KCl 1 mM      DTT 10 mM      HEPES 20 mM      EDTA 5 <sup>µg</sup> / <sub>mL</sub> Cytochalasin B 0,2 mM      PMSF ⇒ einstellen auf pH 7,7
Triton-X-100	
10% SDS-SL	
DNase I (100 <sup>U</sup> / <sub>µL</sub> )	
2 x SDS-Probenpuffer (siehe 4.3.1)	

#### *Durchführung:*

Der Frosch wurde zur Betäubung für etwa 30 min. in das Anästhesierungsmedium gegeben und anschließend auf Eis gelegt. Nach dem Öffnen der Bauchdecke wurden die gewünschten Organe entnommen und kurz in eiskaltes PBS getaucht, um Verunreinigungen durch Blut zu entfernen. Anschließend wurden die Gewebestücke in dem 10 x Volumen Homogenisierungspuffer aufgenommen und mit einem Ultra-Thurrax<sup>®</sup> (Fa. Bachhofer, Reutlingen) für 1 Minute bei 20.000 rpm auf Eis zerkleinert. Nach der Homogenisierung wurden 1 % Triton-X-100, 0.1% SDS und 10 <sup>U</sup>/<sub>mL</sub> DNase I in der Endkonzentration zugegeben. Nach dem 30 min. Verdau der DNA im 37 °C Brutschrank wurde die Lösung für 5 min. bei 750 x g und 4 °C zentrifugiert, um gröbere Bestandteile zu sedimentieren. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur Weiterverwendung entweder bei -20 °C eingefroren oder sofort 1:1 in 2 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und 20 µl davon per SDS-Page aufgetrennt (siehe 4.3.1).

### **4.3.11 Fällung von Proteinen**

#### **4.3.11.1 Fällung von Proteinen mit Aceton**

Proteine, die sich in einer wässrigen Lösung befanden, konnten durch Zugabe von 9 x Volumenanteilen 100% Aceton p.A. gefällt werden. Die mit Aceton vermengte Lösung wurde gut abgedichtet entweder für 2 h bei -70°C oder über Nacht bei -20°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die gefällten Proteine bei 5.000 x g für 15 min. sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde bei Raumtemperatur luftgetrocknet und konnte anschließend in einer geeigneten Menge SDS-Probenpuffer resuspendiert werden.

#### **4.3.11.2 Fällung von Proteinen mit Methanol und Chloroform**

Für eine Fällung einer wässrigen Proteinlösung wurde diese mit 1 x Volumen 100% Methanol p.A. und 1 x Volumen 100% Chloroform p.A. vermischt. Nach Zugabe von Chloroform wurde die Lösung milchig. Anschließend wurde die Suspension für 5 min. bei 13.000 x g zentrifugiert. Es bildeten sich daraufhin drei Phasen, wobei sich die Proteine in der weißlichen Interphase befanden. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, der verbleibende Rest erneut mit 1 x Volumen 100% Methanol p.A. vermischt. Es folgte eine weitere Zentrifugation für eine Minute bei 13.000 x g. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinsediment für mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Anschließend konnte das Sediment in einer geeigneten Menge SDS-Probenpuffer aufgenommen werden.

#### **4.3.11.3 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure**

Proteine, die sich in einer Sucrose-haltigen Lösung befanden (z.B. fraktionierte Stufen eines Zuckergradienten, siehe 4.5.5), konnten wegen des ausfallenden Zuckers nicht in Aceton gefällt werden und wurden daher mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Zu jeder Probe wurde 100% TCA bis zu einer Endkonzentration von 20% TCA pipettiert und gut vermischt. Die Proteine wurden über Nacht bei 4°C gefällt und am folgenden Tag bei 16.000 x g für 10 min. bei 4 °C sedimentiert. Das Protein-Sediment wurde anschließend mit 500 µL 10% TCA gewaschen und erneut abzentrifugiert. Um die Trichloressigsäure aus dem Sediment zu entfernen, wurde 2 x mit je 500 µL 100% Aceton p.A. (-20°C) gewaschen und dazwischen abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, ohne das Sediment zu lösen und die Proben bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Die Proben konnten nun in einer geeigneten Menge SDS-Probenpuffer aufgenommen und für eine SDS-Page eingesetzt werden.

### **4.3.12 Immunpräzipitation**

Bei einer Immunpräzipitation wird über die Ligandenaffinität eines immobilisierten Antikörpers ein in Lösung befindliches Antigen präzipitiert. Der Antikörper ist zuvor kovalent an ein Substrat gekoppelt worden. Bei der Zugabe eines Zellysats bindet das Antigen mit dessen assoziierten Interaktionspartnern an den Antikörper und kann im Anschluss über ein Polyacrylamidgel analysiert werden.

#### **4.3.12.1 Kopplung und kovalente Bindung von Antikörpern an Protein G Sepharose**

Protein G ist ein Protein, welches sich in der Zellwand von Bakterien der Gattung *Streptococcus* befindet. Es besitzt am C-Terminus drei homologe Bindungsdomänen mit hoher Affinität für die Fc-Region von Immunglobulinen des Isotyps IgG und kann diese somit binden. Die bei den

Experimenten verwendete Sepharose ist mit einem rekombinanten Protein G gekoppelt und kann über spezifische Antikörper deren Antigene binden und somit aus einer Lösung präzipitieren. Hierbei werden die assoziierten Bindungspartner unter bestimmten Bedingungen ebenfalls mit aus der Lösung entfernt und es können Rückschlüsse auf die Zusammensetzung von Proteinkomplexen und Bindungspartnern gezogen werden.

### *Lösungen:*

PBS	(siehe 4.3.8.8)
Triethanolamin:	0,2 M Triethanolamin, pH 8,2
Cross-linking Puffer:	25 mM Dimethylpimelimidat (Sigma) in Triethanolamin
Blockpuffer:	0,1 M Ethanolamin, pH 8,2

Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow (in 20% Ethanol), Ge Healthcare Bio-Sciences AB

### *Durchführung:*

Die Protein G Sepharose wurde vor der Verwendung kräftig resuspendiert und anschließend je 50 µL pro Versuchsansatz in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Sepharose wurde mit 1 mL PBS vermischt und für 5 min. bei 500 x g und 4°C zentrifugiert. Alle folgenden Zentrifugationen wurden bei denselben Einstellungen durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen und die Säule noch 2 x mit 1 mL PBS gewaschen. Zur Bindung der Antikörper wurden 20 µg des entsprechenden Antikörpers in PBS für 1 h mit der äquilibrierten Sepharose auf einem Rolltisch inkubiert. Der Überstand der nicht an die Sepharose gebundenen Antikörper wurde für ein Kontrollgel in Acetion gefällt (siehe 4.3.11.1). Nach der Inkubation wurde 3 x mit PBS gewaschen, um ungebundenen Antikörper vollständig zu entfernen. Anschließend wurde die Sepharose 2 x mit Triethanolamin-Lösung gespült und nach Zugabe von 1 mL Cross-linking Puffer 45 min. auf einem Rolltisch inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde die Sepharose mit 1 mL Blockpuffer gewaschen und danach in Blockpuffer für 1 h auf einem Rolltisch inkubiert. Danach wurde die Sepharose 3 x mit PBS gewaschen und im Allgemeinen direkt weiter verwendet. Für eine mehrtägige Lagerung wurde die Sepharose in 30% Ethanol bei 4°C aufbewahrt.

### **4.3.12.2 Immunpräzipitation unter nativen Bedingungen**

#### *Lösungen:*

PBS	(siehe 4.3.8.8)
Elutionspuffer:	0,1 M Glycin/HCl, pH 2,5

#### *Durchführung:*

Zur Immunadsorption wurde die mit Antikörpern gebundene Protein G Sepharose mit verdünntem *Xenopus*-Eiextrakt (1:2 in PBS) versetzt und für 2 h auf einem Rolltisch inkubiert. Die Sepharose wurde nach der Inkubation für 5 min. bei 500 x g und 4°C abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und in Aceton gefällt (siehe 4.3.11.1). Anschließend wurde 3 x mit PBS gewaschen. Die Elution der an den Antikörper gebundenen Proteine erfolgte durch Inkubation

mit dem zweifachen Sepharose-Volumen an Elutionspuffer. Die Sepharose wurde 3 min. mit dem Elutionspuffer auf einem Rolltisch inkubiert und dann abzentrifugiert. Die eluierten Proteine wurden in Aceton gefällt (siehe oben) und anschließend per SDS-Page analysiert. Die Sepharose wurde anschließend mehrfach mit PBS gewaschen und bis zur Weiterverwendung in PBS mit 0,02% Na-Azid bei 4°C aufbewahrt.

### 4.3.13 Pulldown Assay

Bei einem Pulldown handelt es sich um eine Bindungsstudie in Lösung. Ein mit einem *Tag* versehenes Fusionsprotein wird über die spezifische Ligandenaffinität des angefügten *Tags* an eine Matrix gebunden und dort immobilisiert. Durch Zugabe von anderen sich in Lösung befindlichen Proteinen können nun deren Bindungseigenschaften zu dem zuvor immobilisierten Fusionsprotein überprüft werden. Proteine, die über eine Ligandenaffinität zu dem Fusionsprotein verfügen, können ihrerseits in Wechselwirkung treten und werden ebenfalls in der Matrix immobilisiert. Proteine, die keine Affinität zum Fusionsprotein aufweisen, werden durch Waschschriffe aus der Matrix entfernt, sodass in der Matrix das Fusionsprotein mit den gebundenen Proteinen übrig bleibt. Durch einen Elutionspuffer kann das Fusionsprotein anschließend wieder von der Matrix gelöst werden und zusammen mit den in Wechselwirkung getretenen Proteinen per SDS-Page analysiert werden.

#### 4.3.13.1 Pulldown mit einer Säulenmatrix aus Ni-NTA-Agarose

Wurden Pulldown Experimente mit Nickel-NTA-Agarose (siehe 4.3.8.4) als Matrix durchgeführt, so besaß das Fusionsprotein einen His-Tag. Die Entfernung von unspezifischen Bindungen sowie die finale Elution des Fusionsproteins von der Matrix wurde über das zu Histidin analoge Molekül Imidazol erreicht. Abhängig von der Konzentration lagert sich Imidazol aufgrund der molekularen Analogie an die Ni-Agarose und verdrängt bei hohen Konzentrationen die zuvor an die Matrix gebundenen Histidine. Alternativ kann über eine Absenkung des pH-Wertes die Ligandenaffinität von Histidin an die Matrix vermindert werden.

*Lösungen:*

Ni-NTA-Agarose (Quiagen)

Lysispuffer:                    50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
                                      50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
                                      ⇨ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> mit NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> auf pH 7,4 titrieren  
                                      300 mM NaCl  
                                      10 mM Imidazol

Waschpuffer:                    Lysispuffer mit 20 mM Imidazol

Elutionspuffer:                Lysispuffer mit 250 mM Imidazol

*Durchführung:*

Für ein verwendetes Säulenvolumen von 20 µL pro Versuchsansatz wurden 40 µL der Ni-NTA-Agarose (1:1 in 30% Ethanol) in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß pipettiert und für 5 min. bei 700 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Agarose 2 x mit je 1 mL Lysispuffer gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Bindung des Histidin-gekoppelten Fusionsproteins an die äquilibrierte Säulenmatrix. Hierfür wurden 10-20 µg His-MVP (siehe

4.3.8) in 50 µL Lysispuffer auf die Säule pipettiert und nach gutem Durchmischen für 1 h bei RT auf einem Rolltisch inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurde die Suspension für 2 min. bei 700 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand, welcher ungebundenes Fusionsprotein enthielt, abgenommen. Der Überstand wurde in Aceton gefällt (siehe 4.3.11.1) und diente als Kontrolle für die Bindung des Fusionsproteins an die Matrix. Die Säule wurde im Anschluss 3 x mit je 1 mL Waschpuffer gewaschen, um ungebundenes Fusionsprotein aus der Säule zu entfernen und zwischen den Waschschritten wie zuvor beschrieben zentrifugiert. Es folgte die Inkubation der Säule mit der Proteinlösung, welche die möglichen Bindungspartner enthält. In dieser Studie sollten zytoplasmatische Bindungspartner von MVP gefunden werden. Auf die Säule wurde 40 µL gereinigtes Zytosol gegeben und für 1 h bei RT auf einem Rolltisch inkubiert. Die Säule wurde im Anschluss wie zuvor zentrifugiert und der Überstand der nicht gebundenen zytosolischen Proteine in Aceton gefällt (siehe oben). Um alle ungebundenen Proteine aus der Säule zu entfernen, wurde die Säule 3 x mit je 1 mL Waschpuffer gewaschen. Alle an die Matrix gebundenen Proteine wurden nun durch die Zugabe von 1 mL Elutionspuffer und 2-5 min. Inkubation auf einem Rolltisch von der Säule gelöst. Die Säulen wurden unter den zuvor verwendeten Bedingungen zentrifugiert und der Überstand mit den eluierten Proteinen ebenfalls in Aceton gefällt (siehe oben).

Alle gefällten Proteine wurden in einer geeigneten Menge SDS-Probenpuffer aufgenommen und per SDS-Page aufgetrennt (siehe 4.3.1).

Als Negativkontrolle diente eine Säule, an welche im ersten Schritt kein His-MVP gebunden wurde. Das mit dieser Säule inkubierte Zytosol sollte demnach nicht an die Ni-NTA-Agarose binden können.

Um unspezifische Bindungen des Zytosols an die Ni-Agarose-Matrix zu minimieren, konnte das in den Versuchen verwendete Zytosol vor der Verwendung auf einer separaten Säulen-Matrix für 1 h prä-inkubiert werden. Diese Säule wurde in derselben Art und Weise vorbereitet wie die zuvor beschriebene. Nach der einstündigen Inkubation wurde die Säule mit den üblichen Einstellungen zentrifugiert und der Überstand konnte als prä-inkubiertes Zytoplasma in den Versuchen eingesetzt werden.

#### 4.3.13.2 Pulldown mit einer Säulenmatrix aus Protein G Sepharose

Ähnlich wie bei einer Immunpräzipitation (siehe 4.3.12) wird bei einem Pulldown-Assay der monoklonale Antikörper, welcher sich gegen das zu untersuchende Protein richtet, an die Sepharose kovalent gekoppelt (siehe 4.3.12.1). An den Antikörper wird im nächsten Schritt das Epitop-tragende Protein gebunden und somit in der Matrix immobilisiert. Mit einem Pulldown-Experiment können Proteine, welche eine Bindung an das immobilisierte Protein eingehen, aus einer Lösung herausgezogen werden. Somit kann man Rückschlüsse auf mögliche Bindungspartner des zu untersuchenden Proteins ziehen.

##### *Lösungen:*

PBS (siehe 4.3.8.8)

Elutionspuffer: 0,1 M Glycin/HCl, pH 2,5

##### *Durchführung:*

Die mit Antikörpern gebundene Protein G Sepharose wurde mit 10 – 20 µg Fusionsprotein (siehe 4.3.8) für 1,5 h bei RT auf einem Rolltisch inkubiert. Ungebundenes Fusionsprotein wurde für eine spätere Gelkontrolle in Aceton gefällt (siehe 4.3.11.1). Nach 3 x Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation des an den Antikörper gebundenen Fusionsproteins mit 60 µL Zytosol (1:1 in PBS verdünnt) für 2 h auf einem Rolltisch. Wiederum wurden ungebundene

Proteine in Aceton gefällt und die Sepharose 4 x mit PBS gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch die Zugabe des zweifachen Sepharose-Volumens Elutionspuffer in einer 5 min. Inkubation auf einem Rolltisch. Nach einer Zentrifugation wurden alle eluierten Proteine in Aceton gefällt und die gefällten Proben konnten in einer SDS-Page analysiert werden. Als Negativkontrolle wurde eine Sepharose-Matrix ohne Antikörper nach den oben beschriebenen Schritten verwendet.

## 4.4 Lipidbiochemische Methoden

### 4.4.1 Herstellung von unilamellaren Liposomen

1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin (POPC) (Avanti Polar Lipids, Inc.) wurde in Chloroform gelöst und in einem Kolben unter einem 35°C Stickstoff-Strom zu einer dünnen Schicht getrocknet (Broekhoven et al., 2000). Der Lipidfilm wurde mit einer Lösung aus 1 mM des Membran-impermeablen und pH-sensitiven Farbstoffes 8-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfonsäure Trinatriumsalz (HPTS, Invitrogen) in ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Die entstandene 13 mM Lipid-Suspension wurde in einem Ultraschall-Bad (BRANSON 2200) beschallt, um große multilamellare Vesikel herzustellen. Die Vesikel-Suspension wurde durch mehrfache Sonifikation für 15 min. mit Kühlungsphasen auf Eis (BRANSON Sonifikator 250) beschallt. Durch diese Behandlung konnten sich kleine unilamellare Vesikel bilden, welche den Farbstoff HPTS eingeschlossen haben. Die Liposomen-Suspension wurde anschließend gegen ddH<sub>2</sub>O dialysiert, um HPTS außerhalb der Liposomen zu entfernen. Die Liposomen konnten bei 4°C für einige Tage gelagert werden.

### 4.4.2 Liposomen-Perforations-Assay

Um einen direkten Nachweis einer Beeinflussung von Phospholipidmembranen durch His-MVP zu erlangen, wurde ein Assay mit Liposomen durchgeführt, welche den pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff HPTS (siehe 4.4.1) beinhalten. HPTS emittiert je nach pH-Wert unterschiedlich stark, d.h. eine pH-Wert-Änderung ruft Erhöhungen oder Verminderungen der emittierten Fluoreszenz hervor. Die für den Versuch verwendeten Liposomen wurden in pH-neutralem ddH<sub>2</sub>O hergestellt. Bei einer Anregung bei 454 nm und neutralem pH emittiert HPTS nur sehr schwach. Wird der pH-Wert erhöht, so emittiert HPTS bei gleicher Anregungs-Wellenlänge stark.

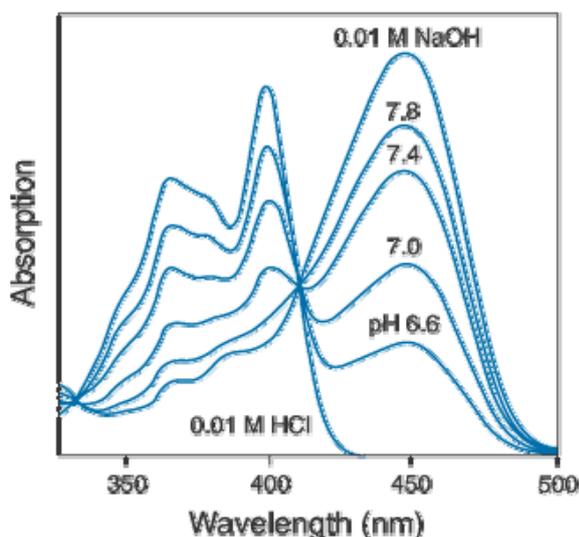
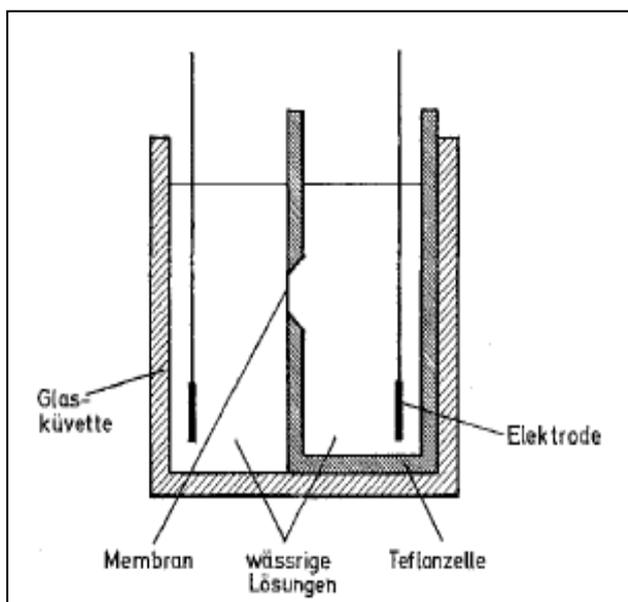


Abb. 4.4: pH-abhängiges Absorptionsspektrum von HPTS (aus Invitrogen-Handbuch)

Die mit HPTS befüllten unilamellaren Liposomen wurden mit NaOH in einer Endkonzentration von 0,1 mM in eine Mikrotiterplatte vorgelegt. Um den Einstrom von NaOH in die Liposomen zu bestimmen, wurde die Fluoreszenz mit einem Mikrotiterplatten Spektrometer gemessen. Zur Messung der höchsten Emissionsstärke durch Zerstörung der Liposomenstruktur, wurden die Liposomen in 0,1 mM NaOH mit SDS in einer Endkonzentration von 0,04% versetzt und die Fluoreszenzintensität gemessen. Um eine Perforation der Liposomen durch His-MVP zu messen, wurden Liposomen in 0,1 mM NaOH mit 4  $\mu$ M His-MVP versetzt und die Extinktion mit dem Spektrometer ausgemessen. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit 4  $\mu$ M BSA.

#### 4.4.3 Porenbildung in künstlichen Lipidfilmen

Durch Verwendung von künstlichen Lipidmembranen nach einer von Müller (Müller et al., 1962) beschriebenen Methode können Vorgänge an biologischen Membranen *in vitro* nachvollzogen werden. Die künstlichen Membranen besitzen eine Dicke von 60 bis 70 Å und ähneln in ihren physikalischen Eigenschaften denen biologischer Membranen, wie der Kernmembran. Zum Erzeugen einer „schwarzen“ Lipidmembran wurde eine Lösung von 1% (w/v) Diphytanoyl-Phosphatidylcholin (DiphPC, Avanti Polar Lipids, Alabaste, AL) in n-Dekan auf die Blendenöffnung einer Teflonzelle aufgebracht (nach Benz et al. 1978). Die Blendenöffnung besitzt eine Oberfläche von 0,4 mm<sup>2</sup> und befindet sich in wässriger Umgebung. Es bildet sich ein Flüssigkeitsfilm auf der Lochblende, der Interferenzfarben zeigt. Nach dem Abfließen des überschüssigen Lipids bildet sich eine einheitlich dünne Membranschicht, welche Licht nur noch schwach reflektiert und deshalb als „schwarze“ Membran bezeichnet wird. Einzelkanal-Leitfähigkeiten wurden über Ag/AgCl-Elektroden gemessen, welche über eine Salzbrücke miteinander verbunden und mit einer Spannungsquelle und Stromverstärker (Keithley 427) in Serie geschaltet sind. Das verstärkte Signal wurde mit einem Oszilloskop sichtbar gemacht und mit einem Stripchart-Rekorder aufgezeichnet. Um die Porenbildung von His-MVP zu untersuchen, wurde eine Stammlösung des Fusionsproteins (12  $\mu$ M Protein 1:10 verdünnt mit 1% Genapol) in die Teflonkammer gegeben und die Leitfähigkeit gemessen. Als Kontrolle dienten BSA und His-Man1 (Dissertation Martin Gareiß) in derselben Konzentration wie His-MVP. Als Elektrolyt diente in den Versuchen 1 M KCl (in Reinheitsgrad für die Analytik, Merck, Darmstadt).



**Abb. 4.5:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus einer Teflonkammer mit Lochblende für die Herstellung einer artifiziellen Lipidmembran



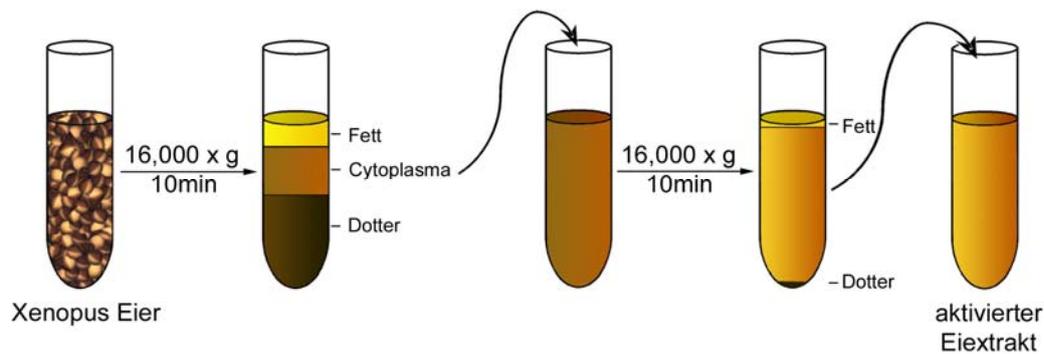


Abb. 4.6: Herstellung von aktiviertem Eiextrakt

#### 4.5.2 Herstellung von membranfreiem Zytosol (S200)

##### Durchführung:

Zur Trennung der Membranfraktion von den löslichen Bestandteilen des aktivierten Eiextrakts wurde die gewünschte Menge Eiextrakt in einer Ultrazentrifuge für 1 h bei 100.000 x g zentrifugiert (SW55 Ti Rotor, Beckman). Hierfür wurden Zentrifugenröhrchen mit einem Volumen von 700  $\mu$ L verwendet (Ultra-Clear™ Centrifuge Tubes, Beckman). Durch die Zentrifugation sedimentierten im Eiextrakt enthaltene Pigmentrückstände und Glykogen. Der Überstand wurde mit einer Kanüle durch seitliches Einstechen in das Zentrifugenröhrchen oberhalb der Glykogenschicht entnommen und in ein neues Röhrchen überführt. Es folgte eine erneute Zentrifugation für 2 h bei 200.000 x g, bei welcher alle im Extrakt enthaltenen Membranen sedimentieren. Das membranfreie durchsichtige Zytosol konnte mit einer Kanüle vorsichtig abgenommen werden. Hierbei wurde darauf geachtet, dass keine Membranbestandteile mit resuspendiert wurden. Das Zytosol wurde aliquotiert in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert.

#### 4.5.3 Herstellung von mitotischem Eiextrakt

Unbefruchtete Eier von *Xenopus laevis* sind bis zu ihrer Befruchtung bzw. Aktivierung in der Metaphase der Meiose II arretiert. Die Bestandteile der Kernhülle liegen in gelöster Form vor. In diesem Zustand ist die Kernhülle in Membranvesikel dissoziiert. Durch Zugabe von Phosphataseinhibitoren und Calciumchelatoren bleiben die Membranvesikel vereinzelt und können nicht miteinander fusionieren. Die Herstellung von mitotischem Eiextrakt erfolgte nach einer von Newmeyer und Wilson (1991) entwickelten Methode.

##### Lösungen:

MMR:

(siehe 4.5.1)

M-Lysispuffer:

80 mM	$\beta$ -Glycerophosphat, pH 7,4
20 mM	EGTA, pH 8,0
15 mM	MgCl <sub>2</sub>
1 mM	DTT

*Durchführung:*

Wie unter 4.5.1 beschrieben wurden weibliche *Xenopus laevis* zur Eiablage stimuliert, die Gallerthülle mit 2% Cysteinlösung entfernt und die Eier mehrfach mit MMR gespült. Anschließend wurden die Eier 3 x mit eisgekühltem M-Lysispuffer gewaschen und mit einer Transferpipette in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und 6 sek. bei 3.000 x g und 4°C zentrifugiert. Nach der Entnahme von überschüssigem Puffer wurden die Protease-Inhibitoren Aprotinin und Leupeptin in einer Endkonzentration von 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  hinzugegeben. Die Eier wurden anschließend durch eine 10 min. Zentrifugation bei 16.000 x g fraktioniert und die mittlere zytoplasmatische Phase mit einer Kanüle entnommen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der gereinigte mitotische Eiextrakt nochmals mit Protease-Inhibitoren versetzt (Aprotinin und Leupeptin in einer Endkonzentration von 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) und entweder direkt weiterverarbeitet oder aliquotiert in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

#### 4.5.4 Subzelluläre Fraktionierung von *Xenopus* Eiextrakt

Um den im *Xenopus* Eiextrakt enthaltenen Membrananteil von Protein-Komplexen und -Aggregaten des Zytoplasmas zu trennen, wurde 700  $\mu\text{L}$  Eiextrakt in einer Ultrazentrifuge für 1 h bei 100.000 x g zentrifugiert (SW55 Ti Rotor, Beckman). Die Membranen verbleiben im Überstand (S100), während komplexierte Proteine sedimentieren (P100). Beide Fraktionen wurden getrennt abgenommen und für Immunblot-Analysen verwendet.

#### 4.5.5 Isolierung von Membranfraktionen aus mitotischem Eiextrakt

*Lösungen:*

Puffer 6

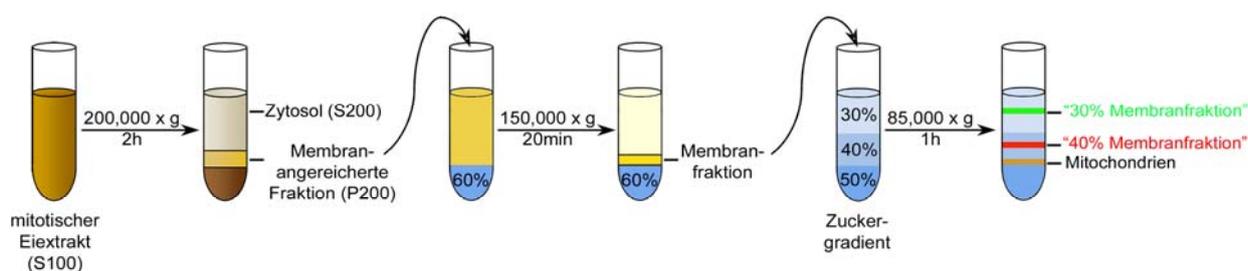
(siehe 4.5.1)

30% Sucrose in Puffer 6

40% Sucrose in Puffer 6

50% Sucrose in Puffer 6

60% Sucrose in Puffer 6

*Durchführung:*

**Abb. 4.7:** Isolation von Membranfraktionen aus mitotischem Eiextrakt

Zur Isolation von Membranfraktionen wurde mitotischer Eiextrakt (siehe 4.5.3) verwendet, welcher bei 100.000 x g für 1 h bei 4°C zentrifugiert wurde (SW55 Ti Rotor, Beckman). Der Überstand (S100) wurde mit einer Kanüle entnommen und 1:1 mit M-Lysispuffer verdünnt. Die

Membranen wurden anschließend durch eine 2 h Zentrifugation bei 200.000 x g und 4°C vollständig sedimentiert und konnten mit einer Kanüle entnommen werden. Die Membranen (P200) wurden nun in 20-fachem Volumen eisgekühltem Puffer 6 resuspendiert und durch eine 20 min. Zentrifugation bei 40.000 x g und 4°C auf einem 60% Sucrose-Kissen sedimentiert. Die so gereinigten Membranen wurden vorsichtig abgenommen und auf einen zuvor vorbereiteten Sucrose-Gradienten gegeben. In einem Beckman-Zentrifugenröhrchen (Ultra-Clear™ Centrifuge Tubes, Beckman) wurde der Gradient diskontinuierlich beginnend mit 50%- bis zu 30% Sucrose-Lösung pipettiert und die einzelnen Phasengrenzen markiert. Auf die 30% Sucrose-Schicht wurden die resuspendierten Membranen gegeben und für 1 h bei 30.000 x rpm und 4°C (SW55 Ti Rotor, Beckman) aufgetrennt. Es bildeten sich drei verschiedene Phasen. Neben einer Schicht zwischen der 50- und 40% Sucrose-Lösung, welche Mitochondrien enthält (siehe Dissertation Friederike Vollmar), trennten sich die Membranvesikel in eine Fraktion innerhalb der 30% Sucrose-Lösung und eine Schicht innerhalb der 40%-Sucrose-Lösung auf. Die drei Fraktionen wurden einzeln abgenommen und aliquotiert in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zu der Verwendung konnten die Membranen bei -70°C gelagert werden.

#### **4.5.6 Flotationszentrifugation von Membranen**

*Lösungen:*

Puffer 6 (siehe 4.5.1)

30% Sucrose in Puffer 6

40% Sucrose in Puffer 6

90% Sucrose in Puffer 6

Um die Assoziation von Proteinen mit Membranen zu belegen, wurde eine Flotationszentrifugation durchgeführt. Proteine, die mit bestimmten Membranen assoziiert vorliegen, steigen im Zuge der Flotation innerhalb eines Zuckergradienten zu ihrer jeweiligen Dichte. Proteine, die nicht mit den Membranen assoziiert sind, bleiben dagegen im Sediment des Gradienten. Für die Flotation der 30% Membranfraktion wurden 80 µL der aufgereinigten Membranvesikel (siehe 4.5.5) mit demselben Volumen von 90% Sucrose in Puffer 6 vermischt und in einem Ultrazentrifugenröhrchen (Ultra-Clear™ Centrifuge Tubes, Beckman) zur Bildung eines diskontinuierlich aufsteigenden Gradienten nacheinander mit 40% und 30% Sucroselösung überschichtet. Die einzelnen Phasengrenzen wurden von außen am Röhrchen markiert und der Gradient zur Flotation der Membranen 4 h bei 35.000 rpm und 4°C zentrifugiert (SW55 Ti Rotor, Beckman). Die drei Fraktionen, bestehend aus 60%, 40% und 30% Sucrose, wurden getrennt abgenommen und die darin enthaltenen Proteine mit 20% Trichloressigsäure gefällt (siehe 4.3.11.3) und anschließend anhand eines Immunblots analysiert (siehe 4.3.4).

#### **4.5.7 Extraktion von Membranen mit Epigen und NaCl**

*Lösungen:*

Puffer 6: (siehe 4.5.1)

1 M NaCl in Puffer 6

30% Empigen BB<sup>TM</sup>, Calbiochem

*Durchführung:*

Um MVP von der 30% Membranfraktion zu extrahieren, wurden die Membranvesikel mit NaCl und Empigen behandelt (Lowthert et al., 1995). Für einen Extraktionsansatz wurden 200 µL der 30% Membranfraktion (siehe 4.5.5) mit 700 µL 1 M NaCl und 66,65 µL Empigen und 33,35 µL Puffer 6 versetzt und für 30 min. auf Eis inkubiert. Das entspricht einer Endkonzentration von 750 mM NaCl und einer Empigen-Endkonzentration von 2%. Durch die Behandlung wurden die an den Membranen assoziierten Proteine in Lösung gebracht. Durch eine nachfolgende Zentrifugation bei 10.000 x g und 4°C für 20 min. wurden die extrahierten Membranvesikel sedimentiert. Der Überstand mit den gelösten Protein wurde abgenommen und das Membransediment in Puffer 6 resuspendiert. Es konnte anschließend für eine Membranfärbung (siehe 4.5.8) verwendet werden.

#### 4.5.8 Färbung von Membranvesikeln mit Fluoreszenzfarbstoffen

Um Membranvesikel in der Lichtmikroskopie sichtbar zu machen, wurden Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, die aufgrund ihrer zu Phospholipiden homologen Molekülstruktur kovalent in Membranen integriert werden können.

*Lösungen:*

PBS: (siehe 4.3.8.8)

S250-Puffer: 50 mM KCl  
2,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
20 mM Hepes  
⇒ mit KOH auf pH 7,5 einstellen

Puffer 6: (siehe 4.5.1)

3,3'-Diocadecyloxycarbocyanin Perchlorat (DiOC<sub>18</sub>), 0,2 mg/mL in DMSO, Invitrogen  
1,1'-Diocadecyl-3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanin Perchlorat (DiIC<sub>18</sub>), 0,2 mg/mL in DMSO, Invitrogen

*Durchführung:*

Je 20 µL der zu färbenden Membranfraktion wurden mit 20 µL des in S250 verdünnten Fluoreszenzfarbstoffes (Stammlösungen 0,2 mg/mL, 1:100 in S250) versetzt und für 20 min. auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 45 x Volumenanteilen S250 wurde die Probe bei 10.000 x g und 4°C für 10 min. zentrifugiert. Farbkristalle, die nicht in die Membranen integriert waren, blieben im Überstand. Das gefärbte Membransediment wurde in Puffer 6 resuspendiert und konnte für Folgeversuche direkt verwendet werden.

#### 4.5.9 Isolierung von Spermienchromatin

##### Lösungen:

SuNaSp:	250	mM	Sucrose
	75	mM	NaCl
	0,5	mM	Spermidin, Serva, Heidelberg
	0,15	mM	Spermin, Serva, Heidelberg

##### Durchführung:

Einem anästhesierten (siehe 4.3.10) männlichen Krallenfrosch wurden beidseitig die Hoden operativ entfernt und in je ein 1,5 mL Reaktionsgefäß, befüllt mit eisgekühltem SuNaSp, überführt. Mit einer Schere wurden die Hoden zerkleinert und anschließend mit einem Homogenisator homogenisiert. Durch eine 3 min. Inkubation auf Eis konnten größere Gewebestücke sedimentieren, der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Der Suspension wurde im Folgenden für 5 min. bei 850 x g und 4°C sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 600 µL Lysolecithin (1 mg/mL in 75 mM NaCl) resuspendiert und für 35 min. bei RT inkubiert. Durch das Lysolecithin werden Membranen vom Spermienchromatin dissoziiert (Methode nach Vigers und Lohka, 1991). Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1 mL 3% BSA (in SuNaSp) und eine 2 min. Inkubation auf Eis abgestoppt. Das Chromatin wurde danach bei 2.600 x g für 10 min. und 4°C sedimentiert und daraufhin 3 x mit je 1 mL SuNaSp gewaschen. Anschließend wurde das Spermienchromatin mit 30% Glycerin in SuNaSp resuspendiert und aliquotiert in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Verwendung wurde das Spermienchromatin bei -70°C gelagert.

Nach dem Auftauen auf Eis wurde das Spermienchromatin zur Verwendung 3 x mit je 1 mL SuNaSp gewaschen und in einem geeigneten Volumen SuNaSp resuspendiert. Die Konzentration wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (siehe 4.5.10).

#### 4.5.10 Auszählen von Teilchensuspensionen mit der Neubauer-Zählkammer

Die Konzentrationsbestimmung von Partikeln in Lösung, z.B. Spermienchromatin, erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Vor der Auszählung wurde die Kammer und das Deckglas mit Ethanol gereinigt und das Deckglas so auf die Kammer geschoben, dass sich Newton'sche Ringe bildeten. Die Höhe des Zwischenraums zwischen Zählkammer und Deckglas liegt somit in der Größenordnung der Lichtwellenlängen, ist also zu vernachlässigen. Die Kammer ist mit zwei Zählfeldern ausgestattet, wobei 16 Quadrate ein Zählquadrat bilden. Die Fläche dieses Quadrats beträgt 1 mm<sup>2</sup>, die Höhe bei korrekt aufgesetztem Deckgläschen 0,1 mm. Somit ergibt sich für ein Großquadrat ein Volumen von 0,1 mm<sup>3</sup>. Zum Bestimmen der Konzentration einer verdünnten Lösung von Spermienchromatin wurde ein Großquadrat ausgezählt und nach folgender Formel die Anzahl im Gesamtvolumen berechnet:

$$\text{Anzahl Teilchen} \times 10^4 \times \text{Verdünnung aufgetragener Lösung} \\ = \\ \text{Anzahl Teilchen pro mL}$$

#### 4.5.11 Aufreinigung von Vault-Komplexen

##### *Lösungen:*

MES-Puffer: 0,09M MES (2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure)  
0,01 M Natriumphosphat  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,5 mM EGTA  
⇒ auf pH 6,5 einstellen

MES-Sucrose-Puffer: MES-Puffer mit 0,25 M Sucrose

Anästhesiermedium: (siehe 4.3.10)

##### *Durchführung:*

Vier männlichen Krallenfröschen wurden nach der Betäubung die Leber entnommen und in eiskühlem MES-Sucrose-Puffer gewaschen. Mit einer Schere wurden die Organe in kleine Stücke zerschnitten und mit einem Teflon-Glas-Homogenisator homogenisiert. Um größere Gewebestücke zu entfernen, wurde das Homogenisat durch eine Mullbinde filtriert. Nach einer 10 min. Zentrifugation bei 650 x g und 4°C wurde die Suspension erneut durch eine Mullbinde filtriert und nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde auf Eis gelagert und das Sediment nach einer weiteren Homogenisation in 2 x Volumenanteilen MES-Sucrose-Puffer abzentrifugiert und wieder mit dem Überstand vereinigt. Neben Leber diente auch 6 mL aktivierter Eiextrakt (siehe 4.5.1) als Ausgangsmaterial. Leber- und Eiextrakt wurden für 30 min. bei 20.000 x g und 4 °C (Beckman-Rotor Ti50) zentrifugiert und der Überstand erneut bei 40.000 x g zentrifugiert. Die Sedimente wurden in je 10 mL MES-Puffer (+14% Ficoll und 14% Sucrose) resuspendiert. Nach einer Zentrifugation bei 40.000 x g und 4°C für 40 min. (Beckman-Rotor SW55.1) wurde der Überstand in 4 x Volumenanteilen MES-Puffer vermengt und erneut bei 40.000 x g für 2 h zentrifugiert (Beckman-Rotor Ti50). Die Sedimente beider Ansätze wurden in MES-Puffer resuspendiert und auf einen diskontinuierlichen Zuckergradienten aufgetragen. Der Zuckergradient bestand aus 40, 30, 20, 10 und 5% Sucrose in MES-Puffer. Nach einer Zentrifugation bei 100.000 x g und 4°C für 1 h (Beckman-Rotor SW41) wurde die leicht rötliche Schicht der 5%-Sucrose abgenommen und 1:1 in MES-Puffer verdünnt. Diese Suspension wurde auf einen weiteren Zuckergradienten, bestehend aus 60, 55, 50, 45, 40 und 30% Sucrose in MES-Puffer aufgetragen und für 16 h bei 100.000 x g und 4°C (Beckman-Rotor SW41) zentrifugiert. Am folgenden Tag wurden die angereicherten Vault-Komplexe aus der Phasengrenze zwischen 50 und 45% Sucrose-Schicht mit einer Kanüle entnommen und in 4 x Volumenanteilen MES-Puffer verdünnt. Eine anschließende Zentrifugation bei 100.000 x g und 4°C für 90 min. (Beckman-Rotor SW55.1) führte zu einem Sediment der aufgereinigten Vault-Komplexe. Die Vault-Komplexe, die der Froschleber entstammten, wurden in 200 µL Puffer 6 aufgenommen, die des Eiextrakts in 50 µL. Die aufgereinigten Vault-Komplexe wurden aliquotiert schockgefroren und bei -70°C gelagert.

#### 4.5.12 Bildung von Vault-ähnlichen Partikeln

##### Lösungen:

Puffer 6: (siehe 4.5.1)

##### Durchführung:

Um zu testen, ob die MVP-vermittelte Bildung von Kernporenkomplexen auf MVP-Monomeren allein oder auf aus MVP-Monomeren zusammengesetzten Vault-Partikeln beruht, wurde die eventuelle Bildung von Vault-ähnlichen Partikeln durch das MVP-Fusionsprotein ermöglicht. Hierfür wurde 5 µg His-MVP (siehe 4.3.8) in 50 µL Zytosol (siehe 4.5.2) für 30 min. bei RT inkubiert und anschließend mit Puffer 6 auf 600 µL aufgefüllt. Die Probe wurde für 1 h bei 100.000 x g zentrifugiert (Beckman-Rotor SW55.1) und der Überstand (S100) sowie das Sediment (P100) getrennt abgenommen. Um den jeweiligen Anteil an MVP in beiden Fraktionen zu ermitteln, wurden die Polypeptide mit Trichloressigsäure gefällt (siehe 4.3.11.3) und in einem Immunblot analysiert (siehe 4.3.4). Um die freien MVP-Monomere der S100-Fraktion und die aggregierten Vault-ähnlichen Partikel der P100-Fraktion auf die Bildung von Kernporenkomplexen zu testen, wurde die S100-Fraktion eines zweiten Ansatzes mit Hilfe einer Filter-Säule auf ein Volumen von etwa 50 µL eingeengt (Microcon<sup>®</sup>, der Firma Millipore, nach Herstellerprotokoll). Die P100-Fraktion wurde in 10 µL Puffer 6 resuspendiert. Die Bildung von Kernporenkomplexen in porenlosen Kernen (siehe 4.5.14.2) wurde durch die Zugabe von 20 µL der konzentrierten S100- bzw. 10 µL der in Puffer 6 gelösten P100-Fraktion getestet und anschließend durch immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen untersucht.

#### 4.5.13 Bildung von in vitro Kernen

##### 4.5.13.1 Bildung von in vitro Kernen in *Xenopus laevis* Eiextrakt

Die Rekonstitution von in vitro Kernen erfolgte nach einer 1987 von Newport entwickelten Methode, bei der sich nach Zugabe von Chromatin in Eiextrakt schrittweise eine funktionsfähige Kernhülle um das Chromatin bildet. Diese in vitro Kerne ähneln in ihrer Größe und Form in vivo Kernen.

##### Lösungen:

ATP-regenerierendes System:	0,1 M	ATP in Puffer 6 (siehe 4.5.1)
	1 M	Kreatinphosphat in Puffer 6
	5 mg/mL	Kreatinkinase in Puffer 6

##### Durchführung:

Pro Versuchsansatz wurden 50 µL aktivierter Eiextrakt (siehe 4.5.1) auf Eis aufgetaut und anschließend je 1 x 10<sup>6</sup> Spermien/mL (siehe 4.5.9) und 1 µL ATP-regenerierendem System zugegeben. Nach vorsichtigem Vermischen wurde der Ansatz für 2 h bei RT inkubiert. Die im Extrakt gebildeten in vitro Kerne konnten im Anschluss unter dem Mikroskop untersucht bzw. für eine Immunfluoreszenz verwendet werden (siehe 4.6.4).

#### **4.5.13.2 Bildung von in vitro Kernen in Zytosol mit Membranfraktionen**

Für einen Rekonstitutionsansatz wurden 40 µL aufgereinigtes Zytosol (siehe 4.5.2) mit je 20 µL 40- und 30% Membranfraktion (siehe 4.5.5),  $1 \times 10^6$  Spermien/mL (siehe 4.5.9) und 1 µL ATP-regenerierendem System (siehe 4.5.13.1) versetzt und für 2 h bei RT in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß inkubiert. Um das Verhalten der isolierten Membranfraktionen im Einzelnen zu untersuchen, wurden zu dem oben beschriebenen Ansatz aus Spermien und Zytosol jeweils nur 20 µL einer der beiden Membranfraktionen zugesetzt. Die gebildeten in vitro Kerne wurden entweder für die Immunfluoreszenz oder die Elektronenmikroskopie fixiert.

#### **4.5.14 Bildung von porenlosen in vitro Kernen**

##### **4.5.14.1 Bildung von porenlosen Kernen in vorinkubiertem Extrakt mit Annulate Lamellae**

Die Bildung von Annulate Lamellae in *Xenopus* Eiextrakt wurde, wie von Dabauvalle 1991 beschrieben, durchgeführt. Zu 50 µL aktiviertem Eiextrakt (siehe 4.5.1) wurde 1 mL ATP-regenerierendes System (siehe 4.5.13.1) gegeben und der durchmischte Ansatz für 4 h bei RT, mit gelegentlicher Durchmischung, inkubiert. Zu diesem vorinkubierten Extrakt wurden  $1 \times 10^6$  Spermien/mL und 1 µL ATP-regenerierendes System gegeben und für nochmals 2 h bei RT inkubiert. Es bildeten sich porenlose in vitro Kerne, die meist für eine Immunfluoreszenz verwendet wurden (siehe 4.6.4).

##### **4.5.14.2 Bildung von porenlosen Kernen aus Zytosol und 40% Membranfraktion**

Zu 40 µL gereinigtem Zytosol (siehe 4.5.2) wurden 20 µL der 40% Membranfraktion (siehe 4.5.5), 1 µL ATP-regenerierendes System und  $1 \times 10^6$  Spermien/mL gegeben und vermischt. Eine Inkubation für 1h bei RT führte zur Bildung von porenlosen Kernen, die sich morphologisch und funktionell nicht von den in 4.5.14.1 beschriebenen Kernen unterschieden. Die Bildung einer Doppelmembran wurde durch die Fluoreszenz von Membranfarbstoffen (siehe 4.5.8) und durch Elektronenmikroskopie untersucht.

#### **4.5.15 Rekonstitution von Kernporen durch 30% Membranen und His-MVP**

Um in porenlosen in vitro Kernen die Neubildung von Kernporenkomplexen zu initiieren, wurde zu den in 4.5.13.2 beschriebenen porenlosen Kernen entweder 20 µL der 30% Membranfraktion oder 2,5 µg aufgereinigtes His-MVP (siehe 4.3.8) zusammen mit 1 µL ATP-regenerierendem System zugegeben und der Ansatz für 1 h bei RT inkubiert. Die Proben wurden anschließend für Immunfluoreszenzen oder elektronenmikroskopische Untersuchungen verwendet.

#### **4.5.16 Bildung von in vitro Kernen nach Colchizin-Behandlung**

Um die Rolle von Mikrotubuli während der Kernporenkomplex-Bildung durch MVP zu analysieren, wurden Versuche mit dem Wirkstoff Colchizin durchgeführt. Colchizin ist ein toxisches Alkaloid und wird aus der Pflanze Herbstzeitlose (*Colchicum autumnale*) isoliert. Colchizin ist ein Mitose-Hemmstoff, da er an freie Mikrotubuli-Untereinheiten binden kann und somit eine Polymerisation der Mitose-Spindelfasern verhindert. Durch den fehlenden Spindelapparat kommt es zu keiner Separation der Schwesterchromatiden und es bildet sich eine Zelle mit sowie eine ohne Zellkern. In der Zelle mit Zellkern kommt es durch Verdopplung der

Chromatiden während der Interphase zu einer Polyploidisierung, in dessen Folge die Zellen sterben.

Um die Polymerisierung von Mikrotubuli im zellfreien System zu verhindern, wurden die Extrakte mit Colchizin (Sigma) in einer Endkonzentration von 0,08  $\mu\text{M}$  behandelt und für 5-10 min. bei RT inkubiert, bevor die Bildung der *in vitro* Kerne durch Zugabe von Spermienchromatin und ATP-regenerierendem System initiiert wurde (siehe 4.5.13.1). Die ausbleibende Bildung von Mikrotubuli wurde durch Immunfluoreszenzen mit Antikörpern gegen  $\beta$ -Tubulin kontrolliert. Als Kontrolle wurden jeweils Proben ohne Colchizin-Behandlung verwendet.

#### 4.5.17 Bildung von Mikrotubuli *in vitro*

*Lösungen:*

PBS: (siehe 4.3.8.8)

SuNaSp: (siehe 4.6.9)

*Durchführung:*

Für die Bildung von Mikrotubuli wurden pro Versuchsansatz  $1 \times 10^6/\text{mL}$  Spermien in 50  $\mu\text{L}$  SuNaSp mit einer Cytospin-Zentrifuge bei 1.000 x rpm und 4°C für 10 min. auf einen Objektträger zentrifugiert. Sofort nach der Zentrifugation wurden die Spermien mit 40  $\mu\text{L}$  Zytosol (siehe 4.5.2) bzw. 50  $\mu\text{L}$  Eiextrakt (siehe 4.5.1), zusammen mit 1  $\mu\text{L}$  ATP-regenerierendem System (siehe 4.5.13.1) überschichtet und in einer Feuchtkammer bei RT für 1-30 min. inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Objektträger kurz in PBS gespült und danach für 10 min. in 100% Methanol bei -20°C fixiert. Im Anschluss an eine Lufttrocknung wurden die Proben für eine Immunfluoreszenz verwendet.

Um die Interaktion von Mikrotubuli mit den isolierten Membranfraktionen (siehe 4.5.5) zu analysieren, wurde die Bildung von Mikrotubuli durch Zugabe von Zytosol auf Spermien, wie oben beschrieben, initiiert. Nach 10 min. wurden die mit Membranfarbstoffen gefärbten Membranfraktionen (siehe 4.5.8) einzeln zu je einem Ansatz pipettiert und nach 10 min. Inkubation wie oben beschrieben behandelt und anschließend für eine Immunfluoreszenz verwendet.

#### 4.5.18 Inhibierung von Kinesinen in *Xenopus* Extrakten

Um die Funktion von bestimmten Kinesinen im zellfreien System zu inhibieren, wurde *Xenopus* Eiextrakt (siehe 4.5.1) mit je 2,5  $\mu\text{g}$  des jeweiligen Kinesin-Antikörpers ( $\alpha$ -Mklp2,  $\alpha$ -Eg5) in einem Endvolumen von 50  $\mu\text{L}$  für 10 min. inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von  $1 \times 10^6$  Spermien und 1  $\mu\text{L}$  ATP-regenerierendem System, um die Bildung von *in vitro* Kernen zu gewährleisten (vgl. 4.5.13.1). Alternativ erfolgte die Inhibition der Kinesine durch die Zugabe des Antikörpers zu Zytosol. Zu dem Kinesin-inhibierten Zytosol wurde Spermienchromatin, Energie und 20  $\mu\text{L}$  40% Membranfraktion hinzugefügt und der Ansatz für 1 h inkubiert, damit sich porenlose Kerne bilden konnten (vgl. 4.5.14.2). Zu den porenlosen Kernen erfolgte die Zugabe von 20  $\mu\text{L}$  30% Membranen oder von 2,5  $\mu\text{L}$  His-MVP (siehe 4.3.8) und der Ansatz wurde für eine weitere Stunde inkubiert. Die Kinesin-inhibierten Proben wurden für immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen verwendet (siehe 4.6.4)

## 4.5.19 Arbeiten mit *Xenopus laevis* Embryonen

### 4.5.19.1 In vitro Fertilisation

#### Lösungen:

Anästhesiermedium:	(siehe 4.3.10)
MMR:	0,1 M NaCl 20 mM KCl 10 mM MgSO <sub>4</sub> 20 mM CaCl <sub>2</sub> 50 mM Hepes 1 mM EDTA pH 7,8 (NaOH)
0,1-fach MMR:	1:10 Verdünnung von 1-fach MMR
Cystein-Lösung:	2% (w/v) Cystein ⇒ in 0,1-fach MMR lösen ⇒ mit HCl auf pH 7,8 einstellen

#### Durchführung:

Weibliche *Xenopus laevis* wurden durch Injektion von Choriogonadotropin zur Eiablage stimuliert (siehe 4.5.1). Einem betäubten männlichen *Xenopus* wurden die Hoden entnommen (siehe 4.5.9) und für die Befruchtung mit einem Skalpell längs aufgeschnitten. In einer Petrischale, befüllt mit MMR, wurden frisch abgelaichte Eier gesammelt und mehrfach in MMR gewaschen. Anschließend wurde die Flüssigkeit entfernt und der aufgeschnittene Hoden mehrfach vorsichtig über die Eier gestrichen. Nach einer 5 min. Inkubation wurden die Eier mit 0,1-fachem MMR überschichtet. Die befruchteten Eier drehten sich nach etwa 15 min. auf die Seite ihres vegetativen Pols, sodass die animale pigmentierte Seite nach oben zeigte. Nach etwa 30 min. zeigte sich die erfolgreiche Befruchtung der Eier durch das Verschwinden des hellen Chromosomenfleckes auf der animalen Seite. 45 min. nach der in vitro Befruchtung wurde die Flüssigkeit abermals abgenommen und die Gallerthülle der Eier durch 5 min. Inkubation mit der Cystein-Lösung entfernt. Anschließend wurden die Eier mehrfach mit 0,1-fachem MMR gespült.

### 4.5.19.2 Aufzucht der Embryonen

#### Lösungen:

0,1-fach MMR:	(siehe 4.5.19.1)
Aktivkohle-Agarschalen, 1L:	20 g Aktivkohle 20 g Agar-Agar ⇒ aufkochen und auf ca. 50°C abkühlen lassen Zugabe 5 g Sulfodiazin

*Durchführung:*

Die von der Gallerthülle befreiten Embryonen wurden nach gründlichem Spülen in Aktivkohle-Agarschalen, befüllt mit 0,1-fachem MMR, überführt und entwickelten sich bei RT. Aktivkohle sowie das Antibiotikum Sulfodiazin wirken sich förderlich auf die Entwicklungsrate aus. Absterbende Embryonen wurden stets aus der Schale entfernt. Die Entwicklungsstadien wurden anhand der Normentafel von Nieuwkoop und Faber (Nieuwkoop and Faber, 1975) bestimmt.

**4.5.19.3 Mikroinjektion in *Xenopus* Embryonen***Lösungen:*

MMR:	(siehe 4.5.19.1)
0,1-fach MMR:	1:10-Verdünnung von 1-fach MMR
5% MMR:	1-fach MMR 100 mM NaCl 2 mM KCl 2 mM CaCl <sub>2</sub> 1 mM MgCl <sub>2</sub> 5 mM Hepes ⇒ pH einstellen auf 7,4

*Durchführung:*

Nach der Befruchtung und Entfernung der Gallerthülle wurden die Embryonen in Aktivkohle-Agarschalen (siehe 4.5.19.2) in 5% MMR überführt. Nach der ersten Zellteilung wurde mit Hilfe eines Mikromanipulators in eine der beiden Zellen der Embryonen mit 20 ng MVP-Morpholinos (Gene Tools, LLC) alleine oder in Kombination mit 2 ng His-MVP injiziert. Als Kontrolle diente die Injektion von unspezifischen Morpholinos. Es wurde jeweils ein Volumen von 100 nL pro Zelle injiziert. Nach der Injektion wurden die Embryonen in 0,1-faches MMR überführt und die Auswirkungen der Manipulationen mit einer Stereolupe analysiert und mit einer CCD-Kamera dokumentiert.

**4.6 Mikroskopische Methoden****4.6.1 Fixierung von Präparaten für die Fluoreszenzmikroskopie****4.6.1.1 Fixierung von *in vitro* Kernen und Annulate Lamellae**

Die zu untersuchenden Proben wurden mit je 4 x Volumenanteil 2% Formaldehyd in PBS (siehe 4.3.8.8) für 10 min. bei RT fixiert. Durch die Formaldehydlösung werden freie funktionelle Gruppen zellulärer Proteine chemisch miteinander vernetzt und somit immobilisiert. In der Zwischenzeit wurden Objektträger mit Ethanol gereinigt und mit einem Filterpapier in die bei der Cytospin-Zentrifugation verwendeten Trichter eingesetzt. Die Proben wurden nach der Fixierung bei 1000 x rmp und 4°C für 10 min. mit einer Cytospin-Zentrifuge auf die Objektträger zentrifugiert. Anschließend wurden die Objektträger zur Permeabilisierung der Probe für 10 min. in -20°C 100% Aceton inkubiert und danach luftgetrocknet. Für eine folgende Inkubation mit dem Antikörper gegen  $\beta$ -Tubulin wurden die Objektträger nach der Cytospin-Zentrifugation

nicht in Aceton, sondern in  $-20^{\circ}\text{C}$  100% Methanol für 10 min. inkubiert und anschließend luftgetrocknet.

#### 4.6.1.2 Fixierung von Kulturzellen mit Formaldehyd-Triton

*Lösungen:*

PBS:	(siehe 4.3.8.8)
Triton-Lösung:	0,1% Triton™X-100 (v/v) in PBS
Formaldehyd-Lösung:	2% Formaldehyd in PBS, alternativ 2% Paraformaldehyd in PBS

*Durchführung:*

Die auf Deckgläschen gewachsenen Zellen wurden nach der Entnahme aus dem Kulturmedium kurz in PBS gewaschen und anschließend für 10 min. in Formaldehyd-Lösung inkubiert. Nach kurzem Waschen in PBS wurden die Deckgläschen für 5 bis 10 min. mit Triton-Lösung inkubiert und konnten nach erneutem Waschen in PBS für die indirekte Immunfluoreszenz verwendet werden.

#### 4.6.1.3 Fixierung von Kulturzellen mit Aceton-Methanol

*Lösungen:*

PBS:	(siehe 4.3.8.8)
------	-----------------

Die auf Deckgläschen angewachsenen Kulturzellen wurden nach der Entnahme aus dem Kulturmedium kurz in PBS gewaschen und anschließend in  $-20^{\circ}\text{C}$  100% Methanol für 10 min. inkubiert. Danach wurden die Deckgläschen in  $-20^{\circ}\text{C}$  100% Aceton überführt und die Proben für 5 bis 10 min. permeabilisiert. Nach einer Lufttrocknung konnten die Zellen für eine indirekte Immunfluoreszenz verwendet werden.

#### 4.6.2 Gewinnung von Gewebe

*Lösungen:*

Anästhesiermedium:	(siehe 4.3.10)
--------------------	----------------

PBS:	(siehe 4.3.8.8)
------	-----------------

Methylbutan (vorgekühlt in flüssigem Stickstoff)

*Durchführung:*

Einem anästhesierten Frosch wurden die zu präparierenden Organe und Gewebe entnommen (siehe 4.3.10) und eisgekühltes PBS überführt. Größere Organe wurden in kleinere Stücke von etwa 0,5 cm zerteilt und in mit flüssigem Stickstoff vorgekühltem Methylbutan für 2 min. schockgefroren. Gefrierschnitte konnten nach einer 12 h Inkubation des Gewebes in Methylbutan bei  $-70^{\circ}\text{C}$  durchgeführt werden.

### 4.6.3 Anfertigung von Gefrierschnitten

Gefrierschnitte von Organen und Geweben wurden mit Hilfe eines Kryostat-Mikrotoms bei einer Temperatur von -24°C hergestellt. Die mit Methylbutan durchtränkten Gewebestücke (siehe 4.6.2) wurden mit Einbettmedium (Leica Microsystems, Nussloch) auf einem Objektisch fixiert und Gefrierschnitte von 5 µm Dicke hergestellt. Die Schnitte wurden auf mit Aceton gereinigte Objektträger überführt und die Qualität mikroskopisch überprüft.

#### 4.6.3.1 Fixierung von Gefrierschnitten

Die angefertigten Gefrierschnitte wurden nach Lufttrocknung in 100% Ethanol entwässert und anschließend für 10 min. in 100% Aceton bei -20°C inkubiert. Nach einer erneuten Lufttrocknung konnten die Gefrierschnitte für die Immunfluoreszenz verwendet werden.

#### 4.6.4 Indirekte Immunfluoreszenz

Bei dieser Methode wird ein Primärantikörper auf das zu untersuchende Gewebe gebracht, welcher spezifisch an das Epitop tragende Polypeptid bindet. Durch einen gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper, welcher meist kovalent mit einem Fluorophor gekoppelt ist, kann der Primärantikörper sichtbar gemacht werden. Das Fluorophor erzeugt durch Anregung mit einem Licht bestimmter Wellenlänge eine spezifische Fluoreszenz. Die Sekundärantikörper können mit unterschiedlichen Fluorophoren gekoppelt sein. So lassen sich in einer Doppel-Immunfluoreszenz in einem Versuchsansatz verschiedene Proteine gleichzeitig sichtbar machen. Über das Fluoreszenzmuster kann man das Verteilungsmuster des untersuchten Proteins darstellen.

##### *Lösungen:*

PBS:	(siehe 4.3.8.8)
Primär- und Sekundärantikörper:	in PBS verdünnt, siehe
Hoechst 33258	SL 5 µg/mL, Serva
Mowiol:	10 g Mowiol 4-88 (Hoechst, Frankfurt) gelöst in 40 mL KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -freiem PBS + 20 mL Glycerin

##### *Durchführung:*

Alle nachfolgenden Inkubationsschritte wurden in einer Feuchtkammer bei RT durchgeführt. Nach der Fixierung und Lufttrocknung wurden die Präparate für 30 min. mit dem Primärantikörper inkubiert. Die Objektträger wurden anschließend 3 x 5 min. in PBS gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Es folgte die Inkubation mit dem gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper für 30 min. Nach 20 min. wurde das Fluorochrom Hoechst zur Markierung der DNA auf jedes Präparat pipettiert. Nach 3 x Waschen in PBS für je 5 min. wurden die Präparate für 1 min. in 100% Ethanol inkubiert und nach der Lufttrocknung der Proben mit einem Tropfen Mowiol eingebettet. Zum Nachweis zweier Antigene derselben Probe wurde eine Doppel-Immunfluoreszenz durchgeführt. Hierbei folgte nach den oben beschriebenen Schritten eine weitere Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper und Sekundärantikörper. Die Fluorochrome wurden mit einem

Fluoreszenzmikroskop (Axiopho, Zeiss, Oberkochen) mit Epifluoreszenzoptik und Selektivfiltern untersucht und mit einer CCD-Kamera dokumentiert.

#### 4.6.5 Elektronenmikroskopie

Die Auflösungsgrenze eines Elektronenmikroskops (EM) liegt bei biologischen Präparaten bei 1-3 nm. Im Vergleich dazu können bei der Lichtmikroskopie lediglich Auflösungen von 0,2  $\mu\text{m}$  erreicht werden. Im Elektronenmikroskop werden Elektronen von einem Glühdraht (Kathode) durch ein elektrisches Feld Richtung Anode hin beschleunigt. Durch ein Vakuum werden die Elektroden innerhalb des Mikroskops nicht abgelenkt. Der Elektronenstrahl tritt durch ein zentrales Loch in der Anode und wird durch ein Kondensatorsystem auf das Präparat fokussiert. Da der Elektronenstrahl nur eine sehr dünne Schicht durchdringen kann, dürfen die Präparate nicht dicker als 25-80 nm sein. Es werden deshalb Ultradünnschnitte angefertigt.

##### 4.6.5.1 Fixierung von in vitro Kernen

*Lösungen:*

Cacodylatpuffer: 0,05 M Cacodylsäure Na-Salz Trihydrat

2,5% Glutaraldehyd mit Ionen: 5 ml 25% Glutaraldehyd  
 2,5 ml 1 M KCl  
 1,25 ml 0,1 M  $\text{MgCl}_2$   
 41,25 ml 0,05 M Cacodylatpuffer  
 pH 7,2

Osmiumtetroxid: 2% (w/v)  $\text{OsO}_4$  in  $\text{ddH}_2\text{O}$

Uranylacetat: 0,5% Uranylacetat in  $\text{ddH}_2\text{O}$

*Durchführung:*

Die für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen hergestellten in vitro Kerne wurden zu je 50  $\mu\text{L}$  fixiert. Hierfür wurde zu den Proben 4 x Volumenanteil 2,5% Glutaraldehyd mit Ionen pipettiert und für 30 min. auf Eis inkubiert. Durch das Glutaraldehyd werden die Polypeptide in der Probe miteinander vernetzt und somit fixiert. Nach einer Zentrifugation für 10 min. bei 2.600 x g und 4°C ohne Abbremsen wurde das Sediment 4 x 3 min. mit eiskühlem 0,2 M Cacodylat-Puffer und danach 4 x 3 min. mit eiskaltem  $\text{ddH}_2\text{O}$  gewaschen, ohne dabei das Sediment zu resuspendieren. Eine 1,5 bis 3 h Inkubation mit 2%  $\text{OsO}_4$  kontrastierte die Probe, indem  $\text{OsO}_4$  bei seiner Reduktion durch organische Verbindungen ein schwarzes Oxid bildet. Nach 4 x Waschen mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  für je 3 min. wurde die Probe über Nacht bei 4°C mit 0,5% Uranylacetat inkubiert, wobei die Proben weiter kontrastiert werden. Am folgenden Tag wurden die Proben erneut 4 x mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  gewaschen und konnten anschließend entwässert werden.

Alternativ zu der beschriebenen Fixierung in 1,5 mL Reaktionsgefäßen, konnten die Proben nach der Fixierung mit Glutaraldehyd mit Ionen mittels einer Cytospin-Zentrifuge auf Deckgläschen übertragen werden. Hierfür wurden Deckgläschen mit Flüssigkleber auf Objektträger angebracht und nach dem Aushärten des Klebstoffes in die für die Cytospin-Zentrifuge verwendeten Trichter zusammen mit einem Filterpapier eingespannt. Die Proben wurden bei 1.000 rpm und 4°C für 10 min. auf die Deckgläschen zentrifugiert und direkt im Anschluss so behandelt wie oben beschrieben. Hierbei wurden die Deckgläschen zum Waschen in die genannten Lösungen eingetaucht und bei der Kontrastierung 2%  $\text{OsO}_4$  bzw. 0,5%

Uranylacetat auf die Deckgläschen pipettiert. Die Inkubation erfolgte hierbei in einer Feuchtkammer, um ein vorzeitiges Austrocknen der Proben zu verhindern.

#### 4.6.5.2 Entwässerung der Proben und Einbettung in EPON

##### *Lösungen:*

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

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

EPON-Gemisch:	24,6 g Lösung A
	20,8 g Lösung B
	0,8 ml DMP-30

##### *Durchführung:*

Die fixierten und kontrastierten Proben wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Während der gesamten Prozedur wurde darauf geachtet, dass die Proben nie austrocknen. Die Alkoholreihe erfolgte über 50%, 70%, 96% Ethanol p.a. für je 2 x 15 min. auf Eis, bis hin zu 3 x 100% Ethanol p.a. für je 20 min. bei RT. Anschließend wurden die Proben 3 x 20 min. mit Propylenoxid inkubiert. Die Einbettung der Proben erfolgte zunächst durch eine 1 bis 2 h Inkubation mit einem 1:1 Gemisch aus Propylenoxid und EPON. Hierbei wurden die Reaktionsgefäße nicht verschlossen, damit das Propylenoxid verdampfen konnte. Anschließend erfolgte eine Inkubation in einem 1:3 Propylenoxid : EPON- Gemisch über Nacht. Am folgenden Tag wurden die Proben vollständig in EPON eingebettet, wobei das EPON-Gemisch 3 x je 2 h inkubiert wurde. Zum Aushärten des Epoxidharzes wurden die Proben für mindestens 48 h bei 60°C in einen Brutschrank gegeben. Danach konnten die aus den Reaktionsgefäßen entfernten EPON-Blöcke angetrimmt und geschnitten werden.

#### 4.6.5.3 Anfertigung von Ultradünnschnitten

An einem Ultramikrotom (RMC, Tuson, USA) wurden die Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 60-80 nm mit einem Diamanten (DIATOME, Swiss Diamond knife, Messerwinkel 5°C, Reichert-Jung, Nussloch) hergestellt. Die Schnitte sammelten sich in einem hinter dem Messer angebrachten Wassertrog und wurden mit einem vorher mit Pioloform F (Wacker-Chemie GmbH, München) beschichteten EM-Kupfernetzchen (Typ 75, 3 mm Durchmesser, VECO Industrieprodukte GmbH, Solingen-Höhscheid) abgefischt. Vor der weiteren Verwendung wurden die Netzchen für 30 min. luftgetrocknet.

#### 4.6.5.4 Kontrastierung von Ultradünnschnitten

##### *Lösungen:*

Uranylacetat:	20% Uranylacetat in Ethanol
Bleicitrat nach Reynolds (1963):	1,33 g Bleinitrat 1,76 g Natriumcitrat 8 ml 1 M NaOH ⇒ mit abgekochten ddH <sub>2</sub> O auf 50 ml auffüllen

##### *Durchführung:*

Ein Streifen Parafilm wurde auf eine Glasplatte gelegt und darauf Uranylacetat in Tropfen pipettiert. Die EM-Kupfernetzchen wurden mit der Schnittseite auf je einen Tropfen gelegt und für 15 min. gefärbt. Dabei waren die Netzchen mit einer Petrischale abgedeckt. In der Zwischenzeit wurde die Reynolds Bleicitrat-Lösung abzentrifugiert und anschließend tropfenweise auf den Parafilm gegeben. Neben den Tropfen wurden NaOH-Plätzchen gelegt und mit einer Petrischale abgedeckt. Über die NaOH-Plätzchen wird der CO<sub>2</sub>-Gehalt innerhalb der Petrischale so gering wie möglich gehalten, da eine Bildung von Blei-Präzipitaten verhindert werden soll. Nach der Färbung mit Uranylacetat wurden die Netzchen mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und mit Filterpapier vorsichtig getrocknet. Anschließend wurden die Netzchen auf die vorbereiteten Bleicitrat-Tropfen gelegt, wiederum mit der Schnittseite nach unten und mit der Petrischale bedeckt. Nach 8 min. Kontrastieren wurden die Netzchen 3 x mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend durch sanftes Auflegen auf Filterpapier das Wasser abgesaugt. Nach dem vollständigen Lufttrocknen der Netzchen konnten diese im Elektronenmikroskop analysiert werden.

#### 4.6.5.5 Negativkontrastierung von Liposomen

Um Liposomen elektronenmikroskopisch darzustellen, wurde die Methode der Negativkontrastierung angewandt. Bei der Methode der sukzessiven Kontrastierung wird zunächst das zu untersuchende Objekt auf ein kohlebeschichtetes Trägernetz aufgebracht und anschließend in ein amorphes, Elektronen stark streuendes Schwermetallsalz, im Normalfall Uranylacetat, eingehüllt. Die Erhöhung der Dichte des Untergrundes, des EM-Netzchens, durch das Uranylacetat, erzeugt eine negative Kontrastierung des Objektes.

##### *Lösungen:*

Liposomen-Puffer (nach Farsad, 2001):	25 mM Hepes, pH 7,4 25 mM KCl 2,5 mM Mg <sup>2+</sup> -Acetat
---------------------------------------	---

##### *Durchführung:*

Um die Auswirkung von His-MVP auf die Liposomenstruktur zu untersuchen, wurden 1 µL Liposomen-Suspension (Liposome Kit, Sigma) mit 10 µL des Liposomen-Puffers, 1 mM GTP und 10 µg His-MVP für 15-20 min. bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert. Von den Proben wurde im Folgenden je 10 µL auf frisch beglimmte kohlebeschichtete Kupfernetzchen pipettiert und für 3-5 min. bei RT inkubiert. Die Netzchen wurden im Anschluss vorsichtig auf Filterpapier gedrückt, um die Flüssigkeit zu entfernen. Auf einem Parafilm wurden Tropfen von 0,1 M Hepes (pH 7,4) pipettiert und die Netzchen 3 x für je 2 min. gewaschen. Hierbei wurden diese jeweils

mit der Probenseite nach unten auf die Tropfen platziert. Auf dem Parafilm wurden ebenso Tropfen von wässrigem 2% Uranylacetat vorgelegt und die Netzchen nach dem Waschen zur Negativkontrastierung für 1 bis 2 min. mit Uranylacetat inkubiert. Danach wurde das Uranylacetat durch Absaugen mit Filterpapier entfernt und die Netzchen luftgetrocknet. Anschließend konnten die Proben in einem Elektronenmikroskop ausgewertet werden.

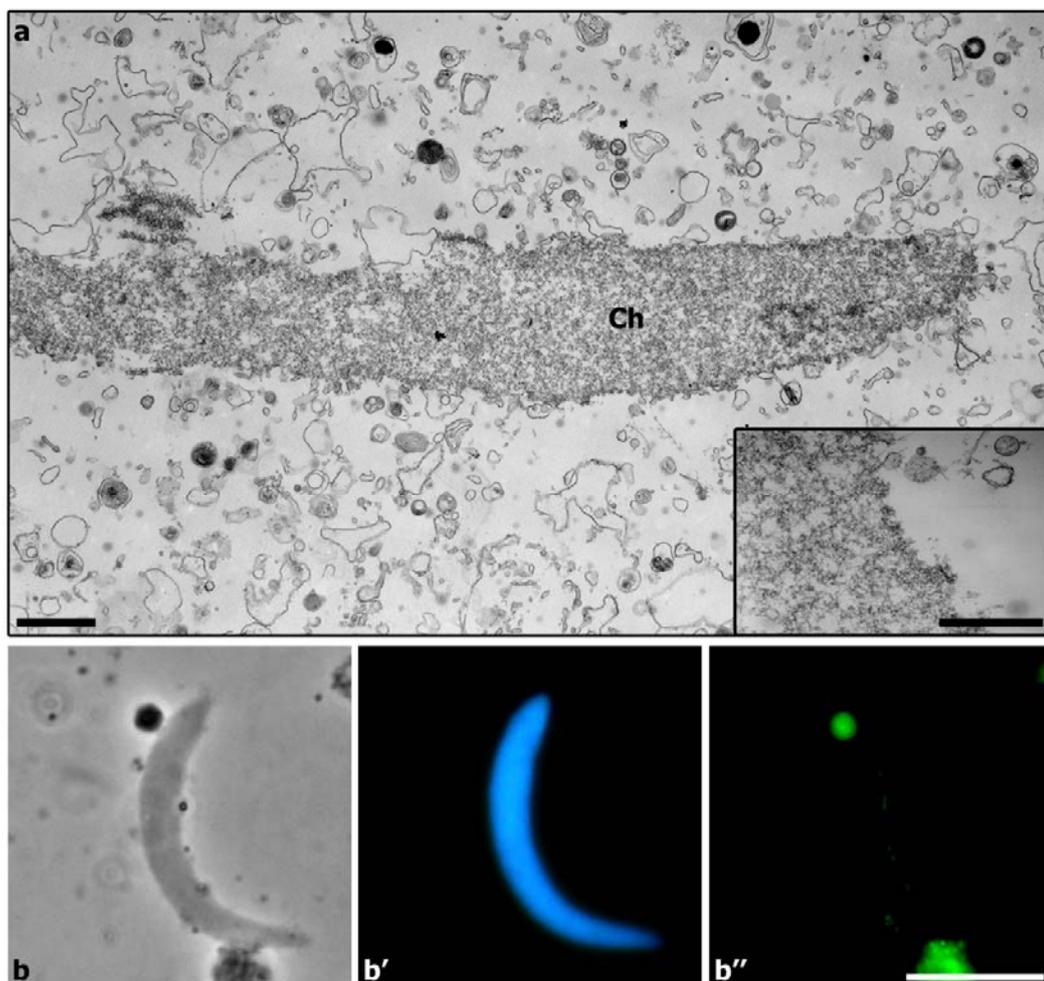
## 5. Ergebnisse

### 5.1 Analyse von *Xenopus laevis* Membranfraktionen

Die Bildung von Kernporenkomplexen beim Ausbau der Kernhülle am Ende der Mitose ist ein umfangreich bearbeitetes Forschungsgebiet. Jedoch sind die molekularen Mechanismen, die zum Aufbau der NPC's führen, nicht vollständig aufgeklärt. Die Vorgänge während der Interphase, wenn sich die Kernhülle im Rahmen des Zellwachstums ebenfalls vergrößert und neue NPC's in die bestehende Kernhülle integriert werden müssen, sind noch weniger erforscht. In dieser Arbeit sollten die molekularen Mechanismen, die beim Neuaufbau der Kernhülle am Ende der Mitose und insbesondere während der Interphase zur Bildung von NPC's führen, näher untersucht werden. Als Modellsystem diente in dieser Arbeit das zellfreie System, basierend auf *Xenopus laevis* Eiextrakt. Durch die Zugabe von Spermienchromatin zu Eiextrakt und Energie in Form eines ATP-regenerierenden Systems kann die Bildung von in vitro Kernen induziert werden. Die im Extrakt gelösten Membranvesikel binden an Chromatin und fusionieren an der Chromatinoberfläche zu einer Doppelmembran, in welche zahlreiche NPC's eingelagert werden. Das zellfreie System ist sehr gut dazu geeignet, die Vorgänge während der Ausbildung einer Kernhülle zu untersuchen, insbesondere die Einlagerung von NPC's in die Kernhülle. Wenn man *Xenopus* Eiextrakt in Abwesenheit von Chromatin mit Energie versetzt, kann die Bildung von Annulate Lamellae induziert werden (Dabauvalle et al., 1991). Gibt man in diesen vorinkubierten Extrakt anschließend Chromatin, so bilden sich Kerne mit einer Doppelmembran, aber ohne NPC's. Durch die Bildung von Annulate Lamellae werden dem *Xenopus* Extrakt somit Faktoren entzogen, die zur Ausbildung von NPC's im zellfreien System benötigt werden (Ewald et al., 1997). Die Bildung von NPC's kann aber durch die anschließende Zugabe einer Fraktion aus dem Eiextrakt, welche die Membranvesikel enthält, induziert werden (Ewald et al., 1997). Um die verschiedenen Membranvesikeltypen in *Xenopus* Eiextrakt zu trennen und ihre Rolle bei der Bildung der NPC's zu analysieren, wurde *Xenopus* Eiextrakt mit Hilfe eines Zuckergradienten aufgetrennt (siehe 4.5.5). Anhand der unterschiedlichen Dichte der im Extrakt enthaltenen Membranvesikeltypen konnten zwei unterschiedliche Membranvesikeltypen isoliert werden (Dissertation Friederike Vollmar). Eine Membranfraktion sedimentiert in der Phasengrenze der 30%igen, die andere in der 40%igen Sucroseschicht. In dieser Arbeit sollte nun zunächst das Verhalten beider Membranfraktionen im Bezug auf ihre Bindung an Chromatin und der Bildung einer Kernmembran mit NPC's analysiert werden. Um den Einfluss von anderen im Extrakt enthaltenen Membranfraktionen auszuschließen, wurden die Kerne in membranfreiem Zytosol (siehe 4.5.2) gebildet.

## 5.2 Die 30% Membranfraktion ist nicht in der Lage, selbständig eine intakte Kernhülle auszubilden

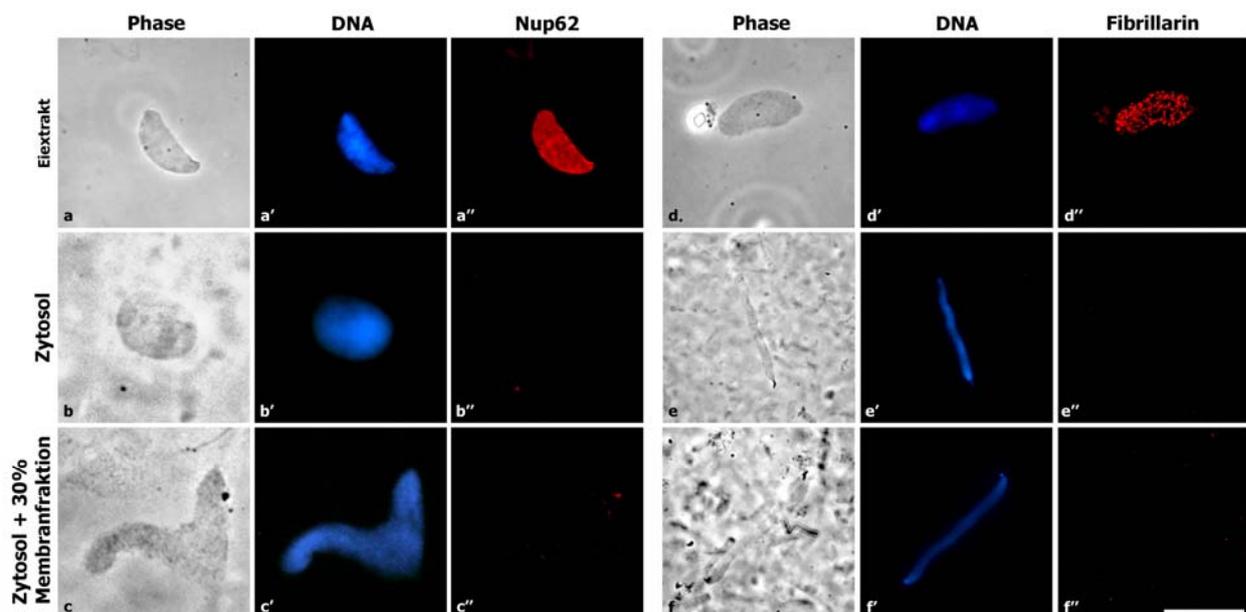
Um das Verhalten der durch eine Gradientenzentrifugation isolierten Membranfraktionen im zellfreien System von *Xenopus laevis* zu untersuchen, wurden zunächst einzelne Fraktionen isoliert analysiert. Nach der Zugabe der 30% Membranen zu Spermienchromatin, Zytosol und einem ATP-regenerierendem System (siehe 4.5.13.1) wurden die Proben für die Elektronenmikroskopie fixiert und kontrastierte Ultradünnschnitte angefertigt (siehe 4.6.5.3). Um die Bildung einer Kernmembran ohne Fixierung zu visualisieren, wurden 30% Membranvesikel mit dem Membranfarbstoff DiO<sub>c18</sub> angefärbt (siehe 4.5.8) und ihr Verhalten bei der Bildung der in vitro Kerne mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Sowohl in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 5.1, a) als auch in der Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 5.1, b'') konnten keine Membranvesikel assoziiert an die Chromatinoberfläche beobachtet werden. Die 30% Membranfraktion ist alleine nicht in der Lage an Chromatin zu binden, um dort eine Kernhülle aufzubauen. Vielmehr verbleiben die Membranen in vesikulärer Form um das Chromatin verteilt.



**Abb. 5.1:** Die 30% Membranfraktion ist nicht in der Lage direkt an Chromatin zu binden. Die Zugabe von isolierten 30% Membranvesikeln zu Chromatin mit Zytosol führte nicht zur Bindung und Ausbildung einer Doppelmembran an

der Chromatinoberfläche. a: Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt Spermienchromatin (Ch), welches von zahlreichen Vesikeln umgeben ist. Die Vergrößerung der Chromatinoberfläche zeigt, dass keine Membranvesikel gebunden haben. Die Eichstriche entsprechen 1  $\mu\text{m}$  und 100 nm in dem vergrößerten Bildausschnitt. b – b'': 30% Membranen wurden mit dem Farbstoff DiOc18 angefärbt. In der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme ist ebenfalls keine Assoziation von gefärbten Membranvesikeln an Chromatin zu erkennen (b''). Die korrespondierende Phasenkontrastaufnahme (b) sowie die Färbung der DNA mit Hoechst (b') sind ebenfalls dargestellt. Der Eichstrich entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

Das Fehlen einer Kernhülle mit transportfähigen NPC's wurde zudem anhand von indirekten Immunfluoreszenzen überprüft. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Marker verwendet. Durch den Antikörper gegen Nup62 kann die Anwesenheit von vollständigen NPC's markiert werden, durch Fibrillarin kann die Transportfähigkeit der gebildeten NPC's überprüft werden, da Fibrillarin erst nach der Insertion von NPC's und aktiven Transportprozessen in den Kern importiert werden kann und dort ein Bestandteil der fibrillären Komponente von Nukleolen bildet (Bell et al., 1992; Savino et al., 2001).

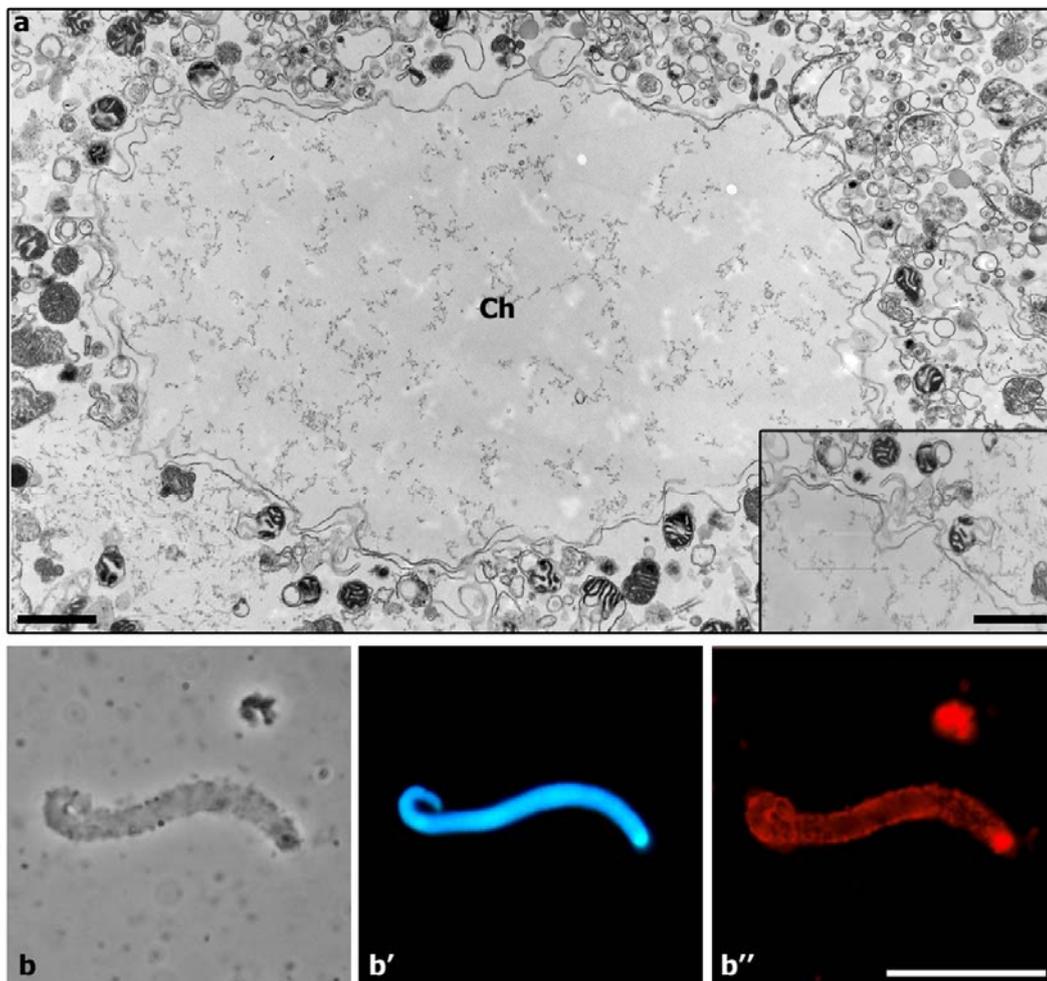


**Abb. 5.2:** Die 30% Membranfraktion ist nicht in der Lage, eine funktionelle Kernhülle auszubilden. Bei der Inkubation von 30% Membranvesikeln mit Zytosol und Chromatin wurden keine Kernmembran und NPC's gebildet (untere Reihe). In der Immunfluoreszenz sind weder Nup62 (c'') noch das nukleoläre Protein Fibrillarin (f'') nachweisbar. Zur Kontrolle wurden *in vitro* Kerne in Eiextrakt gebildet (obere Reihe). Sowohl Nup62 (a'') als auch Fibrillarin (d'') sind in den Kernen nachweisbar. Im Gegensatz dazu sind beide Proteine durch die Verwendung von reinem Zytosol nicht nachweisbar (mittlere Reihe, b'' und e''). Die korrespondierenden Phasenkontrastaufnahmen (a - f) sowie die Färbung der DNA mit Hoechst (a' - f') sind ebenfalls dargestellt. Der Eichstrich entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

In den aus Zytosol und 30% Membranfraktion gebildeten Kernen ist weder Nup62 (Abb. 5.2, c''), noch Fibrillarin (Abb. 5.2, f'') nachweisbar, es existieren somit keine funktionell aktiven NPC's in den Kernen.

### 5.3 Die 40% Membranfraktion führt zur Bildung von porenlosen Kernen

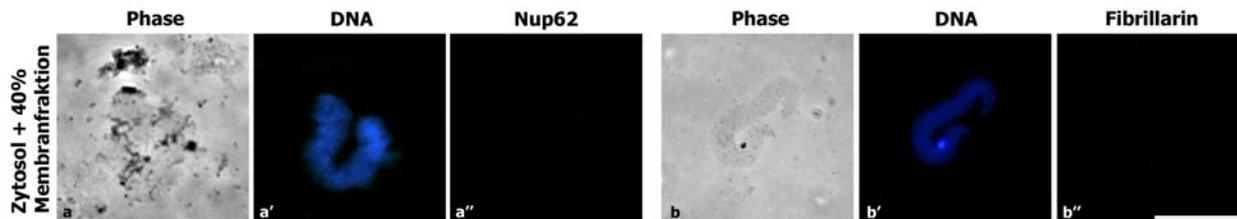
Ebenso wie die 30% Membranfraktion wurde auch die Rolle der 40% Membranfraktion bei der Bildung der Kernhülle untersucht. Hierfür wurden *in vitro* Kerne mit 40% Membranen, Zytosol und Chromatin gebildet (siehe 4.5.14.2). Die Proben wurden für elektronenmikroskopische Aufnahmen fixiert (siehe 4.6.1.1). Parallel dazu wurden die 40% Membranvesikel mit dem Membranfarbstoff Dil<sub>c18</sub> angefärbt (siehe 4.5.8), um die Kernhüllenbildung der Membranen ohne Fixierung zu betrachten.



**Abb. 5.3:** Die Zugabe der 40% Membranfraktion zu Chromatin und membranfreiem Zytosol führt zur Bildung von *in vitro* Kernen mit einer Doppelmembran. In der Kernhülle sind keine NPC's nachweisbar. a: Die 40% Membranfraktion bildet eine kontinuierliche Doppelmembran (siehe vergrößerter Bildausschnitt) um das Chromatin (Ch). Die Eichstriche entsprechen 1  $\mu$ m und 100 nm in dem vergrößerten Bildausschnitt. b – b'': 40% Membranen wurden mit dem Farbstoff Dilc18 gefärbt und damit *in vitro* Kerne gebildet. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen die Ausbildung einer Kernmembran durch die gefärbten Membranvesikel (b''). Die korrespondierende

Phasenkontrastaufnahme (b) sowie die Färbung der DNA mit Hoechst (b') sind ebenfalls dargestellt. Der Eichstrich entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

Im Gegensatz zur 30% Membranfraktion bindet die 40% Membranfraktion an Chromatin und fusioniert an der Chromatinoberfläche zu einer Doppelmembran. Sowohl in der elektronenmikroskopischen Aufnahme (Abb. 5.3, a) als auch in der Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 5.3, b'') ist die Bildung einer kontinuierlichen Kernmembran um das Chromatin deutlich sichtbar. Die ausgebildete Kernmembran beinhaltet jedoch keine Kernporen (Abb. 5.3, a, siehe vergrößerter Bildausschnitt). Zudem ist der Abstand zwischen innerer und äußerer Membran nicht gleichmäßig, sondern reicht von eng anliegenden Regionen bis zu Stellen, wo beide Membranen weit auseinander liegen (Abb. 5.3, a). Das Fehlen von Kernporenkomplexen in der Doppelmembran wurde anschließend durch indirekte Immunfluoreszenzen überprüft. Hierzu wurden die aus Zytosol, Chromatin und der 40% Membranfraktion gebildeten Kerne nach der Fixierung mit Antikörpern gegen Nup62 und Fibrillarin inkubiert. Ebenso wie bei der Untersuchung der 30% Membranfraktion (siehe 5.2) war keine Fluoreszenz der beiden Proteine nachweisbar (Abb. 5.4, a'' und b''). Somit hatten die Kerne keine funktionell aktiven NPC's eingelagert.

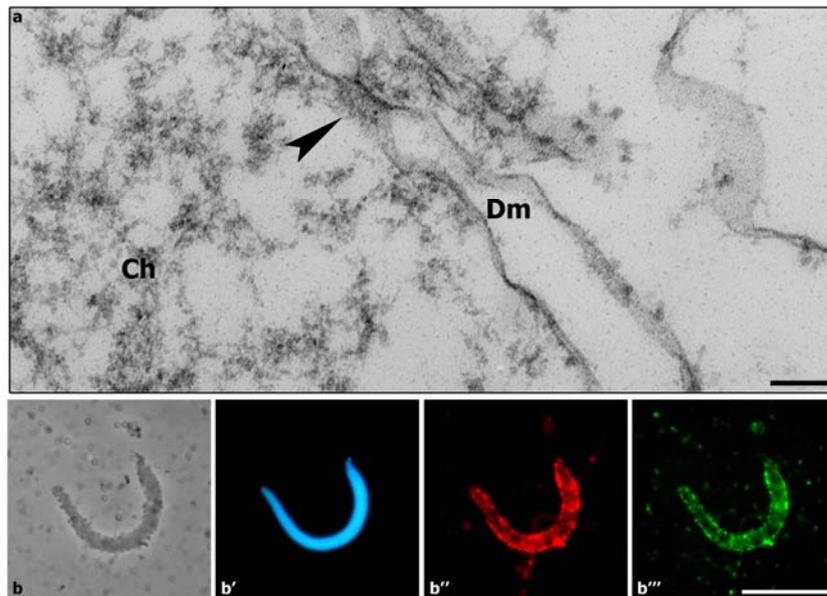


**Abb. 5.4:** Indirekte Immunfluoreszenzaufnahmen von *in vitro* Kernen, gebildet aus 40% Membranfraktion, Zytosol und Chromatin. Die gebildeten Kerne beinhalten kein Nup62 (a''), kein Fibrillarin (b'') und haben somit keine funktionell aktiven NPC's inseriert. Die korrespondierenden Phasenkontrastaufnahmen (a und b) sowie die Färbung der DNA mit Hoechst (a' und b') sind ebenfalls dargestellt. Der Eichstrich entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

#### 5.4 Die 30% Membranfraktion induziert die *de novo* Insertion von NPC's in geschlossenen Doppelmembranen

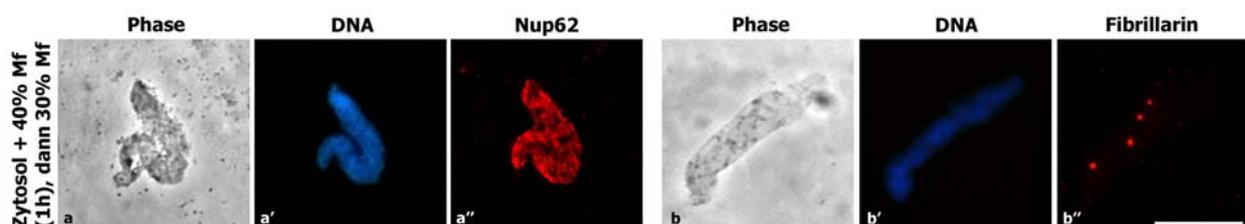
Nachdem gezeigt werden konnte, dass die 40% Membranfraktion zur Ausbildung von porenlosen Kernen führt, sollte festgestellt werden, ob die 30% Membranfraktion nach der Ausbildung dieser porenlosen Kerne in die bestehende kontinuierliche Doppelmembran integriert werden kann. Hierzu wurden zuerst porenlose Kerne wie in 5.3 beschrieben gebildet und anschließend die 30% Membranen in den Ansatz hinzugefügt. Neben elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden zudem Fluoreszenzen mit gefärbten Membranvesikeln angefertigt. Die Verwendung von unterschiedlich gefärbten

Membranfraktionen erlaubt hierbei das Verhalten beider Fraktionen innerhalb eines Versuchsansatzes zu visualisieren. Nachdem sich aus der 40% Membranfraktion und Zytosol porenlose Kerne gebildet hatten (Abb. 5.5, b'', vgl. 5.3), wurde die 30% Membranfraktion zu diesen Kernen hinzugefügt. In der Fluoreszenzaufnahme ist deutlich die Integration der 30% Membranvesikel in die bestehende Kernmembran zu erkennen (Abb. 5.5, b'''). Die elektronenmikroskopische Untersuchung dieser Kerne zeigt, dass in die zuvor porenlose Kernhülle NPC's eingelagert wurden (Abb. 5.5, a, siehe Pfeil).



**Abb. 5.5:** Die 30% Membranfraktion wird in bestehende Kernmembran integriert und führt zur Insertion von NPC's. a: Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt die Bildung von NPC's (siehe Pfeil) in die Doppelmembran (Dm), welche zuvor durch die 40% Membranfraktion um Chromatin (Ch) gebildet wurde. Der Eichstrich entspricht 100 nm. b – b''': Die Fluoreszenzaufnahmen zeigen die aus der 40% Membranfraktion (b'', gefärbt mit Dilc18) und 30% Membranfraktion (b''', gefärbt mit DiOc18) gebildete Kernhülle. Die 30% Membranfraktion wurde dabei erst nach der Ausbildung einer Doppelmembran durch die 40% Membranfraktion in den Ansatz gegeben. Die korrespondierende Phasenkontrastaufnahme (b) sowie die Färbung der DNA mit Hoechst (b') sind ebenfalls dargestellt. Der Eichstrich entspricht 10 µm.

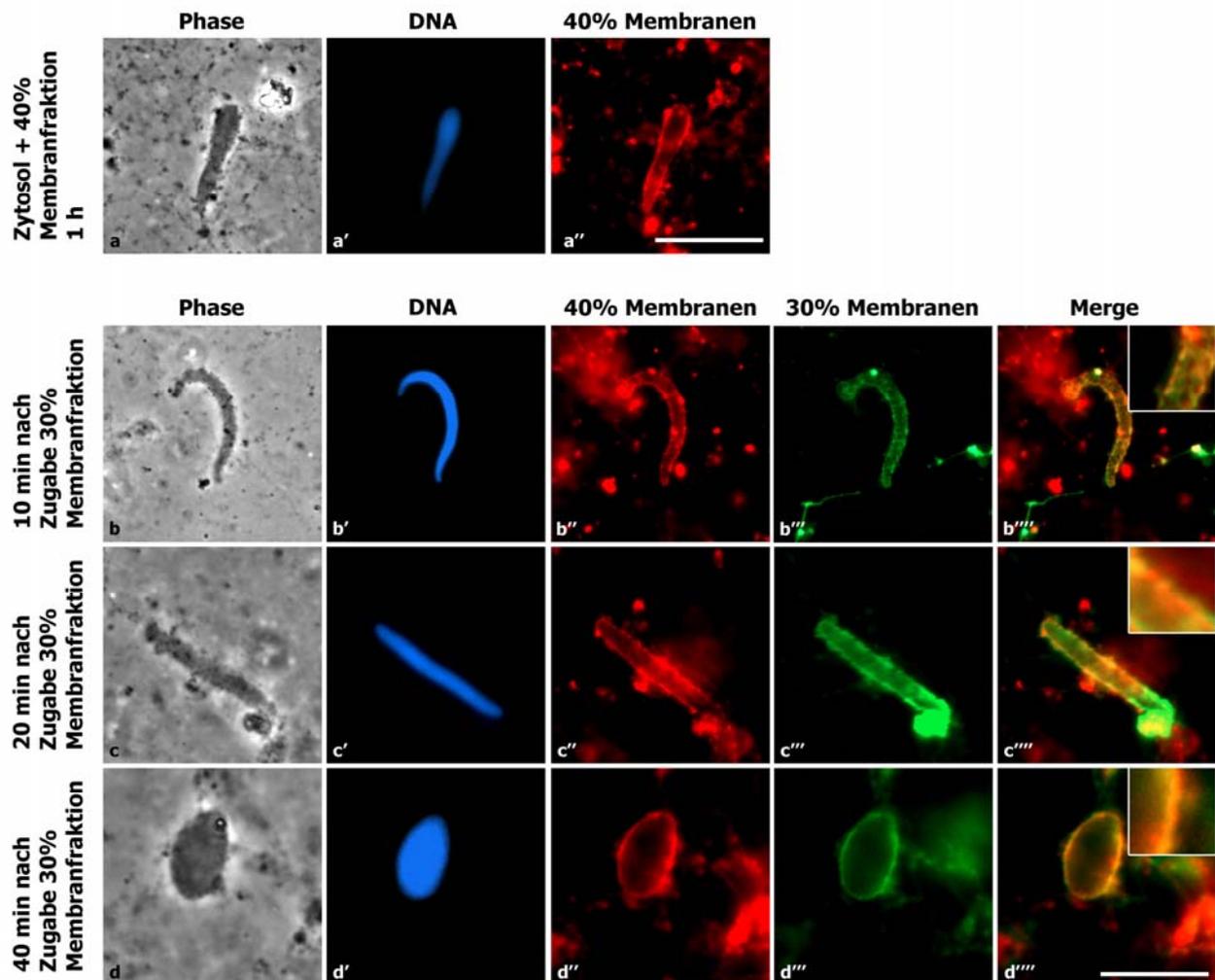
Die Bildung von transportfähigen NPC's in der kontinuierlichen Kernmembran wurde mit Hilfe von indirekten Immunfluoreszenzaufnahmen belegt. Die 30% Membranfraktion ist in der Lage, in bestehende Doppelmembranen integriert zu werden und induziert die de novo Bildung von NPC's. In den gebildeten Kernen können sowohl Nup62 (Abb. 5.6, a'') als auch Fibrillarin (Abb. 5.6, b'') nachgewiesen werden.



**Abb. 5.6:** Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis der de novo Bildung von NPC's durch die 30% Membranfraktion. Nach der Bildung von porenlosen Kernen durch die 40% Membranfraktion konnte die Insertion von NPC's durch die anschließende Zugabe der 30% Membranfraktion in der bestehenden Doppelmembran induziert werden und Nup62 kann nachgewiesen werden (a''). Die Transportfähigkeit der NPC's kann durch den Import von Fibrillarin belegt werden (b''). Die korrespondierenden Phasenkontrastaufnahmen (a und b) sowie die Färbung der DNA mit Hoechst (a' und b') sind ebenfalls dargestellt. Der Eichstrich entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

## **5.5 Kinetik des Einbaus der 30% Membranfraktion in eine bestehende Kernhülle**

Nachdem gezeigt wurde, dass sich die 30% Membranfraktion nur in eine schon vorhandene Doppelmembran inserieren kann (vgl. Abb. 5.1 mit Abb. 5.5), sollte die Kinetik der Bildung der Kernhülle aus beiden Membranfraktionen untersucht werden. Hierfür wurden die Membranfraktionen mit unterschiedlichen Membranfarbstoffen angefärbt und die Bildung der Kernhülle in definierten Zeitabständen analysiert. Werden beide Membranfraktionen in einem Versuchsansatz gleichzeitig zugefügt, so beginnen die einzelnen Membranvesikel sofort miteinander zu fusionieren und es können zeitabhängig keine Unterschiede während des Aufbaus der Kernhülle festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Um den Einbau der 30% Membranfraktion darzustellen, wurden deshalb zunächst porenlose Kerne aus der 40% Membranfraktion, Zytosol und Chromatin gebildet (siehe 5.3) und anhand der Fluoreszenz der mit Dil<sub>c18</sub> markierten Membranen überprüft, ob die Doppelmembran um das Chromatin vollständig geschlossen ist (Abb. 5.7, a''). Anschließend wurden die mit DiO<sub>c18</sub> gefärbten 30% Membranvesikel in den Versuchsansatz zugefügt und der Einbau der Vesikel in die Doppelmembran nach 10, 20 und 40 min. dokumentiert. Nach 10 min. war bereits ein weitläufiges Netzwerk von inserierten 30% Membranen sichtbar (Abb. 5.7, b'''). Die Überlagerung beider Membranen zeigt, dass der Einbau der 30% Membranen zu diesem Zeitpunkt nicht homogen über die Kernmembran ausgebreitet ist (Abb. 5.7, b'''' siehe vergrößerter Bildausschnitt). 20 min. nach der Zugabe der 30% Membranen ist der Einbau in die Kernhülle nahezu abgeschlossen. In der Überlagerung sind kaum noch Unterschiede in der Lokalisation beider Membranfraktionen zu erkennen (Abb. 5.7, c'' - c'''). In den folgenden 20 min. wird die Insertion der Membranvesikel fortgesetzt und führt zu der vollständigen Überlagerung beider Membranfraktionen in der sich bis zur vollen Größe ausdehnenden Kernhülle (Abb. 5.7, d'' - d''').



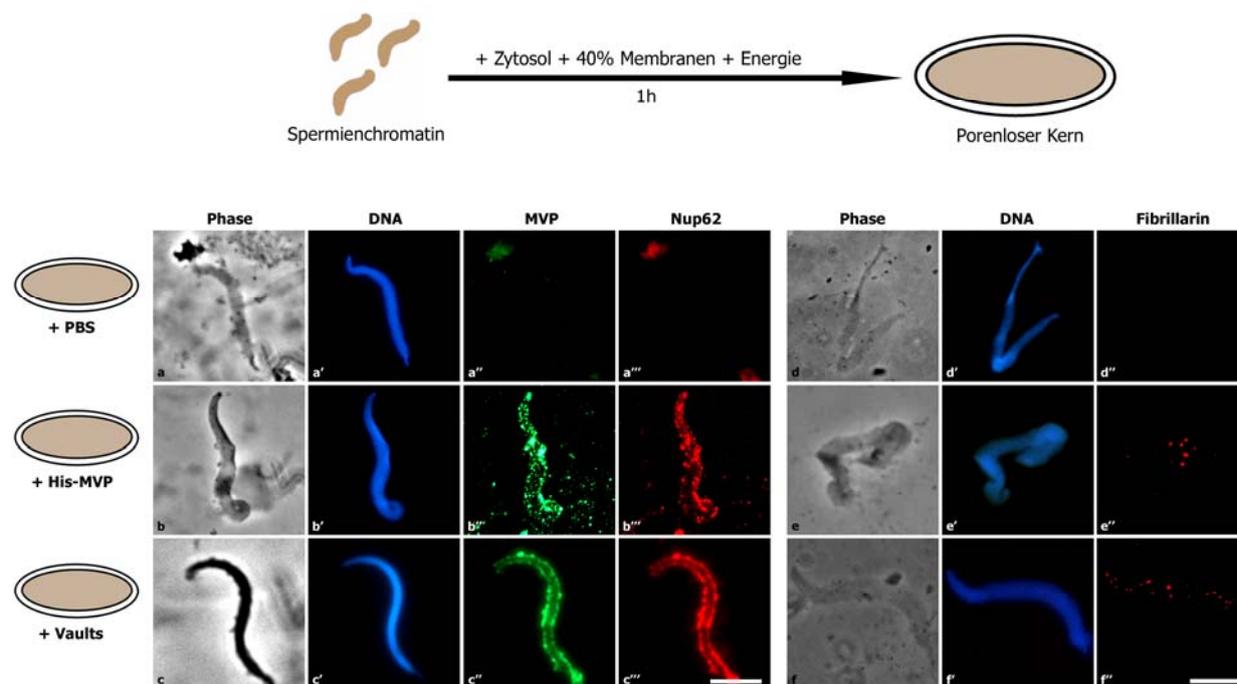
**Abb. 5.7:** Visualisierung des kontinuierlichen Einbaus der 30% Membranfraktion in einen porenlosen Kern. Nach der Bildung von porenlosen Kernen durch die 40% Membranfraktion (gefärbt mit Dilc18; a'') erfolgte die Zugabe der 30% Membranen (gefärbt mit DiOc18). Nach 10 min. waren zahlreiche Membranvesikel der 30% Fraktion mit der Kernmembran assoziiert (b'''). Der Einbau ist noch lokal begrenzt und erscheint in der Überlagerung beider Fluoreszenzen nicht homogen (b''', siehe Vergrößerung). Nach 20 min. ist der Einbau nahezu abgeschlossen (c''') und beide Membranfraktionen überlagern sich fast vollständig (c''', siehe Vergrößerung). Nach weiteren 20 min. colokalisieren beide Membranfraktionen und der Einbau der 30% Membranfraktion ist abgeschlossen (d' - d'''). Die korrespondierenden Phasenkontrastaufnahmen (a - d) und die Färbung der DNA mit Hoechst (a' - d') sind ebenfalls dargestellt. Die Eichstriche entsprechen jeweils 10  $\mu$ m.

## 5.6 MVP und Vault induzieren beide den de novo Einbau von Kernporenkomplexen

Durch die experimentelle Trennung von Doppelmembran- und Kernporenkomplexbildung konnte die Notwendigkeit der 30% Membranfraktion in der de novo Insertion von NPC's belegt werden. Immunblot-Analysen der 40% und 30% Membranen mit MVP-Antikörpern zeigten, dass MVP nur innerhalb der 30% Membranfraktion detektierbar ist (Dissertation Friederike Vollmar). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob MVP tatsächlich für die Induktion der

NPC-Bildung verantwortlich ist und somit der entscheidende Faktor der 30% Membranfraktion zur de novo Insertion von NPC's ist.

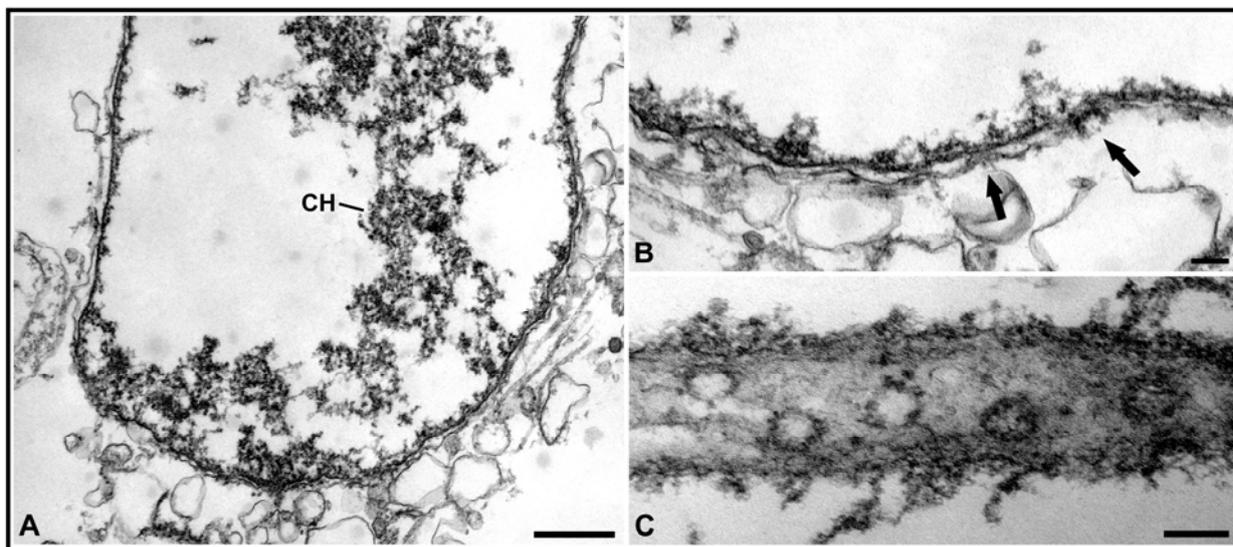
Zu diesem Zweck wurde Histidin-gekoppeltes *Xenopus* MVP exprimiert und aufgereinigt (siehe 4.3.8). Die gesamte Länge der Aminosäuresequenz ist in dem Expressionsvektor pet21a inkloniert und in *E. coli* des Stammes Rosetta transformiert. Das rekombinante Polypeptid ist somit C-terminal mit 6 Histidinen fusioniert und kann über eine Nickel-NTA-Agarose-Matrix aufgereinigt werden (siehe Dissertation Friederike Vollmar). Neben rekombinantes MVP wurde die NPC-Bildung durch aufgereinigte Vault Partikel untersucht. Die in den Studien verwendeten Vault Partikel wurden aus *Xenopus* Eiextrakt durch zahlreiche Zentrifugationsschritte aufgereinigt (siehe 4.5.11). Um den direkten Einfluss von MVP bzw. Vaults auf die Insertion von NPC's zu belegen, wurde eine vereinfachte Variante des zellfreien Systems gewählt, wobei zunächst porenlose Kerne mit Hilfe der 40% Membranfraktion gebildet wurden (Abb. 5.8, oberes Schema, vlg. 5.3). Anschließend wurde entweder 2,5 µg His-MVP oder 5 µL aufgereinigte Vault-Partikel zu den Kernen hinzugefügt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 1 h wurden die Proben für die Kontrolle der Bildung von NPC's mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen Nup62 und Fibrillarin analysiert.



**Abb. 5.8:** Sowohl rekombinantes MVP als auch aufgereinigte Vault-Partikel induzieren den Einbau von NPC's in Doppelmembranen. Nach der Bildung von porenlosen Kernen (siehe oberes Diagramm) wurden die auf der linken Seite angegebenen Faktoren zugefügt. Die Proben wurden für eine indirekte Immunfluoreszenz fixiert und mit Antikörpern gegen MVP, Nup62 und Fibrillarin inkubiert. Rekombinantes His-MVP ist ebenso wie aufgereinigte Vault-Partikel in der Lage die de novo Bildung von NPC's in eine bestehende Doppelmembran zu induzieren. In beiden Fällen ist Nup62 in der Kernhülle nachweisbar (b''' und c'''). Die gebildeten NPC's sind funktionell aktiv und zu dem Import von Fibrillarin befähigt (e''' und f'''). His-MVP, bzw. Vaults co-lokalisieren in diesen Kernen mit den gebildeten NPC's (b'' und c''). Bei der Abwesenheit von MVP/Vaults in Kontrollkernen (+ PBS) werden keine funktionell aktiven

NPC's in die Doppelmembran inseriert (a''' und d'') und es ist keine Fluoreszenz von MVP zu detektieren (a''). Die korrespondierenden Phasenkontrastaufnahmen (a – f) sowie die Färbung der DNA mit Hoechst (a' – f') sind ebenfalls dargestellt. Die Eichstriche entsprechen 10 µm.

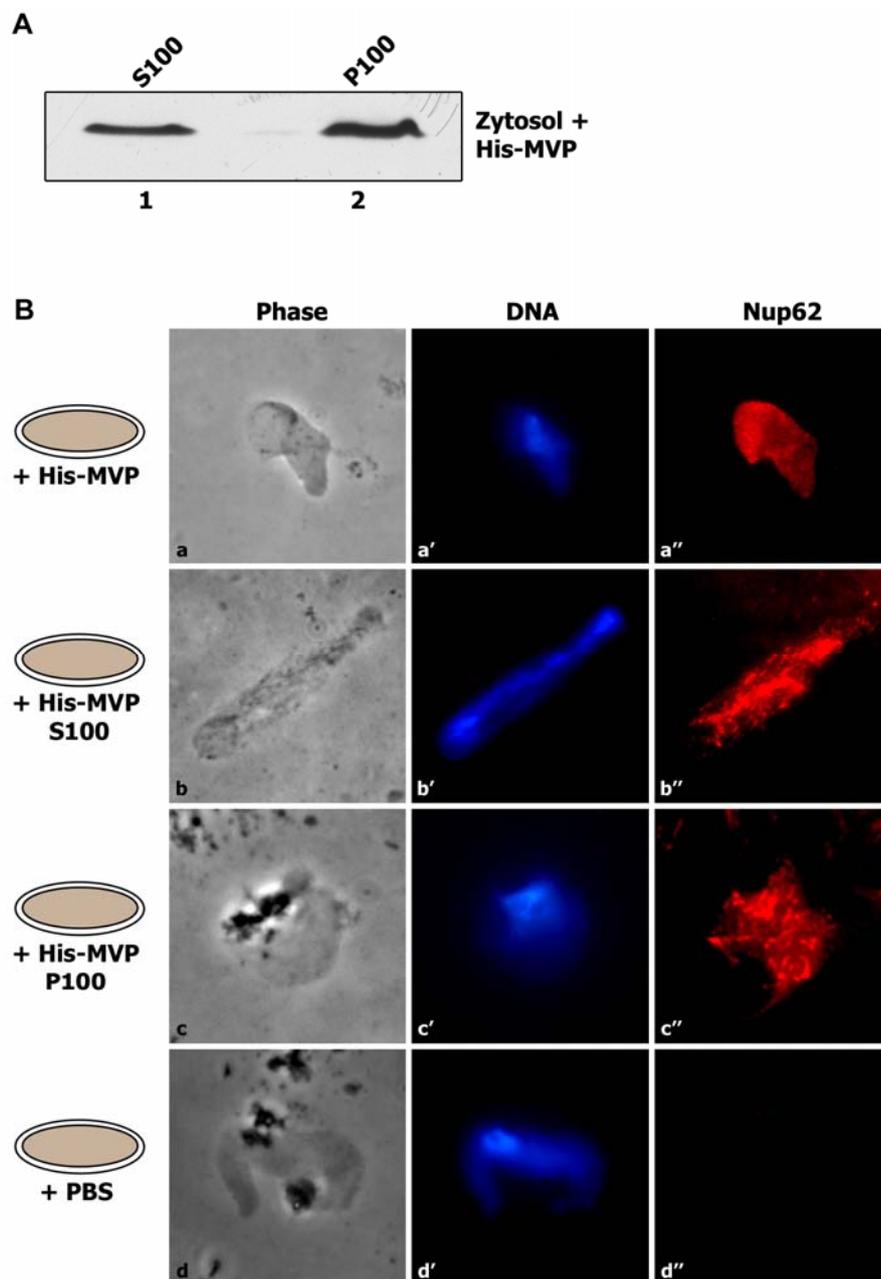
Sowohl das rekombinante MVP als auch die aufgereinigten Vault-Partikel induzierten in den porenlosen Kernen die de novo Bildung von NPC's (Abb. 5.8, b''' und c'''). Die inserierten NPC's waren in der Lage, Fibrillarin zu importieren (Abb. 5.8, e'' und f''). Interessant war hierbei die Beobachtung, dass das eingesetzte His-MVP sowie die aufgereinigten Vault-Partikel mit den neu gebildeten NPC's co-lokalisieren (Abb. 5.8, b'' und c''). Im Gegensatz dazu konnten in Kontrollkernen, denen lediglich Puffer zugefügt wurde, keine funktionellen NPC's und kein MVP nachgewiesen werden (Abb. 5.8, a'' – a'''). Um die Morphologie der neu gebildeten NPC's auf ultrastruktureller Ebene zu untersuchen, wurden die Proben für das Elektronenmikroskop fixiert (siehe 4.6.5.1) und die angefertigten Ultradünnschnitte analysiert. In den elektronenmikroskopischen Präparaten ist deutlich die Einlagerung von NPC's in die zuvor geschlossene Doppelmembran zu erkennen (Abb. 5.9). Die NPC's unterscheiden sich dabei morphologisch nicht von denen der Kontrollkerne (vgl. mit Abb. 5.5). Sowohl MVP als auch Vault-Partikel induzieren somit den Einbau von funktionellen NPC's in den aus der 40% Membranfraktion gebildeten porenlosen Kernen.



**Abb. 5.9:** Elektronenmikroskopische Analyse der Insertion von NPC's durch rekombinantes MVP. In der Übersichtsaufnahme ist ein Teil eines in vitro Kernes dargestellt (A). Das Chromatin (CH) ist durch eine Kernhülle umschlossen. In der Vergrößerung (Transversalschnitt B) ist zu erkennen, dass zahlreiche NPC's in die Kernhülle eingelagert wurden (Pfeile in B). Die tangentielle Sicht auf die Kernhülle (C) zeigt deutlich die Transportkanäle der inserierten NPC's. Die Eichstriche entsprechen 0,5 µm in A und je 0,1 µm in B und C.

### 5.7 Lösliches MVP ist für die Kernporenkomplexbildung hinreichend

Die Bildung von Vault-ähnlichen Partikeln aus MVP-Oligomeren findet spontan und in einem Prozess der Selbstzusammenlagerung statt (Stephen et al., 2001; Poderycki et al., 2006). Um zu untersuchen, ob NPC's nur durch Vault-Komplexe oder ebenso durch MVP-Monomere gebildet werden können, wurde aufgereinigtes His-MVP in Zytosol inkubiert, um die eventuelle Zusammenlagerung zu Vault-ähnlichen Komplexen zu ermöglichen (siehe 4.5.12). Anschließend wurde die Probe für 1 h bei 100.000 x g abzentrifugiert. Gebildete Vault-Partikel werden somit sedimentiert (P100), während lösliches MVP im Überstand verbleibt (S100). Sowohl der Überstand als auch das Sediment wurden getrennt abgenommen und zunächst der jeweilige Anteil an MVP in einem Immunblot bestimmt.

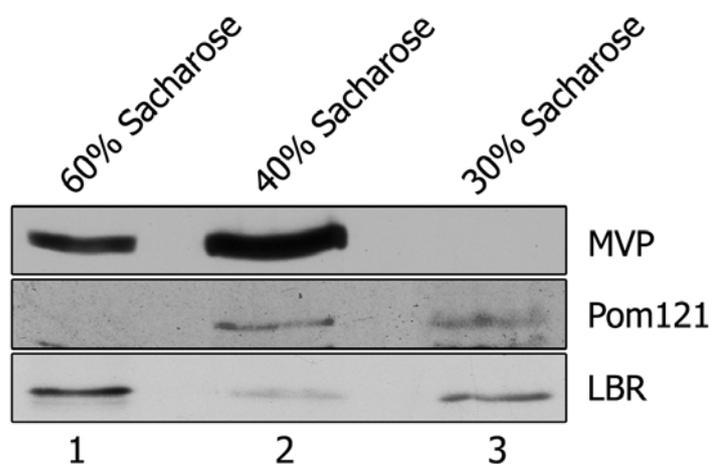


**Abb. 5.10:** Sowohl lösliches MVP, als auch Vault Partikel sind in der Lage, den Einbau von NPC's in eine bestehende Doppelmembran zu induzieren. A: His-MVP wurde für 10 min. in Zytosol inkubiert, um die Bildung von Vault-Partikeln zu ermöglichen. Sowohl der lösliche Überstand (S100) als auch das Sediment (P100) wurden in einem Immunblot auf die Verteilung von MVP untersucht. Etwa  $\frac{2}{3}$  des eingesetzten MVP wurde in der P100-Fraktion nachgewiesen. B: Durch den immunfluoreszenzmikroskopischen Nachweis von Nup62 konnte gezeigt werden, dass sowohl lösliches MVP (b'') als auch komplexiertes MVP (c'') zur Bildung von NPC's in die bestehende Doppelmembran führen. Nup62 wurde ebenso in Kontrollkernen durch die Zugabe von unbehandeltem His-MVP zu porenlosen Kernen nachgewiesen (a''). Im Gegensatz dazu ließ sich in porenlosen Kernen nach der Zugabe von PBS kein Nup62 nachweisen (d''). Die korrespondierenden Phasenkontrastaufnahmen (a – d) sowie die Färbung der DNA mit Hoechst (a' – d') sind ebenfalls dargestellt. Der Eichstrich entspricht 10  $\mu$ m.

Durch Inkubation der Nitrozellulose mit einem MVP-Antikörper konnte gezeigt werden, dass etwa  $\frac{2}{3}$  des eingesetzten His-MVP Komplexe ausbildet bzw. aggregiert und somit in der P100-Fraktion vorlag (Abb. 5.10, A, Spur 2). Etwa  $\frac{1}{3}$  des rekombinanten MVP's liegt nach der Inkubation in Zytosol weiterhin als freie Monomere vor (Abb. 5.10, A, Spur 1). Die Analyse der NPC-Bildung mit beiden Fraktionen zeigte, dass sowohl aggregiertes MVP (Abb. 5.10, B, c'') als auch lösliches MVP (Abb. 5.10, B, b'') dazu fähig sind, in einer bestehenden Doppelmembran die Insertion von NPC's zu induzieren. In beiden Fraktionen konnte durch indirekte Immunfluoreszenzaufnahmen Nup62 nachgewiesen werden.

### 5.8 MVP ist mit der 30% Membranfraktion assoziiert

Mit Hilfe einer massenspektrometrischen Analyse konnte gezeigt werden, dass MVP während der Membranaufreinigung zusammen mit der 30% Membranfraktion sedimentiert (Dissertation Friederike Vollmar). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob MVP tatsächlich mit der 30% Membranfraktion assoziiert vorliegt, oder ob MVP nur aufgrund seiner Dichte während der Gradientenzentrifugation zusammen mit der Membranfraktion isoliert wird.



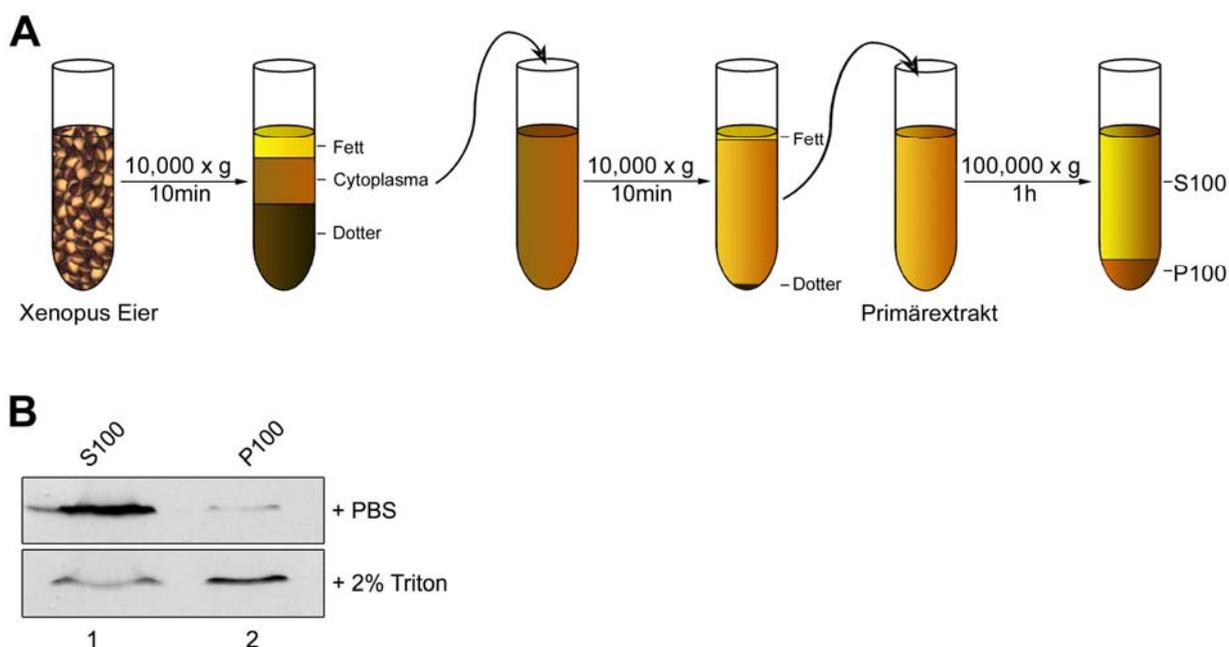
**Abb. 5.11:** MVP ist mit der 30% Membranfraktion assoziiert. Ein Aliquot der 30% Membranfraktion wurde auf 60% Sucrose eingestellt und mit 40% und 30% Sucroselösung überschichtet (siehe 4.5.6). Nach einer Flotationszentrifugation wurden die drei unterschiedlichen Phasen getrennt abgenommen und ein Immunblot mit dem monoklonalen Antikörper gegen MVP durchgeführt. Antikörper gegen das integrale Membranprotein Pom121 und LBR, ein Transmembranprotein der inneren Kernmembran, dienten als Marker für die Kernmembranvesikel. Ein Großteil von MVP flotierte zusammen mit Membranen in die 40% Sucroseschicht. Die in die 30% Sucroseschicht flotierten Membranen enthielten kein MVP, obwohl in diesen Membranen Pom121 und LBR nachweisbar ist. Ein Teil der MVP-assoziierten Membranen verblieb zusammen mit LBR in der 60% Sucroseschicht.

Zu diesem Zweck wurde mit der 30% Membranfraktion eine Flotationszentrifugation durchgeführt (siehe 4.5.6). Sind Proteine mit Membranen assoziiert, so flotieren sie in einem diskontinuierlichen Zuckergradienten zusammen mit den Membranen entsprechend der jeweiligen Dichte der Membran. Sind die Proteine nicht mit der Membran assoziiert, so verbleiben sie im Sediment, während die Membranen flotieren. In dem Versuch wurde ein Aliquot der 30% Membranfraktion auf 60% Sucrose erhöht und anschließend nacheinander mit 40% und 30% Sucroselösung überschichtet. Nach der Flotationszentrifugation wurden die drei Sucroseschichten getrennt abgenommen und die mit Trichloressigsäure gefällten Proteine durch einen Immunblot analysiert. Der Großteil von MVP flotierte zusammen mit den Membranvesikeln in die 40% Sucroseschicht, während ein Teil in der 60% Sucroseschicht verblieb (Abb. 5.11, obere Reihe), da aufgrund der kurzen Zentrifugationszeit nicht die gesamten Membranen flotieren. In der 30% Sucroseschicht war kein MVP nachweisbar. Interessanterweise flotierte ein Teil der Membranvesikel in die 30% Sucroseschicht und enthielt das integrale Membranprotein Pom121 (Abb. 5.11, mittlere Reihe) sowie das Transmembranprotein LBR (Abb. 5.11, untere Reihe), welches sich in der inneren Kernmembran befindet. Ein Teil der LBR-assoziierten Membranen verblieb in der 60% Sucroseschicht. Der Versuch zeigt somit, dass die 30% Membranfraktion aus unterschiedlichen Membranvesikeln besteht, von denen ein Teil mit MVP assoziiert ist.

### **5.9 MVP ist zellulär mit Membranen assoziiert**

Nachdem belegt werden konnte, dass MVP mit der aufgereinigten 30% Membranfraktion assoziiert ist, sollte die zelluläre Gesamtverteilung von MVP näher charakterisiert werden. In früheren Arbeiten wurde die zelluläre Lokalisation von MVP durch Verwendung von GFP-markiertem MVP und durch Immunfluoreszenzen untersucht. Hierbei wurde MVP sowohl diffus zytoplasmatisch als auch im Bereich des Nukleus und an der Kernhülle lokalisiert (Steiner et al., 2006; van Zon et al., 2006). Um die zelluläre Verteilung von MVP spezifischer zu analysieren, wurde MVP durch Immunblotanalysen nach subzellulärer Fraktionierung detektiert. Hierfür wurde *Xenopus* Eiextrakt bei 100.000 x g zentrifugiert und der Überstand (S100) sowie das

Sediment (P100) getrennt abgenommen (siehe 4.5.4). Die S100 Fraktion enthält alle Membranen und war das Ausgangsprodukt für die Membranaufreinigung (Abb. 5.12, A). Proteinkomplexe und -partikel, die nicht mit Membranen assoziiert sind, werden durch die Zentrifugation bei 100.000 x g sedimentiert. Der Großteil von MVP bleibt in der S100 Fraktion, ist also mit Membranen assoziiert (Abb. 5.12, B, oberer Balken). Nur ein geringer Anteil der Vault-Partikel findet sich in der Sedimentfraktion und ist somit nicht mit Membranen assoziiert (Abb. 5.12, B, oberer Balken). Werden dagegen die Membranen des Eiextrakts vor der Zentrifugation mit Triton X-100 aufgelöst, ist MVP frei und sedimentiert (Abb. 5.12, B, unterer Balken). Zelluläres MVP ist somit hauptsächlich membranassoziiert. Da MVP in vivo Bestandteil von Vault-Partikeln ist, ist folglich auch Vault membranassoziiert. Im Folgenden wird, wenn nicht anders vermerkt, weiterhin von MVP die Rede sein, was Vault-Partikel mit einschließt.

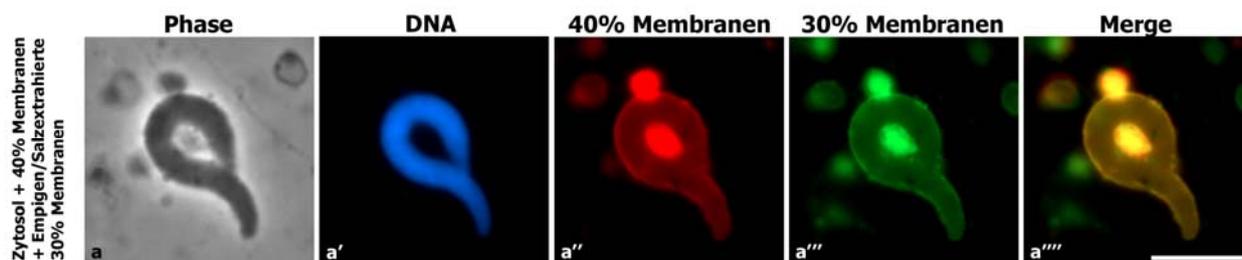


**Abb. 5.12:** Der Großteil des endogenen MVP/Vault ist mit Membranen assoziiert. A: Durch die Zentrifugation von *Xenopus* Eiextrakt bei 100.000 x g für 1 h werden freie Partikel und Proteinkomplexe sedimentiert, während die Membranen zusammen mit den assoziierten Proteinen im Überstand verbleiben. In der schematischen Darstellung sind die Einzelschritte dargestellt, die zur Fraktionierung von Membranen und löslichen Partikeln führen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand (S100) und das Sediment (P100) für einen Immunblot verwendet. B: Der monoklonale MVP-Antikörper detektiert den Großteil von MVP/Vault in der S100 Fraktion. Werden die endogenen Membranen durch die Zugabe von 2% Triton X-100 vor der Zentrifugation aufgelöst, wird der Großteil von MVP/Vault in der P100 Fraktion detektiert. Endogenes MVP/Vault ist somit hauptsächlich membranassoziiert.

### 5.10 MVP ist für die Integration der 30% Membranfraktion in die Kernhülle nicht notwendig

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die 30% Membranfraktion für die Bildung der NPC's verantwortlich ist und der entscheidende Faktor hierbei das membranassoziierte MVP ist, stellte sich die Frage, ob der Membrananteil der 30% Membranfraktion trotz der Abwesenheit von MVP

noch in die Kernhülle eingebaut wird. Hierfür wurden durch das Detergenz Empigen und hohe Salzkonzentrationen an Membranen assoziierte Proteine extrahiert (siehe 4.5.7). Um das Verhalten von MVP-depletierten Membranen zu visualisieren, wurde die salzextrahierte 30% Membranfraktion mit dem Membranfarbstoff DiO<sub>C18</sub> angefärbt. Die 40% Membranfraktion wurde mit dem Farbstoff Dil<sub>C18</sub> gefärbt und beide Membranfraktionen zusammen mit Chromatin, Zytosol und Energie inkubiert.



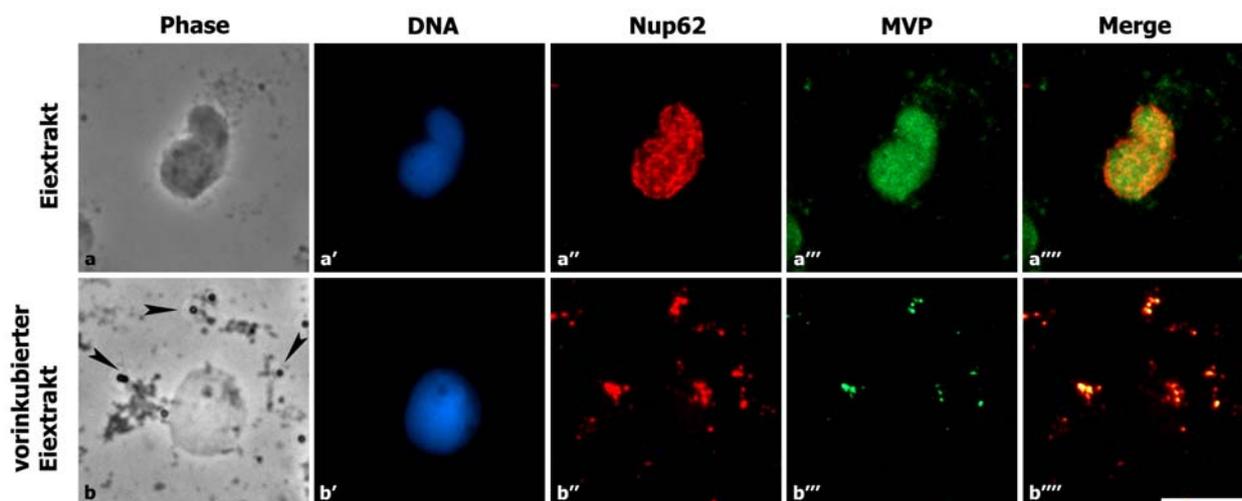
**Abb. 5.13:** Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Einbaus von Empigen/salzextrahierten 30% Membranen in die Kernmembran. 40% Membranen wurden mit Dil<sub>C18</sub>, salzextrahierte 30% Membranen mit DiO<sub>C18</sub> gefärbt und die Bildung der Kernmembran untersucht. Sowohl 40% Membranen (a'') als auch die salzextrahierten 30% Membranen (a''') bildeten eine geschlossene Kernmembran um das Chromatin (a'''). Die korrespondierende Phasenkontrastaufnahme (a) und die Färbung der DNA mit Hoechst (a') sind ebenfalls dargestellt. Der Eichstrich entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

Trotz der Extraktion von MVP von der 30% Membranfraktion wird diese noch zusammen mit der 40% Membranfraktion in die Kernmembran integriert (Abb. 5.13). Da durch die Salzextraktion alle membranassoziierten Proteine von den Membranen entfernt sind, erfolgt die Fusion von 40% und 30% Membranvesikeln unabhängig von MVP. Durch die Extraktion von MVP verliert die 30% Membranfraktion jedoch ihre Fähigkeit zur NPC-Bildung (Dissertation Friederike Vollmar). Der Einbau der reinen Membranvesikel in die Doppelmembran führt nicht zur Ausbildung von NPC's.

### 5.11 MVP co-lokalisiert mit Porenkomplexen der Annulate Lamellae

Die Bildung von Annulate Lamellae, Organellen aus Membranstapeln mit zahlreichen Porenkomplexen (siehe 2.10), kann durch die Inkubation von *Xenopus* Eiextrakt mit Energie in Abwesenheit von Chromatin induziert werden (Dabauvalle et al., 1991). Gibt man in derartig vorbehandelten Extrakt Chromatin, bilden sich porenlose Kerne. Durch die Bildung von Annulate Lamellae werden in dem Extrakt also Faktoren depletiert, die zur Ausbildung von NPC's in der Kernhülle benötigt werden (Ewald et al., 1997). In der Arbeit sollte nachgewiesen werden, ob durch die Bildung der Annulate Lamellae MVP aus dem Extrakt depletiert wird und somit nicht mehr zur Bildung von NPC's beitragen kann. Aktivierter Eiextrakt wurde nach der Zugabe eines

ATP-regenerierenden Systems für 4 h bei RT inkubiert (siehe 4.5.14.1). In dieser Zeit bilden sich zahlreiche Annulate Lamellae, die im Lichtmikroskop als runde, granuläre Strukturen erkennbar sind (Abb. 5.14, b, siehe Pfeile). Dieser vorinkubierte Extrakt wurde anschließend zur Bildung von in vitro Kernen mit *Xenopus* Spermienchromatin versetzt. Anschließend wurde die Probe mit Formaldehyd fixiert (siehe 4.6.1.1) und mit einem monoklonalen Antikörper gegen MVP sowie einem polyklonalen Antikörper gegen das Nukleoporin Nup62 inkubiert.

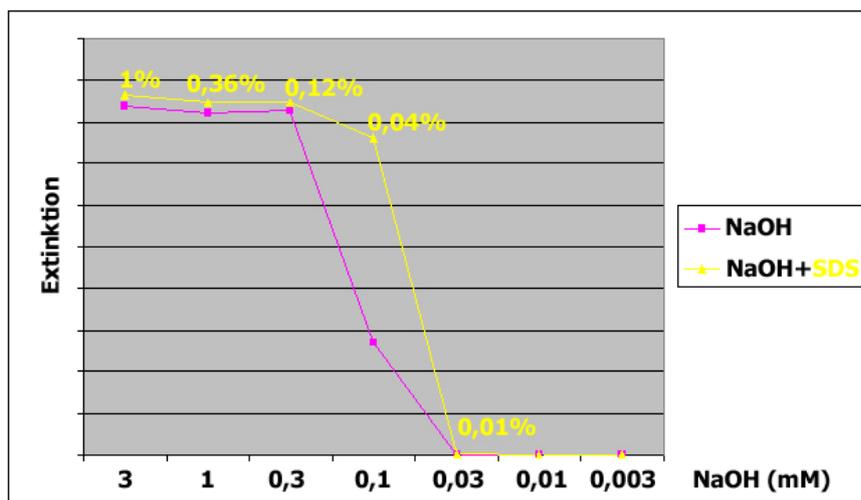


**Abb. 5.14:** Indirekte Immunfluoreszenzaufnahmen von in vitro Kernen und Annulate Lamellae. In vitro Kerne, die in *Xenopus* Eiextrakt gebildet werden, zeigen eine deutliche Co-Lokalisation von Nup62 und MVP an der Kernhülle (a'' – a'''). Werden in *Xenopus* Eiextrakt zunächst Annulate Lamellae gebildet (siehe Pfeile in b), bilden sich in diesem vorinkubierten Extrakt porenlose in vitro Kerne und führen zur Co-Lokalisation von Nup62 und MVP in den ausgebildeten Annulate Lamellae (b'' – b'''). Die korrespondierenden Phasenkontrastaufnahmen (a und b) sowie die Färbung der DNA mit Hoechst (a' und b') sind ebenfalls dargestellt. Der Eichstrich entspricht 10  $\mu$ m.

Die gebildeten in vitro Kerne enthalten keine Kernporenkomplexe (Ewald et al., 1997), wie die fehlende Markierung der Kernhülle durch den Nup62 Antikörper anzeigt (Abb. 5.14, b''). Dagegen lokalisiert Nup62 innerhalb der gebildeten Annulate Lamellae (Abb. 5.14, b siehe Pfeile, b''). MVP lokalisiert in diesen in vitro Kernen ebenfalls nicht an der Kernhülle (Abb. 5.14, b'''), sondern co-lokalisiert zusammen mit den Porenkomplexen der Annulate Lamellae (Abb. 5.14, b'''). Als Kontrolle dienten in dem Versuch in vitro Kerne, die in Eiextrakt gebildet wurden, in welchem zuvor keine Bildung von Annulate Lamellae induziert wurde. In dem unbehandelten Eiextrakt bildeten sich normale in vitro Kerne, in denen sowohl Nup62 (Abb. 5.14, a'' und a''') als auch MVP (Abb. 5.14, a''' und a''') deutlich an der Kernhülle lokalisierten. So konnten wir zeigen, dass der durch die Bildung von Annulate Lamellae depletierte Faktor innerhalb von *Xenopus* Eiextrakt, welcher für die Bildung von NPC's verantwortlich ist, MVP war.

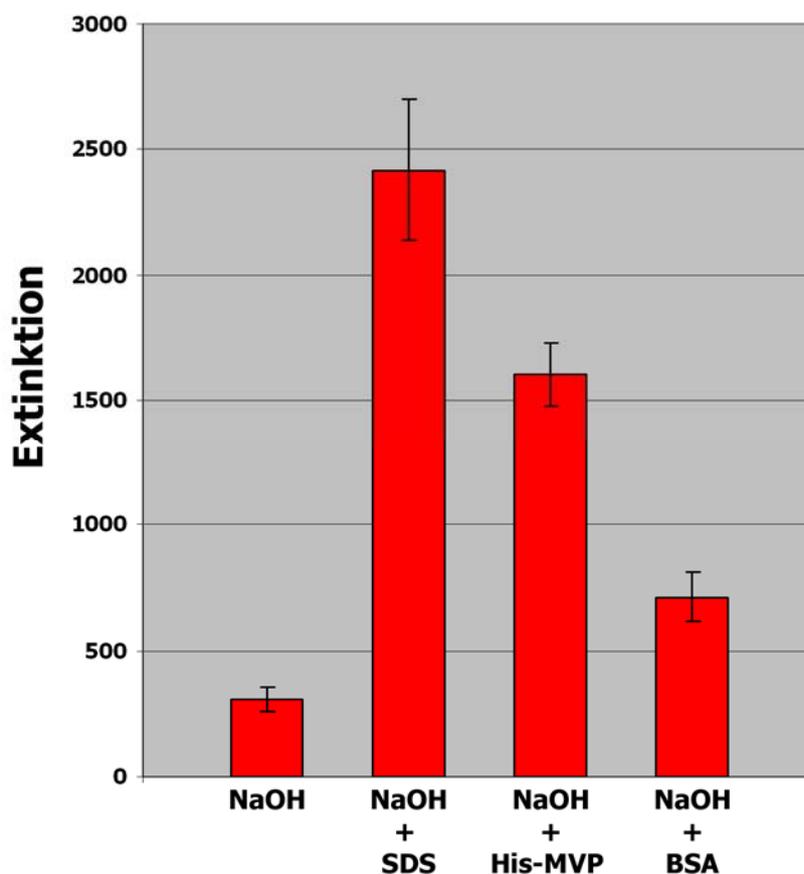
### **5.12 His-MVP perforiert unilamellare Liposomen**

Um die Induktion der NPC-Bildung durch MVP näher zu charakterisieren, sollten die molekularen Mechanismen, die zur de novo Formation von NPC's notwendig sind, untersucht werden. Ein hypothetisches Szenario ist die lokale Fusion von innerer und äußerer Kernhülle, ausgelöst durch bestimmte membranbeeinflussende Faktoren. Um einen direkten Einfluss von MVP auf Membranen nachweisen zu können, wurde eine vereinfachte Versuchsanordnung gewählt, in der ein artifizielles Membransystem durch unilamellare Liposomen gebildet wird. Zur Bildung der Liposomen wurde das Phospholipid 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin (POPC) verwendet (siehe 4.4.1). Um die Einwirkung von MVP auf die durch POPC gebildete Membran zu detektieren, waren die unilamellaren Liposomen mit dem pH-sensitiven Farbstoff HPTS befüllt. Dieser Farbstoff emittiert je nach pH-Wert des umgebenden Milieus unterschiedlich stark. Die Extinktion des Farbstoffes bei einer Anregung von 454 nm wurde mit einem Mikrotiterplatten-Spektrometer ausgelesen (siehe 4.4.2). Für die Versuchsreihe waren die mit HPTS befüllten Liposomen gegen ddH<sub>2</sub>O dialysiert, um einen neutralen pH-Wert zu gewährleisten. Bei neutralem pH-Wert erfolgt bei einer Anregung mit 454 nm keine Extinktion von HPTS. Die Perforation der Liposomen kann durch den Einstrom von NaOH und die dadurch ausgelöste Erhöhung der HPTS-Extinktion gemessen werden. In einer ersten Versuchsreihe wurde das optimale Verhältnis von HPTS- zu NaOH-Konzentration durch Titration gemessen. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Titrationsreihen parallel angeordnet. In der ersten Titrationsreihe wurden die HPTS-befüllten Liposomen mit abfallenden NaOH-Konzentrationen versetzt, um den Influx von Ionen durch die geschlossenen Liposomen zu minimieren. Der Influx von Ionen ist konzentrationsabhängig und erfolgt auch durch geschlossene Plasmamembranen (Stillwell und Doram, 1980). Bei 0,1 mM NaOH konnte nur noch ein geringer Einstrom von Ionen und eine dadurch ausgelöste Extinktion von HPTS nachgewiesen werden (Abb. 5.15, violette Kurve). In einer zweiten Titrationsreihe wurde neben den zuvor verwendeten NaOH-Konzentrationen SDS in absteigenden Volumenanteilen zugefügt. Durch SDS wird die Membranstruktur zerstört und durch den dadurch ausgelösten Einstrom von NaOH eine schlagartige Erhöhung der Extinktion von HPTS ausgelöst.



**Abb. 5.15:** Titration von HPTS-befüllten Liposomen gegen NaOH und SDS. Vor der Zugabe von NaOH befanden sich die Liposomen in neutralem pH-Milieu, unter diesen Bedingungen erfolgt keine Extinktion von HPTS. Es wurden parallel zwei Titrationsreihen angefertigt. In der ersten Reihe (NaOH, violett) erfolgte die Titration der Liposomen schrittweise von 3 mM bis 0,003 mM NaOH. Ab einer Endkonzentration von 0,1 mM NaOH findet nur ein geringer Influx von Ionen in die Liposomen statt, der zu einer leichten Extinktion von HPTS führt. Unterhalb von 0,1 mM sind die Messwerte nicht mehr detektierbar. In der zweiten Titration wurden die Liposomen zusätzlich zu den absteigenden NaOH-Konzentrationen mit SDS titriert, um die Liposomenmembran aufzulösen und durch den Einstrom von NaOH die Extinktion von HPTS zu erhöhen (NaOH + SDS, gelb). Bei der Zugabe von 0,04% SDS kann ein deutlicher Unterschied in der Extinktion beider Kurven festgestellt werden. Die optimalen Messbedingungen, um die Perforation von Liposomen zu detektieren, liegen deshalb bei einer Endkonzentration von 0,1 mM NaOH

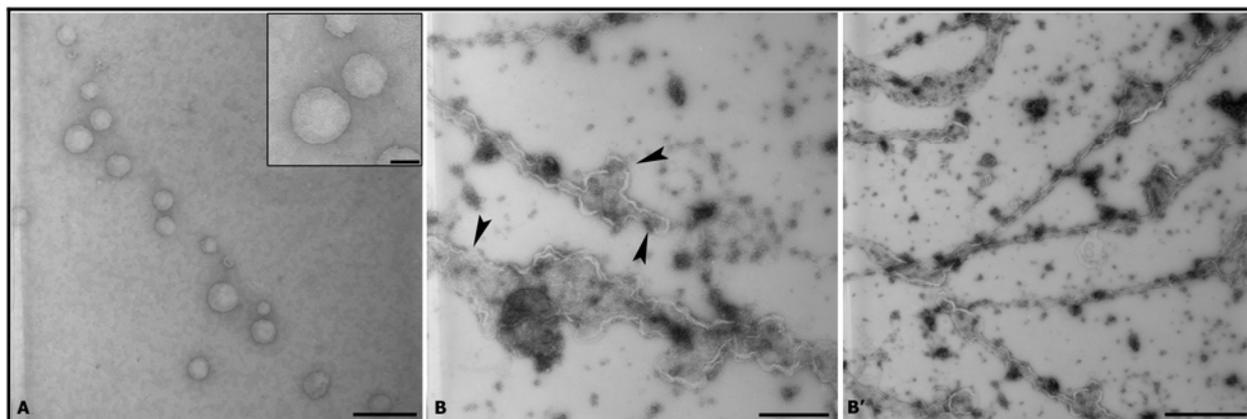
Bei der zuvor gemessenen geringen Extinktion von HPTS bei 0,1 mM NaOH zeigte sich durch die Zugabe von 0,04% SDS ein deutlicher Anstieg in der Extinktionsintensität, verursacht durch den Einstrom von NaOH in die perforierten Liposomen (Abb. 5.15, gelbe Kurve). Die folgenden Liposomen-Perforations-Versuche wurden deshalb mit den oben genannten Konzentrationen durchgeführt, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Die Zugabe von His-MVP führte zum Einstrom von NaOH in das Innere der Liposomen, gefolgt von einem starken Anstieg der Extinktion von HPTS (Abb. 5.16, NaOH + His-MVP). Der Grundinflux von NaOH wurde dabei um mehr als das Dreifache überschritten, blieb jedoch knapp unterhalb der maximalen Extinktion, ausgelöst durch die vollständige Auflösung der Liposomen durch SDS (Abb. 5.16, NaOH + SDS). Ein geringer Anstieg der Extinktion wurde durch Kontrollansätze mit BSA erzielt. His-MVP manipuliert folglich die Lipidmembran der Liposomen in einer Art und Weise, die den Einstrom von Ionen aufgrund der Perforation der Membran zur Folge hat.



**Abb. 5.16:** His-MVP perforiert unilamellare Liposomen. Die mit dem pH-sensitiven Farbstoff HPTS befüllten Liposomen wurden für alle Messreihen in 0,1 mM NaOH titriert. Unter diesen Bedingungen findet nur ein geringer Influx von NaOH in das Innere der Liposomen statt, der sich in einer geringen Extinktion von HPTS äußert (Balken NaOH). Bei der Zugabe von 0,04% SDS werden die Liposomen aufgelöst und NaOH kann ungehindert einströmen. Die Zerstörung der Liposomen äußert sich in dem starken Anstieg der Extinktion (Balken NaOH + SDS). Werden die Liposomen mit 4  $\mu$ M His-MVP inkubiert, so ist ebenfalls ein deutlicher Anstieg der Extinktion messbar (Balken NaOH + His-MVP). Die Negativkontrolle mit BSA führt zu einer Extinktion, die maximal die Hälfte der Intensität der His-MVP induzierten Extinktion erreicht (Balken NaOH + BSA). His-MVP ist somit in der Lage, die Lipidmembran der Liposomen zu manipulieren bzw. sie zu perforieren. Zur Auswertung der Extinktionen wurden je 12 Versuchsansätze analysiert.

### 5.13 His-MVP induziert die Umstrukturierung von Lipidmembranen

Nachdem mit Hilfe eines pH-sensitiven Farbstoffes gezeigt werden konnte, dass MVP in der Lage ist, Liposomen in ihrer Struktur zu verändern und den Einstrom von Ionen zu bewirken, sollte dieser Vorgang direkt visualisiert werden. Zu diesem Zweck wurden Liposomen mit His-MVP inkubiert und für die Negativkontrastierung auf kohlebeschichtete Kupfernetzchen übertragen (siehe 4.6.5.5). Unter dem TEM sind die verwendeten unbehandelten Liposomen als runde, unilamellare Vesikel sichtbar (Abb. 5.17, A). Die Zugabe von His-MVP bewirkte indes die Fusion einzelner Liposomen zu langen tubulären Strukturen (Abb. 5.17, B'). Zudem ließ sich stellenweise die Perforation der zuvor geschlossenen Lipidmembran feststellen (Abb. 5.17, B, siehe Pfeile), was die zuvor erhaltenen Ergebnisse des Perforations-Essays bekräftigt.

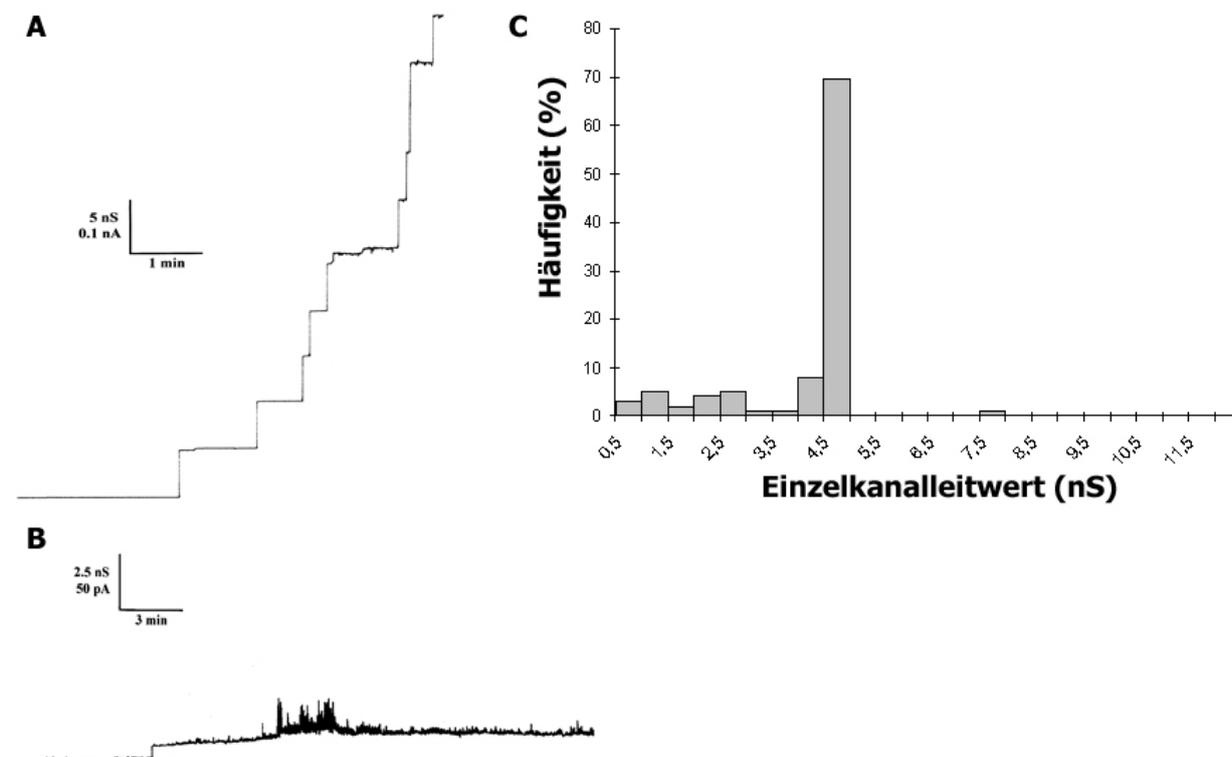


**Abb. 5.17:** Negativkontrastierung von Liposomen unter dem Einfluss von His-MVP. Um den Einfluss von His-MVP auf Lipidmembranen direkt zu visualisieren, wurden Liposomen in Puffer und GTP zusammen mit dem rekombinanten Protein bei 37°C inkubiert. Nach 20 min. wurden die Liposomen auf kohlebeschichtete Kupfernetzchen pipettiert und nach der Negativkontrastierung mit einem TEM untersucht. A: Unbehandelte Liposomen sind als runde vesikelartige Strukturen sichtbar. B – B': Die Zugabe von His-MVP bewirkt eine gravierende Änderung der Liposomenstruktur und induziert die Perforation der Membranen (siehe Pfeile in B) sowie die Bildung von länglichen Membrantuben (siehe B'). Die Eichstriche entsprechen je 1  $\mu\text{m}$  in A und C, 500 nm in B und 100 nm im vergrößerten Bildausschnitt von A.

#### 5.14 His-MVP bildet Poren in artifiziellen schwarzen Lipidmembranen

Um den Effekt von MVP an Lipidmembranen näher zu charakterisieren, wurden Versuche mit rekombinantem MVP an artifiziellen schwarzen Lipidmembranen durchgeführt (siehe 4.4.3). Schwarze Lipidmembranen sind ein hervorragendes Modellsystem, um die Bildung von Poren in einer Lipidmembran zu untersuchen. Die 1962 von Mueller entwickelte Methode zur Herstellung einer Lipidmembran in wässriger Lösung (Mueller et al., 1962) wird nach wie vor fast unverändert angewendet und sollte in dieser Arbeit die Porenbildung von MVP in Lipidmembranen belegen. In einer Teflonkammer wurde eine Membran aus DiphPC in n-Dekan erzeugt und nach der Bildung einer schwarzen Membran die auf ihre Porenbildung zu untersuchenden Proteine hinzugefügt. Bilden sich in der Membran Poren, so entstehen durch die in der Lösung diffundierenden Ionen Ströme, die gemessen werden können und durch ein Oszilloskop sichtbar gemacht werden. Die Zugabe von 12  $\mu\text{M}$  His-MVP zu schwarzen Membranen führte zu einer schrittweisen Erhöhung der Stromstärke (Abb. 5.18, A). Dieser Anstieg der Leitfähigkeit wird durch die Entstehung von Poren ausgelöst, die His-MVP in der Membran aufbaut. Durch die Membrankanäle kann das in der Kammer enthaltene KCl fließen und messbare Ströme bilden. Die durch MVP gebildeten Poren besaßen einen durchschnittlichen Einzelkanalwert von 4,5 nS (Abb. 5.18, C). Da die stufenweise Veränderung der Stromstärke ausschließlich nach oben gerichtet war, kann davon ausgegangen werden, dass die Kanäle unter den verwendeten Spannungsbedingungen stets geöffnet waren und den Strom von KCl vermittelten. Zur Kontrolle wurde die Porenbildung durch weitere Proteine überprüft. Hierbei

wurde das integrale Membranprotein MAN1 (rekombinantes His-MAN1, Dissertation Martin Gareiß) der inneren Kernmembran und BSA in derselben Konzentration wie His-MVP verwendet. Die Zugabe von His-Man1 bzw. BSA zu schwarzen Lipidmembranen aus DiphPC/n-Dekan erzeugte keine Erhöhung der Stromstärke (Abb. 5.18, B, Daten für BSA nicht gezeigt). Es bildeten sich somit unter diesen Bedingungen keine Poren in der Membran.

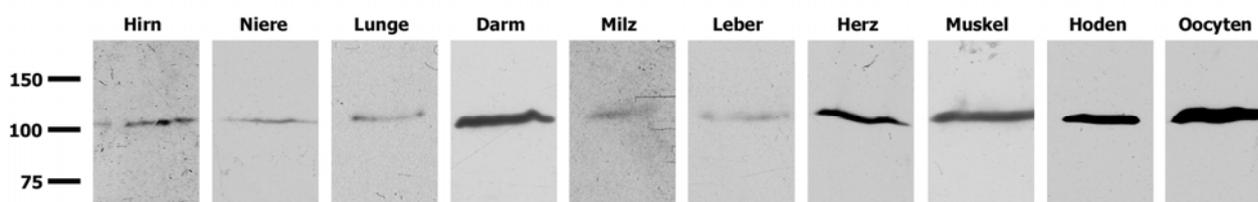


**Abb. 5.18:** A: Einzelkanalmessung für eine schwarze Membran aus DiphPC/n-Dekan in der Anwesenheit von His-MVP in Abhängigkeit der Zeit. Die wässrige Phase der Teflonkammer beinhaltete 1 M KCl, gepuffert mit 10 mM Tris/HCl (pH 7) und 12  $\mu$ M Protein, 1:10 verdünnt mit 1% Genapol. Die angelegte Spannung betrug 20 mV bei einer Temperatur von 20°C. Die Kurve zeigt den stufenweisen Anstieg der Stromstärke, ausgelöst durch die Porenbildung von His-MVP. B: Einzelkanalmessung von His-MAN1 an Membranen aus DiphPC/n-Dekan unter denselben Bedingungen wie in A. Die Zugabe von His-Man1 löst keine nennenswerte Erhöhung der Stromstärke aus. Es bildeten sich keine Poren in der Membran. C: Histogramm der möglichen Entstehung von Leitfähigkeiten an schwarzen Membranen aus DiphPC/n-Dekan in der Anwesenheit von His-MVP. Der durchschnittliche Einzelkanalleitwert betrug 4,5 nS für 99 gemessene Poren. Die Bedingungen der gebildeten Membran entsprachen den in A beschriebenen.

### 5.15 Nachweis von MVP in verschiedenen Geweben von *Xenopus laevis* durch Immunblot

Die Expression von MVP wurde bislang in einer Vielzahl von Organismen nachgewiesen. Dabei konnte gezeigt werden, dass MVP in unterschiedlichen Zelltypen exprimiert wird. In dieser Arbeit sollte die Expression von MVP in verschiedenen Zelltypen von *Xenopus laevis* untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden einem adulten Frosch verschiedene Gewebe nach einem

Protokoll von Newport (Newport und Dunphy, 1992) entnommen und die Proteine extrahiert (siehe 4.3.10). Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine in einer SDS-PAGE wurden diese auf eine Nitrozellulose transferiert und mit dem monoklonalen Antikörper gegen MVP inkubiert (1:5000 in TBST, Biotrend). Der Antikörper detektiert in allen entnommenen Geweben eine Proteinbande von  $\sim 100$  kDa, bei welcher es sich um MVP handelt. MVP wird somit in allen untersuchten Geweben von *Xenopus laevis* ubiquitär exprimiert.

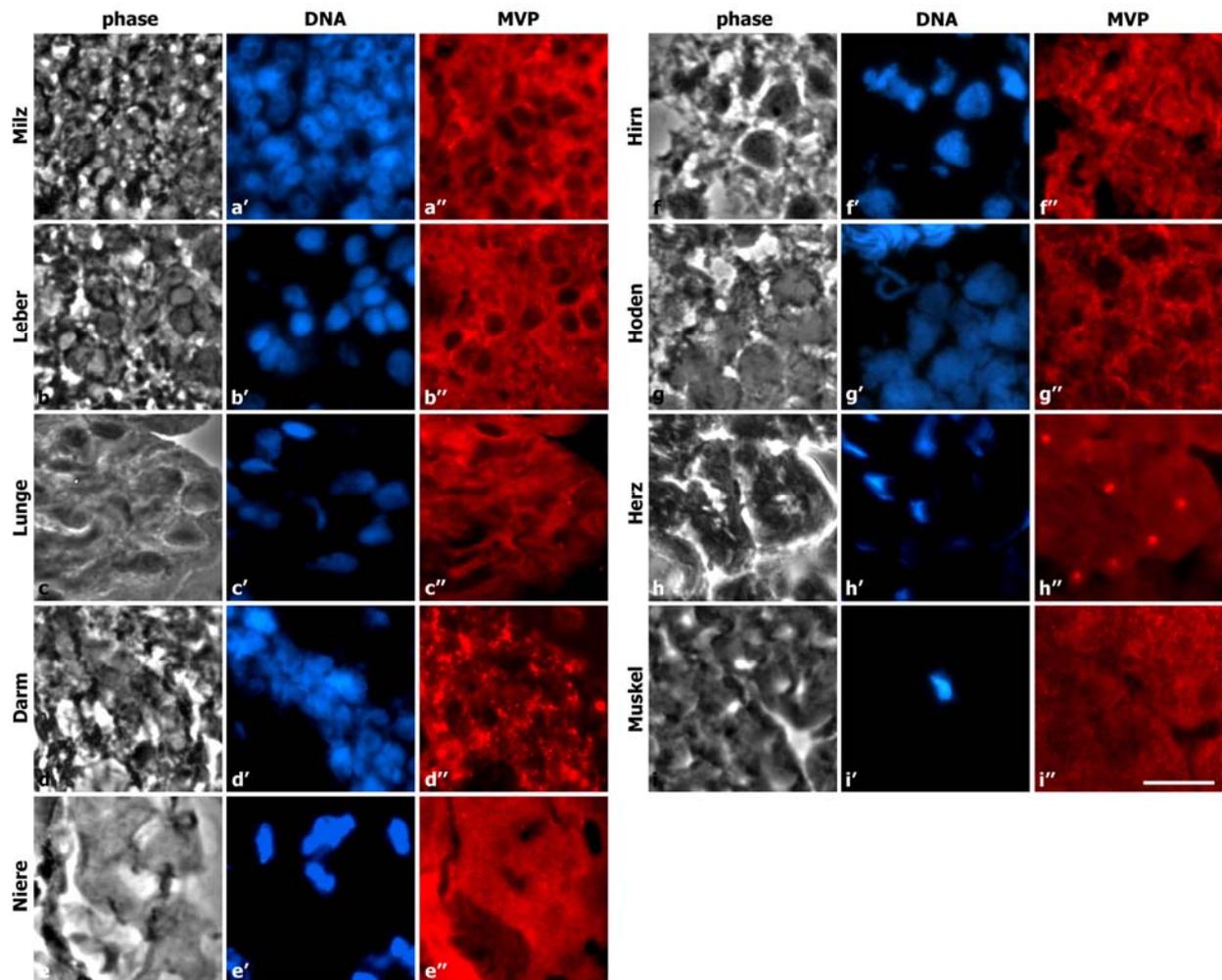


**Abb. 5.19:** Nachweis von MVP durch Immunblot verschiedener Gewebe eines adulten *Xenopus laevis*. Die aus den Proben extrahierten Proteine wurden per 15% SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran mit monoklonalem MVP-Antikörper inkubiert. Der Antikörper detektiert in allen entnommenen Geweben eine Bande von  $\sim 100$  kDa, das Major Vault Protein. Die Molekularmassen der Referenzproteine sind in kDa angegeben.

### 5.16 Intrazelluläre Lokalisation von MVP in verschiedenen Geweben von *Xenopus laevis*

Nachdem in verschiedenen Geweben von *Xenopus laevis* die Expression von MVP durch Immunblots nachgewiesen werden konnte, wurde die Lokalisation von MVP in diesen Geweben immunfluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die operativ entfernten Gewebe wurden in Methylbutan schockgefroren (siehe 4.6.2) und anschließend mit einem Kryostat-Mikrotom Gefrierschnitte mit einer Dicke von 5  $\mu\text{m}$  angefertigt (siehe 4.6.3). Nach der Fixierung der Präparate mit Aceton wurden die Proben jeweils mit dem monoklonalen Antikörper gegen MVP inkubiert und anschließend die zelluläre Lokalisation von MVP in den Geweben über den Texas-Red-gekoppelten Sekundärantikörper visualisiert. In allen Proben zeigt sich eine zumeist diffuse zytoplasmatische Verteilung von MVP (Abb. 5.20, a'' - i''). Im Bereich der Zellkerne ist MVP nicht nachweisbar (vgl. Abb. 5.20, a'' - c''). MVP lokalisiert in Leber- und Milzzellen zudem deutlich im Bereich der Kernhülle (Abb. 5.20g, a'' und b''). In Herzmuskelzellen bildet MVP Aggregate, die in der Immunfluoreszenz als rote Punkte sichtbar sind (Abb. 5.20, h''). Im Skelettmuskel sind diese Aggregate nicht nachweisbar (Abb. 5.20, i''). Die Immunfluoreszenzen belegen die vorherigen Untersuchungen, die MVP zellulär hauptsächlich im Zytoplasma verteilt vorfanden (Kickhoefer et al., 1996; van Zon et al., 2003; Steiner et al., 2006) sowie den Befund, dass MVP in verschiedenen Modellorganismen auch innerhalb des Zellkerns und an der Kernhülle

lokalisiert (Kickhoefer et al., 1998; Berger et al., 2000; Mossink et al., 2003; Slesina et al., 2005; van Zon et al., 2006).

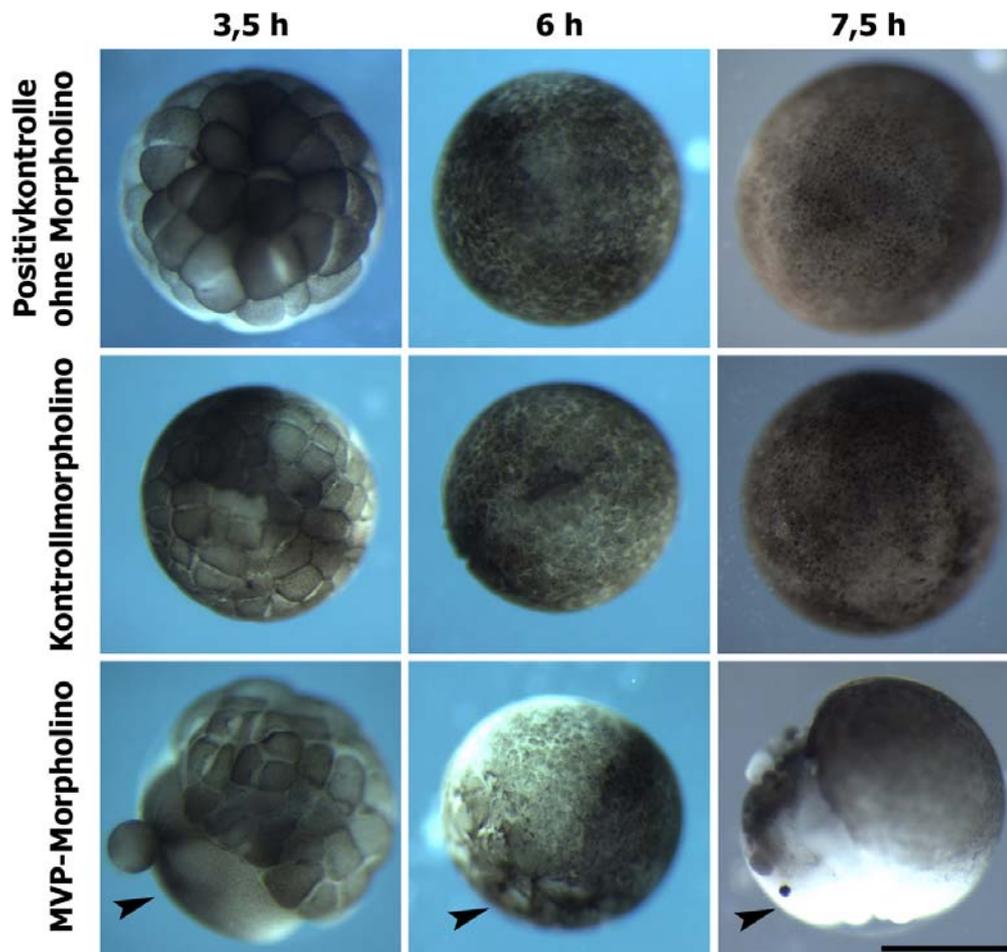


**Abb. 5.20:** Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisation von MVP in verschiedenen Geweben eines adulten, männlichen *Xenopus laevis*. Von den entnommenen Organen wurden nach der Schockgefrierung 5  $\mu\text{m}$  dicke Gefrierschnitte angefertigt und diese nach der Fixierung in Aceton mit monoklonalem Antikörper gegen MVP inkubiert. Im Bereich des Zellkerns zeigt sich zumeist eine sehr schwache Fluoreszenz von MVP, mit erhöhten Konzentrationen im Bereich der Kernhülle (a'' – c''). In allen Geweben zeigt sich zudem eine diffuse zytoplasmatische Verteilung von MVP (a'' – i''). Im Herzmuskel sind mehrere runde Aggregate zu erkennen (h''), die im Skelettmuskel nicht vorhanden sind (i''). Die korrespondierenden Phasenkontrastaufnahmen (a - i) sowie die Anfärbung der DNA mit Hoechst (a' - i') sind zusätzlich dargestellt. Der Eichstrich entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

### 5.17 MVP ist für die Frühentwicklung von *Xenopus laevis* essentiell

Da MVP bei der Bildung der NPC's beteiligt ist, sollte untersucht werden, ob MVP in der Frühentwicklung von *Xenopus laevis* eine Rolle spielt. Zu diesem Zweck wurden in Zwei-Zell-Stadien von *Xenopus* Embryonen MVP-Morpholinos (Gene Tools, LLC) mikroinjiziert (siehe 4.5.19.3). Mit Hilfe von Morpholinos kann die Expression von Genen spezifisch blockiert werden. Morpholino-Oligomere sind stabile Nukleinsäure-Analoga, die über Basenpaarung an die Ziel-mRNA binden und somit deren Translation im Zytoplasma verhindern (Summerton und Weller,

1997). Die Morpholinos wurden dabei in nur eine der beiden Zellen mikroinjiziert und die Entwicklung der Embryonen verfolgt. Die durch die MVP-Morpholinos inhibierte Translation der MVP-mRNA führte in der injizierten Hälfte der Embryonen zu einem Zellteilungsstopp (Abb. 5.21, MVP-Morpholino nach 3,5 h, siehe Pfeil).

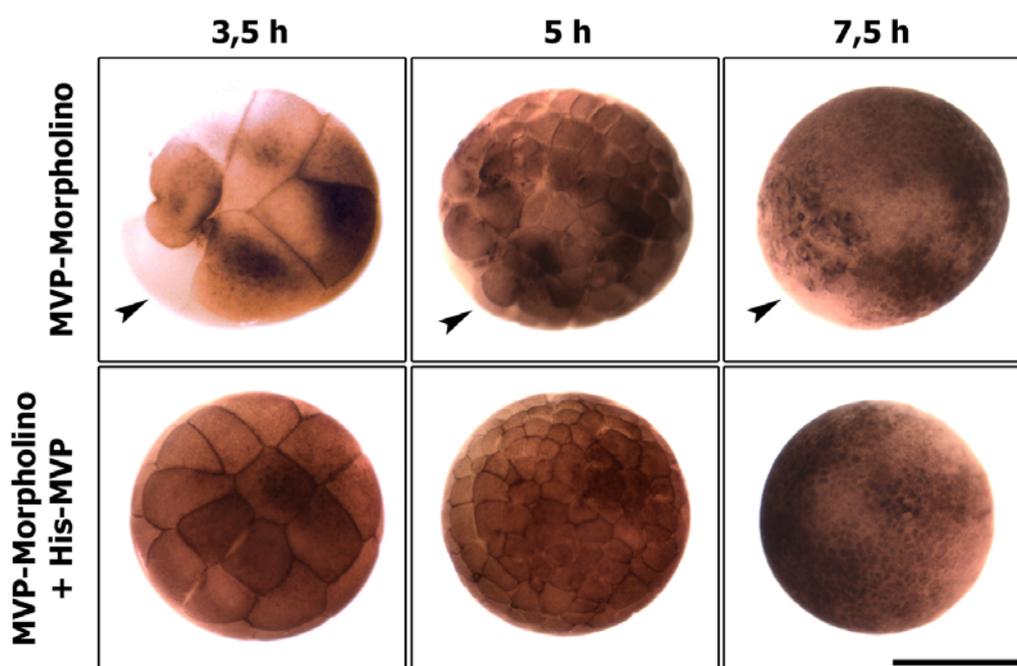


**Abb. 5.21:** Mikroinjektion von MVP-Morpholinos in *Xenopus* Embryonen. Morpholino-Oligomere, gerichtet gegen die Aminosäuresequenz von MVP, wurden nach der ersten Teilung von *Xenopus* Embryonen in eine der beiden Zellen injiziert (siehe Pfeil untere Reihe). Die Inhibierung der MVP-Translation führte auf der Injektionsseite der Embryos zu massiven Entwicklungsstörungen und -verzögerungen, während sich die andere Hälfte des Embryos normal zu differenzieren schien (siehe untere Reihe). Zur Kontrolle wurden *Xenopus* Embryonen in derselben Art und Weise mit Kontroll-Morpholinos injiziert (siehe mittlere Reihe) und die Normal-Entwicklung von nicht injizierten Embryonen ebenso verfolgt (siehe obere Reihe). Bei beiden Kontroll-Embryonen zeigten sich keine Änderungen in der Normal-Entwicklung. Die Embryonen wurden nach je 3,5 h, 6 h und 7,5 h fotografiert. Der Eichstrich entspricht 1 mm.

Die andere Hälfte der Embryonen teilte sich dagegen normal und entsprach dem Entwicklungsstadium 6 ½ - 7 (Abb. 5.21, vgl. obere Reihe Positivkontrolle und untere Reihe MVP-Morpholino bei 3,5 h). Die weitere Entwicklung der MVP-Morpholino-injizierten Embryonen verlief auf der injizierten Seite stark verzögert und wies starke Entwicklungsstörungen auf (Abb. 5.21, untere Reihe MVP-Morpholino 6 – 7,5 h, siehe Pfeile). Die Embryonen starben

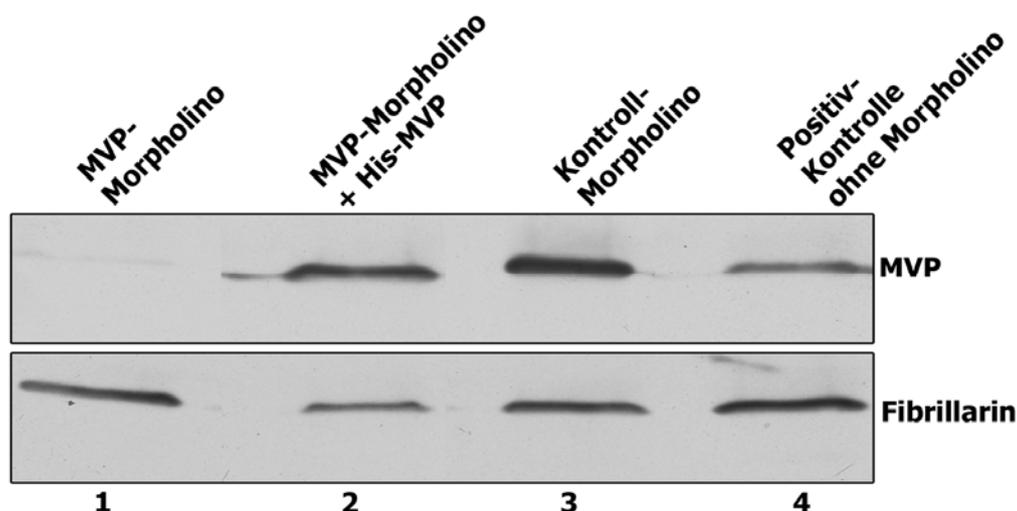
anschließend ab. Zur Kontrolle wurden *Xenopus* Embryonen mit unspezifischen Morpholinos injiziert. Bei diesen Embryonen verlief die Entwicklung ohne Störungen (Abb. 5.21, mittlere Reihe Kontrollmorpholino) und glich der von nicht injizierten Embryonen (Abb. 5.21, obere Reihe Positivkontrolle). Über einen Immunblot der Morpholino-injizierten Embryonen wurde der Gen-inaktivierende Effekt der MVP-Morpholinos belegt. Im Gegensatz zu den Kontroll-Embryonen (Abb. 5.23, Spur 3 und 4) waren in den MVP-Morpholino-injizierten Embryos kein MVP nachweisbar (Abb. 5.23, Spur 1).

Um zu zeigen, dass der Effekt auf der Gen-Inaktivierung von MVP beruhte, wurden Mikroinjektionsversuche mit MVP-Morpholinos in Kombination mit rekombinantem MVP durchgeführt. Hierzu wurde in eine Zelle von *Xenopus* Zwei-Zellstadien mit 10 ng MVP-Morpholinos und 50 ng His-MVP injiziert.



**Abb. 5.22:** Mikroinjektion von MVP-Morpholinos und His-MVP in *Xenopus* Embryonen. Die Injektion von MVP-Morpholinos führt in der injizierten Embryonen-Hälfte zu Entwicklungsverzögerungen und -schäden (siehe obere Reihe, Pfeil entspricht der Injektionsseite). Wird in *Xenopus* Embryonen neben den Morpholinos zusätzlich rekombinantes His-MVP injiziert, so wird der inhibierende Effekt der Morpholinos aufgehoben und es erfolgt die Normalentwicklung der Embryonen (siehe untere Reihe). Der Eichstrich entspricht 1 mm.

In diesen Embryonen konnte der inhibierende Effekt der MVP-Morpholinos durch das rekombinante MVP-Fusionsprotein aufgehoben werden und die Embryonen entwickelten sich gleich der Kontroll-Embryonen (Abb. 5.22, untere Reihe). Zudem ist MVP in diesen Embryonen auch im Immunblot nachweisbar (Abb. 5.23, Spur 2). MVP ist somit ein für die Normalentwicklung von *Xenopus laevis* essentieller Faktor.

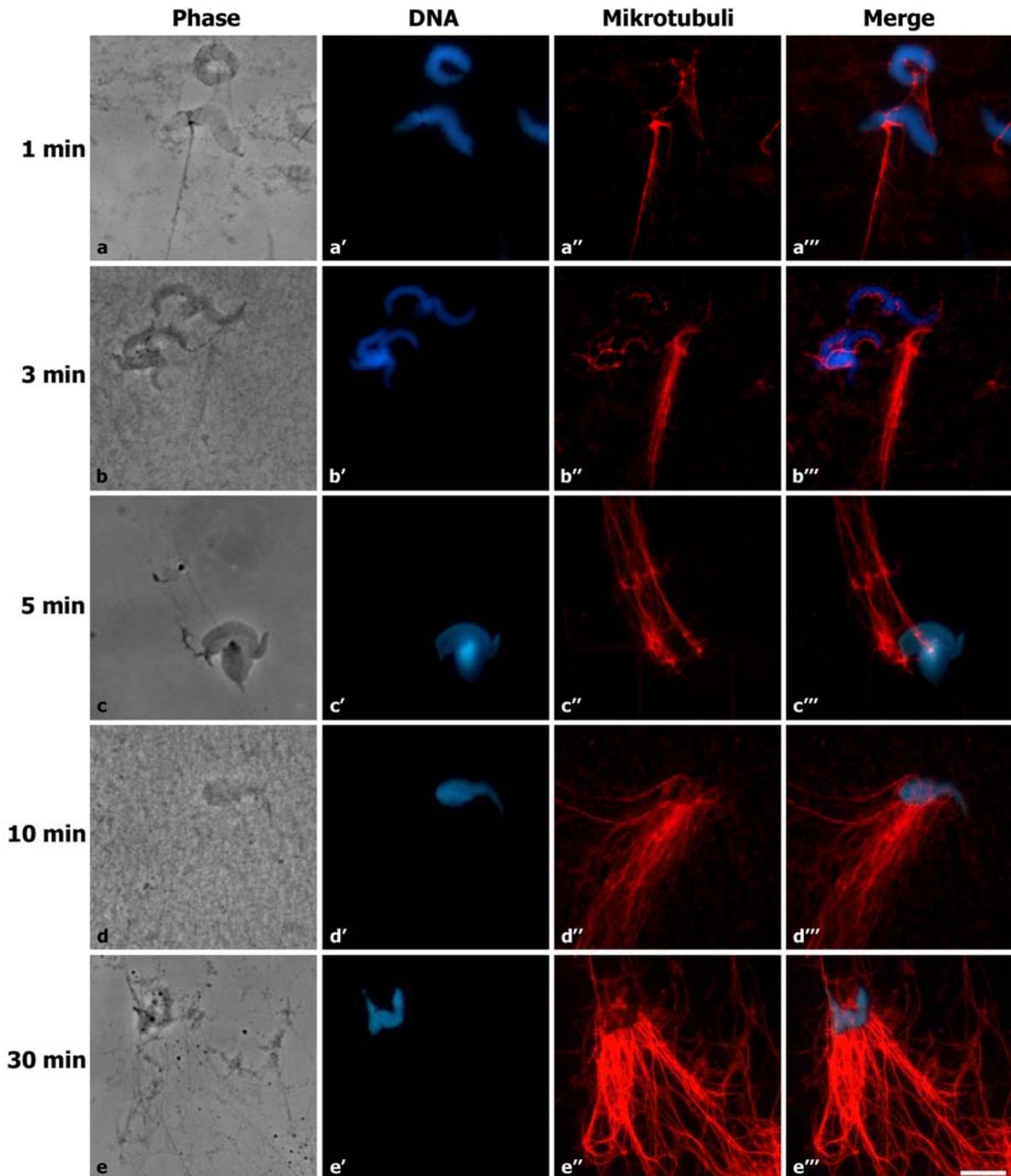


**Abb. 5.23:** Immunblot der Morpholino-injizierten Embryos mit monoklonalem MVP-Antikörper. MVP ist in den MVP-Morpholino-injizierten Embryos (Spur 1) im Gegensatz zu den Kontroll-Embryonen (Spuren 3 und 4) nicht nachweisbar. Durch die Zugabe von His-MVP wird der Gen-inhibierende Effekt der MVP-Morpholinos umgangen und MVP ist in diesen Embryonen detektierbar (Spur 2). Als Beladungsmarker wurde ein monoklonaler Antikörper gegen Fibrillarin eingesetzt (untere Reihe).

### 5.18 Die Bildung eines Mikrotubulinetzwerkes im zellfreien System von *Xenopus laevis*

Die Bildung von NPC's ist im zellfreien System von *Xenopus* abhängig von Mikrotubuli (Ewald et al., 2001). Wird die Polymerisation der Mikrotubuli durch die Zugabe von Inhibitoren wie Nocodazol oder Colchizin inhibiert, so bilden sich in *Xenopus* Eiextrakt porenlose Kerne. Durch diese Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Bildung einer Doppelmembran unabhängig von Mikrotubuli ist, die Insertion von NPC's aber ein intaktes Mikrotubulinetzwerk benötigt. Die Bildung der Mikrotubuli erfolgt vom Chromatin ausgehend, wobei die Minus-Enden im zellfreien System vom Chromatin weg weisen (Joshi 1998). In dieser Arbeit sollte die Abhängigkeit von Mikrotubuli in Bezug auf die isolierten 40% und 30% Membranfraktionen und MVP näher untersucht werden. Zunächst sollte die Kinetik der Polymerisation von Mikrotubuli im zellfreien System visualisiert werden. Die Zugabe von Chromatin zu *Xenopus* Eiextrakt induziert die Bildung von Mikrotubuli (siehe 4.5.17). Die Bildung der Mikrotubuli wurde nach bestimmten Zeitpunkten durch die Fixierung der Proben in Methanol gestoppt. Zur Detektion der Mikrotubuli wurden die Proben mit dem monoklonalen Antikörper gegen  $\beta$ -Tubulin inkubiert. Die Polymerisation von Mikrotubulifasern, ausgehend vom Chromatin, startet augenblicklich mit der Zugabe von *Xenopus* Eiextrakt (Abb. 5.24, a'' - a'''). Nach 3 min. beginnen sich die Mikrotubulifasern zu verzweigen (Abb. 5.24, b'' - b''') und mit fortschreitender Zeit häufen sich die Polymerisationsstartpunkte am Chromatin immer weiter an (Abb. 5.24, c'' - c'''). Bereits 10 min. nach Beginn der Polymerisationen hat sich ein Mikrotubulinetzwerk gebildet, welches sich

in alle Richtungen rund um das Chromatin erstreckt und verzweigt (Abb. 5.24, d'' – d'''). Innerhalb dieses Netzwerkes verdicken sich die einzelnen Mikrotubulifasern zu Bündeln und das Fließgleichgewicht sorgt dafür, dass ebenso viele Fasern auf- wie abgebaut werden (Abb. 5.24 e'' – e''').



**Abb. 5.24:** Immunfluoreszenzmikroskopische Visualisierung der Kinetik der Mikrotubuli-Polymerisation im zellfreien System von *Xenopus laevis* durch einen monoklonalen Antikörper gegen  $\beta$ -Tubulin. Bereits 1 min. nach der Zugabe von Chromatin zu Eiextrakt beginnt die Polymerisation von Mikrotubuli-Filamenten, ausgehend vom Chromatin (a'' – a'''). Mit fortschreitender Zeit bilden sich Bündel von Filamenten (b'' – b''') und die Polymerisation startet von immer zahlreicheren Ausgangspunkten aus (c'' – c'''). 10 min. nach dem Start der Polymerisationsinduktion ist ein regelrechtes Mikrotubulinetzwerk zu sehen, dass sich weit verzweigt vom Chromatin erstreckt (d'' – d'''). Nach

weiteren 30 min. verdicken sich die Mikrotubulifasern zu Bündeln (e'' –e'''). Die korrespondierenden Phasenkontrastaufnahmen (a – e), sowie die Färbung der DNA mit Hoechst (a' – e') sind ebenfalls dargestellt. Der Eichstrich entspricht 10 µm.

### **5.19 Klonierung von EYFP- $\alpha$ -Tubulin**

In dieser Arbeit sollte die Interaktion von Mikrotubuli mit den beiden isolierten Membranfraktionen untersucht werden. Um die Kinetik der Bildung der Kernhülle im Zusammenhang mit dem Mikrotubulinetzwerk ohne Fixierung sichtbar zu machen, wurde EYFP-markiertes Tubulin hergestellt. Die Aufreinigung des Fusionsproteins wurde durch einen His-Tag ermöglicht. Die Proteinsequenz wurde in einen pET21a-Vektor inkloniert, wodurch bei der Expression C-terminal 6 Histidinreste angefügt werden, über die das Fusionsprotein anschließend mit Hilfe einer Nickel-NTA-Agarose-Matrix aufgereinigt werden kann. Als cDNA diente der pEYFP-Tub-Vektor der Firma Clontech, welcher für ein Fusionsprotein kodiert, welches aus humanem  $\alpha$ -Tubulin und N-terminal angefügtem EYFP besteht (siehe 3.2.1). Über spezifische Primer wurde die EYFP- $\alpha$ -Tubulin-Sequenz aus dem Expressionsvektor heraus amplifiziert. Die Primer wurden so designt, dass an das 5'-Ende des PCR-Produktes eine NdeI-Schnittstelle, an das 3'-Ende eine HindIII-Schnittstelle angefügt waren, um das Produkt gerichtet in den pet21a-Vektor- zu klonieren (siehe 3.2.1 und 3.2.3). Die Sequenz wurde zunächst in den pDrive-Klonierungsvektor der Firma Qiagen integriert (siehe 3.2.1) und dort vollständig sequenziert (siehe 4.2.9). Nachdem Mutationen innerhalb der Sequenz ausgeschlossen werden konnten, wurde die Sequenz von EYFP- $\alpha$ -Tubulin über die NdeI- und HindIII- Schnittstellen in den bakteriellen Expressionsvektor pET21a der Firma Novagen inkloniert (siehe 3.2.1) und in Bakterien transformiert (siehe 4.2.11).

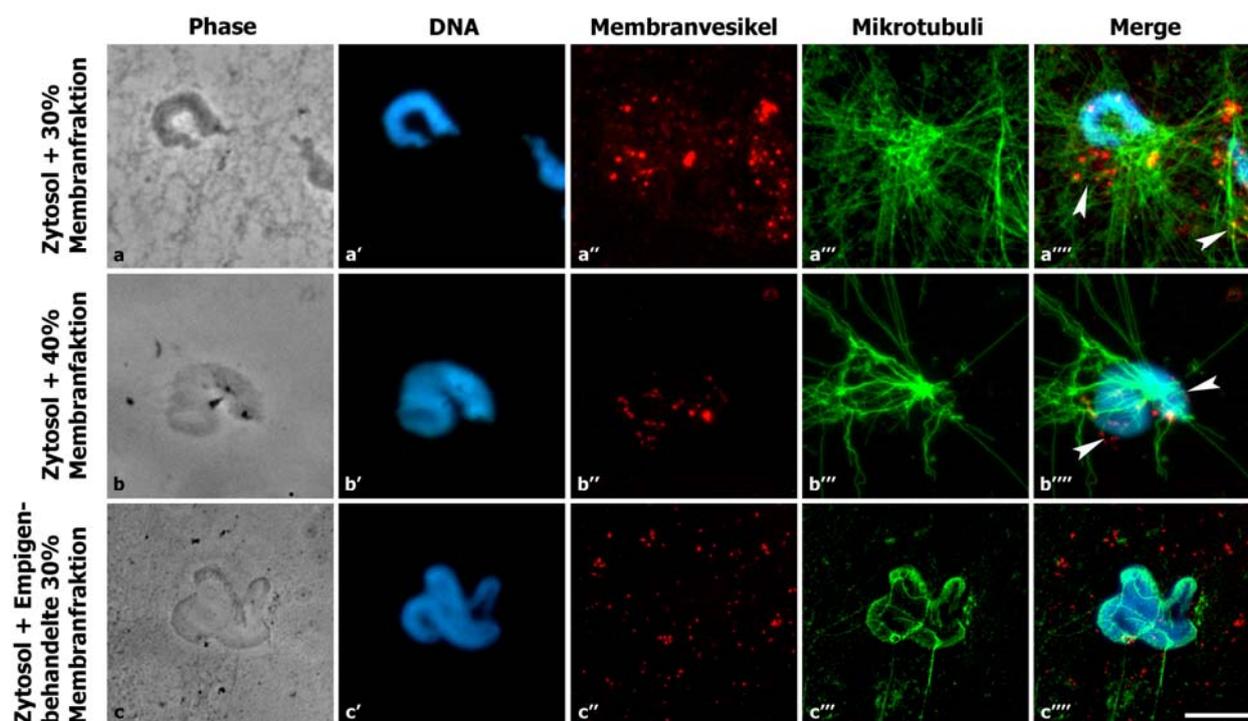
### **5.20 Expression und Aufreinigung von His-EYFP- $\alpha$ -Tubulin**

Die Expression des klonierten Fusionsproteins in *E. coli* Rosetta Zellen wurde durch die Zugabe von IPTG induziert. Nach 3,5 h wurde die Expression durch Sedimentieren der Bakterienzellen gestoppt und die Zellen durch Aufnahme in Harnstoff-haltigen Puffer lysiert. Durch eine Sonifikation wurden zudem die inclusion bodies der Bakterienzellen aufgebrochen (siehe 4.3.8.1-2). Das Fusionsprotein konnte anschließend über die angehängten Histidinreste mit Hilfe einer Nickel-NTA-Agarose-Säule unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt werden (siehe 4.3.8.3). Die Elution des aufgereinigten Proteins erfolgte bei einem pH-Wert von 5,9 – 4,5. Das Protein wurde fraktioniert zu je 1 mL eluiert und anschließend schrittweise gegen PBS dialysiert, um die Renaturierung des Proteins in die native Form zu gewährleisten. Nach der Dialyse wurde das Protein aufkonzentriert. EYFP- $\alpha$ -Tubulin sollte nun bei der Analyse der Kinetik der Kernhüllenbildung eingesetzt werden, um das entstehende Mikrotubulinetzwerk ohne Fixierung

fluoreszenzmikroskopisch zu visualisieren. Durch die Markierung der isolierten 40% und 30% Membranfraktionen mit Membranfarbstoffen sollte nun die Interaktion der Membranfraktionen mit dem Mikrotubulinetzwerk bei der Kernhüllenbildung gleichzeitig untersucht werden. Die Analyse des synthetisierten Fusionsproteins zeigte jedoch, dass sich das Protein nicht korrekt rückfaltete und somit durch die fehlenden fluoreszierenden Eigenschaften von EYFP auch nicht mit dem Mikroskop detektiert werden konnte. Aus diesem Grund wurde das Verhalten der isolierten Membranfraktionen in Bezug auf Mikrotubuli nur durch Fixierung der Präparate und Antikörpermarkierung nach definierten Zeitpunkten untersucht.

### 5.21 Die 30% Membranfraktion ist mit Mikrotubuli assoziiert

Um die Abhängigkeit der 40% und 30% Membranfraktionen von Mikrotubuli zu untersuchen, wurden beide Fraktionen mit dem Membranfarbstoff Dil<sub>C18</sub> gefärbt (siehe 4.5.8) und im zellfreien System mit Mikrotubuli inkubiert. Die Mikrotubulipolymerisation wurde zuvor durch die Zugabe von membranfreiem Zytosol zu Spermienchromatin ausgelöst (siehe 4.5.17). 15 min. nach der Induktion der Mikrotubulipolymerisation erfolgte die Zugabe der gefärbten Membranvesikel in je einen Ansatz (siehe 4.5.17). Die Vesikel der MVP-assoziierten 30% Membranfraktion interagieren mit



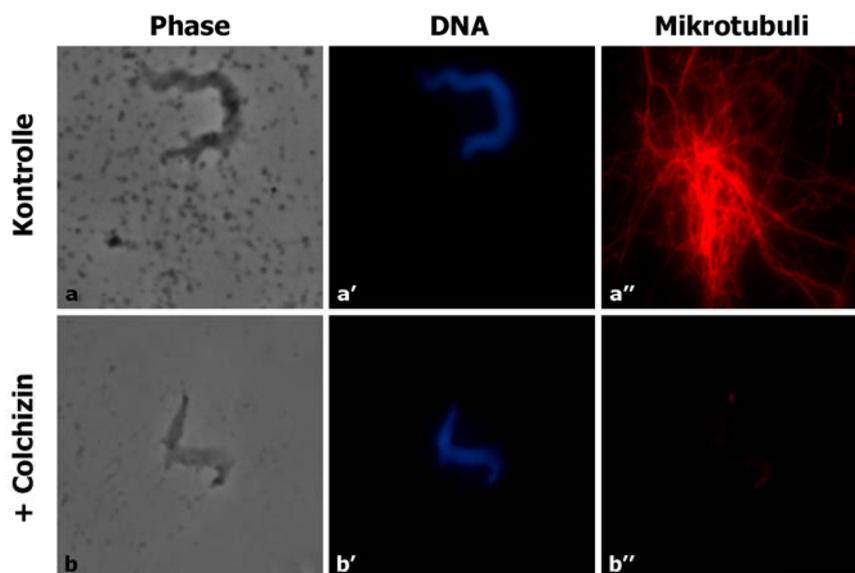
**Abb. 5.25:** Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Interaktion der 40% und 30% Membranfraktionen mit Mikrotubuli. Die Bildung eines Mikrotubulinetzwerkes wurde durch die Zugabe von Spermienchromatin zu membranfreiem Zytosol induziert. Nach einer 15 min. Inkubation erfolgte die Zugabe der einzelnen Membranfraktionen, die zuvor mit dem Membranfarbstoff Dilc18 gefärbt wurden. Die Mikrotubuli wurden

anschließend durch Immunfluoreszenz mit  $\beta$ -Tubulin-Antikörper und Texas-Red-gekoppeltem  $\alpha$ -Maus-Antikörper markiert. Die MVP-assoziierte 30% Membranfraktion ist mit dem Mikrotubulinetzwerk assoziiert, zahlreiche Membranvesikel co-lokalisieren mit einzelnen Mikrotubulifasern ( $a'' - a'''$ , siehe weiße Pfeile). Im Gegensatz dazu findet keine Interaktion der 40% Membranfraktion mit Mikrotubuli statt. Die Vesikel binden dagegen direkt an das Chromatin ( $b'' - b'''$ , siehe weiße Pfeile). Nach Empigen- und Salzbehandlung binden die 30% Membranvesikel nicht mehr an Mikrotubuli und bleiben diffus um das Chromatin verteilt ( $c'' - c'''$ ). Die korrespondierenden Phasenkontrastaufnahmen ( $a - c$ ) sowie die Färbung der DNA mit Hoechst ( $a' - c'$ ) sind ebenfalls dargestellt. Der Eichstrich entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

dem ausgebildeten Mikrotubulinetzwerk und co-lokalisieren mit einzelnen Fasern (Abb. 5.25,  $b'' - b'''$ , siehe Pfeile). Werden die membranassoziierten Proteine, inklusive MVP, mit Empigen und Salz von der Membranfraktion extrahiert (siehe 4.5.7), dann verliert die 30% Membranfraktion die Fähigkeit an die Mikrotubuli zu binden und verbleibt diffus um das Chromatin verteilt (Abb. 5.25,  $c' - c'''$ ). Somit sind membranassoziierte Proteine für die Bindung der 30% Membranfraktion an MT essentiell. Im Gegensatz dazu konnte keine Interaktionen nach der Inkubation der 40% Membranfraktion mit dem Mikrotubulinetzwerk nachgewiesen werden. Die Membranvesikel binden dagegen direkt an Spermienchromatin (Abb. 5.25,  $b' - b'''$ , siehe Pfeile). Wird die Inkubationszeit der 40% Membranvesikel erhöht, so bildet sich eine Doppelmembran um das Chromatin (vgl. 5.3).

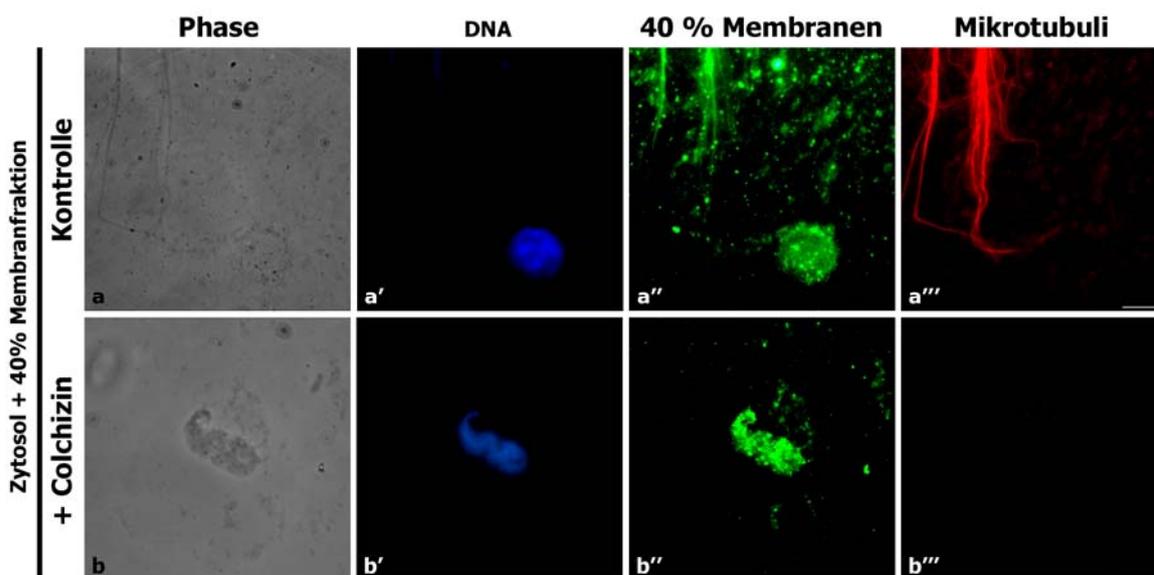
### **5.22 Die Doppelmembranbildung der 40% Membranfraktion ist Mikrotubuli-unabhängig**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die 40% Membranvesikel im zellfreien System nicht mit Mikrotubuli co-lokalisieren, sollte nachgewiesen werden, dass die Fähigkeit der 40% Membranfraktion, eine kontinuierliche Kernmembran zu bilden, durch die Inhibierung der Mikrotubulipolymerisation nicht beeinflusst wird. Durch Colchizin, ein natürliches Toxin aus der Pflanze Herbstzeitlose, wird die Polymerisation von Mikrotubuli durch die Bindung des Toxins an Mikrotubuliuntereinheiten verhindert. Um zuerst zu belegen, dass Colchizin auch im zellfreien System die Mikrotubulipolymerisation inhibieren kann, wurde die Wirkung anhand einer indirekten Immunfluoreszenz überprüft (siehe 4.5.16). Durch die Inkubation von *Xenopus* Eiextrakt mit 0,08  $\mu\text{M}$  Colchizin konnte die Bildung von Mikrotubulifilamenten komplett unterdrückt werden (Abb. 5.26,  $b''$ ). Um zu zeigen, dass die 40% Membranfraktion trotz der Inhibition der Mikrotubulipolymerisation eine Doppelmembran bilden kann, wurden die Membranvesikel zur Detektion mit dem Membranfarbstoff DiO<sub>C18</sub> gefärbt (siehe 4.5.8) und anschließend zusammen mit Colchizin-behandeltem Zytosol und Spermienchromatin inkubiert (siehe 4.5.16).



**Abb. 5.26:** Der Inhibitor Colchizin verhindert im zellfreien System erfolgreich die Polymerisation von Mikrotubuli. Der Kontrollansatz zeigt die normale Bildung eines Mikrotubulinetzwerkes durch die Zugabe von *Xenopus* Eiextrakt zu Spermienchromatin nach einer 30 min Inkubationsdauer (a''). Wird der Extrakt zuvor mit Colchizin inkubiert, so unterbleibt die Polymerisation von Mikrotubulifilamenten (b''). Beide Ansätze wurden für die indirekte Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen  $\beta$ -Tubulin inkubiert. Die korrespondierenden Phasenkontrastaufnahmen (a und b) sowie die Färbung der DNA mit Hoechst (a' und b') sind ebenfalls dargestellt. Der Eichstrich entspricht 10  $\mu$ m.

In der Fluoreszenzaufnahme ist zu erkennen, dass die 40% Membranvesikel trotz des Fehlens eines Mikrotubulinetzwerkes (Abb. 5.27, b''') an Chromatin binden können (Abb. 5.27, b''). Dieses Ergebnis bekräftigt die Entstehung eines porenlosen Kernes durch die Inhibition der Mikrotubulipolymerisation (Ewald et al., 2001) und unterstützt den Befund, dass die 40% Membranvesikel nicht mit Mikrotubuli interagieren (siehe 5.21).

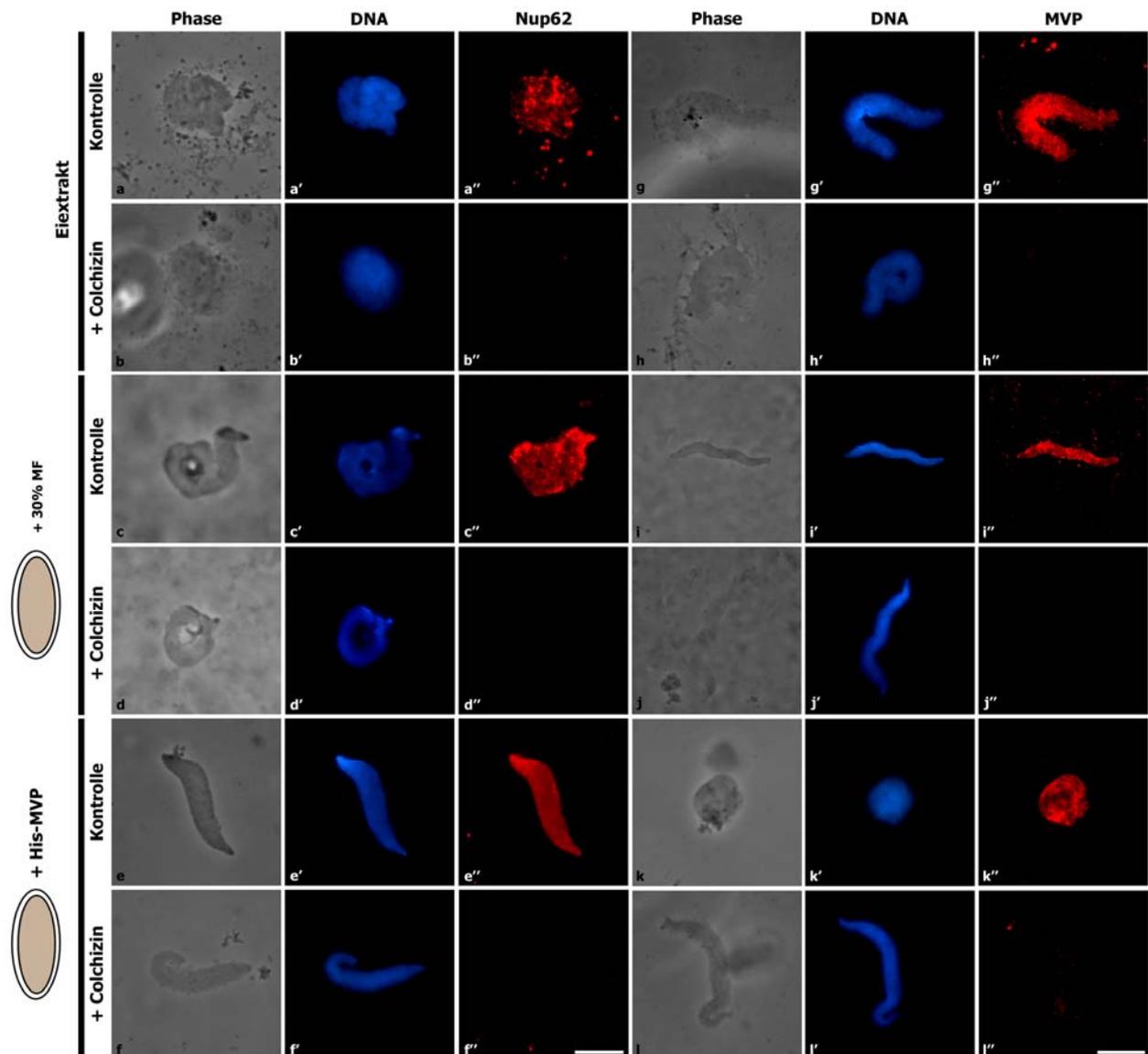


**Abb. 5.27:** Die Chromatinbindung der 40% Membranfraktion ist unabhängig von Mikrotubuli. Die Inkubation von Colchizin-behandeltem Zytosol verhindert nicht die Lokalisation der mit Dilc18 gefärbten 40% Membranvesikel an Chromatin (b''). In der indirekten Immunfluoreszenz sind keine polymerisierten Mikrotubuli durch den  $\beta$ -Tubulin-

Antikörper nachweisbar (b'''). Der Kontrollansatz, ohne die Zugabe von Colchizin, bestätigt die Ausbildung eines Mikrotubulinnetzwerkes (a'''). Auch hier binden die 40% Membranvesikel an Chromatin (a''). Die korrespondierenden Phasenkontrastaufnahmen (a und b) sowie die Färbung der DNA mit Hoechst (a' und b') sind ebenfalls dargestellt. Die Eichstriche entsprechen jeweils 10 µm.

### 5.23 Die MVP-vermittelte de novo Bildung von Kernporenkomplexen ist abhängig von Mikrotubuli

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die MVP-assoziierte 30% Membranfraktion mit dem Mikrotubulinnetzwerk interagiert (siehe 5.21). In mehreren Studien konnte zudem die Assoziation von Vault-Partikeln mit dem Mikrotubulinnetzwerk dargestellt werden (Herrmann et al., 1999; Slesina et al., 2006). Die Vault-Partikel interagieren dabei über ihre Kappenstruktur mit den Mikrotubulifilamenten (Eichenmuller et al., 2003).



**Abb. 5.28:** Die Inhibition der Mikrotubulipolymerisation durch Colchizin verhindert die Assoziation von MVP mit der Kernmembran und die Bildung von NPC's. In vitro Kerne wurden durch drei unterschiedliche Ansätze gebildet: Durch Zugabe von Chromatin zu *Xenopus* Eiextrakt (obere zwei Reihen) und durch die Zugabe der 30% Membranfraktion (mittlere zwei Reihen) bzw. His-MVP (untere zwei Reihen) zu porenlosen Kernen. Die Proben wurden für die indirekte Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen Nup62 und MVP inkubiert. In allen drei Ansätzen verhinderte die Inkubation der Extrakte mit 0,08  $\mu\text{M}$  Colchizin die Bildung von NPC's. Nup62 war in diesen Kernen nicht nachweisbar (b'', d'' und f''). Ebenso ließ sich MVP an der Kernhülle nicht detektieren (h'', j'' und l''). Im Gegensatz dazu erfolgte in den unbehandelten Extrakten der MVP-vermittelte Einbau von NPC's und Nup62 lokalisierte an der Kernhülle (a'', c'' und e''). MVP co-lokalisierte dabei mit den neu gebildeten NPC's (g'', i'' und k''). Die korrespondierenden Phasenkontrastaufnahmen (a – l) sowie die Färbung der DNA mit Hoechst (a' – l') sind ebenfalls dargestellt. Die Eichstriche entsprechen 10  $\mu\text{M}$ .

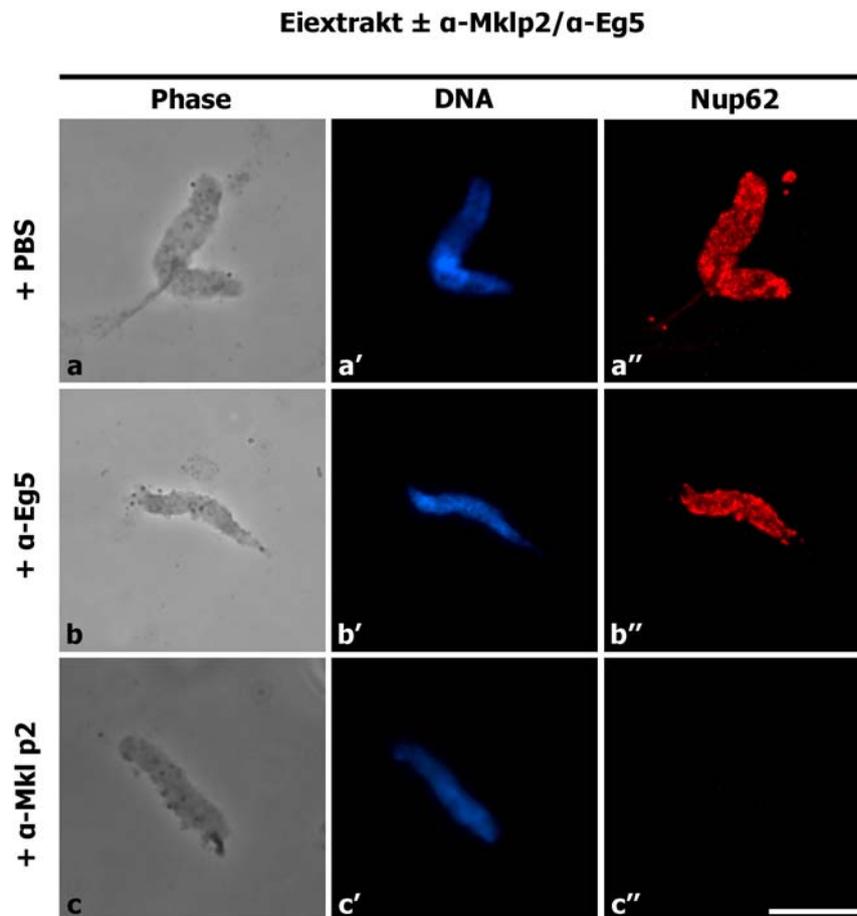
In dieser Arbeit sollte nun durch die Inhibition der Mikrotubulipolymerisation mit Colchizin die Auswirkungen auf die Lokalisation von MVP und dessen Funktion bei der NPC-Insertion in die bestehende Kernhülle untersucht werden.

Zunächst wurde der Einfluss des Mikrotubulinnetzwerkes anhand normaler in vitro Kerne analysiert, welche aus *Xenopus* Eiextrakt und Spermienchromatin gebildet wurden (siehe 4.5.16). Durch die Inhibition der Mikrotubulipolymerisation bildeten sich erwartungsgemäß keine NPC's in den Kernen (Abb. 5.28, vgl. a'' mit b''). Darüber hinaus konnte im Vergleich zu unbehandelten Kontrollkernen kein MVP an der Kernhülle detektiert werden (Abb. 5.28 vgl. g'' mit h''). Im nächsten Schritt wurde die Poren-induzierende Funktion der MVP-assoziierten 30% Membranfraktion direkt untersucht, indem zuerst porenlose Kerne mit Hilfe der 40% Membranfraktion gebildet wurden, zu denen im Anschluss die 30% Membranen hinzugefügt wurden. Das Fehlen eines Mikrotubulinnetzwerkes, aufgrund des Einsatzes von Colchizin, verhindert auch in dieser Versuchsanordnung den Einbau von NPC's in die bestehende Doppelmembran (Abb. 5.28, vgl. d'' mit d''). Da in diesen Kernen ebenfalls kein MVP nachzuweisen ist, kann man darauf schließen, dass die mit der 30% Membranfraktion assoziierten Vaults nur über Mikrotubuli an die Kernhülle gelangen können (Abb. 5.28, vgl. i'' mit j''). Der direkte Nachweis einer Mikrotubuli-abhängigen Induktion der de novo NPC-Bildung durch MVP kann durch die Zugabe von His-MVP zu den zuvor gebildeten porenlosen Kernen (siehe 4.5.14.2) erbracht werden. In den Ansätzen ohne bestehendes Mikrotubulinnetzwerk konnte das rekombinante MVP ebenfalls nicht an die Kernhülle assoziieren (Abb. 5.28, vgl. k'' mit l'') und in der Folge wurden keine NPC's in diese Kerne inseriert (Abb. 5.28, vgl. e'' mit f''). MVP und Vaults werden somit über Mikrotubuli zur Kernhülle transportiert und induzieren dort den Einbau neuer NPC's. Ebenso widerspricht dieses Ergebnis einem früheren Befund, dass Vaults intrazellulär über Diffusionsprozesse an ihren Zielort gelangen (van Zon et al., 2003).

## **5.24 Das Motorprotein Mklp2 ist an der de novo Bildung von Kernporenkomplexen beteiligt**

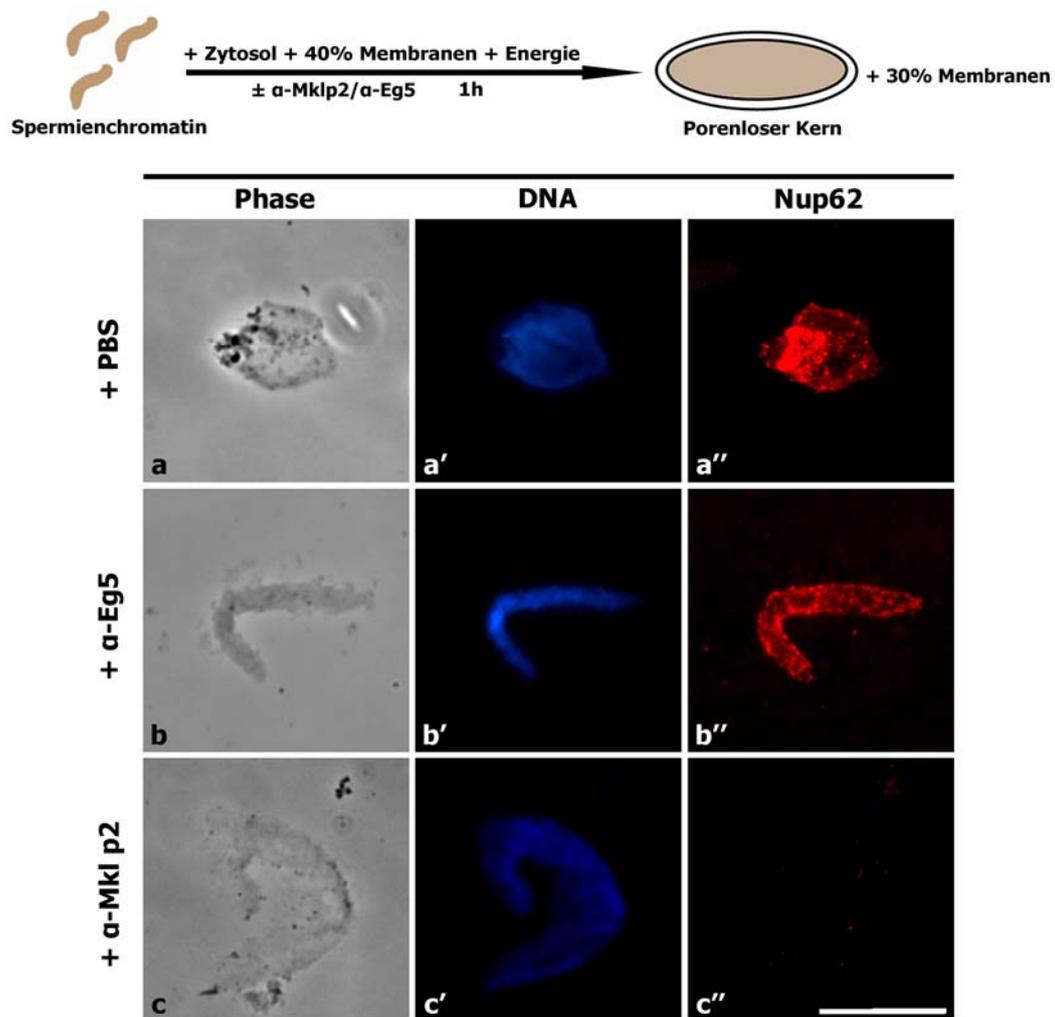
Nach dem Nachweis der Mikrotubuli-abhängigen Induktion der NPC-Insertion durch MVP sollte der dafür notwendige intrazelluläre Transport näher untersucht werden. Da die im zellfreien System gebildeten Mikrotubuli mit ihren Plus-Enden am Chromatin verankert sind, wurde das Augenmerk auf Kinesine gelegt, Motorproteine, die den Transport entlang der Plus-Enden vermitteln. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass sich durch die Inhibierung von Kinesinen durch AS-2 keine NPC's im zellfreien System bilden können (Ewald et al., 2001). Um die Beteiligung der Kinesine näher zu charakterisieren, wurden in dieser Arbeit Antikörper gegen das Kinesin-5 (Eg5) und das Kinesin-verwandte Protein Mklp2 (mitotic kinesin-like protein 2, früher auch rabkinesin-6) verwendet. Eg5 ist ein hoch konserviertes Motorprotein, welches eine wichtige Rolle beim Aufbau des bipolaren Spindelapparates spielt (Kashina et al., 1996; Kapitein et al., 2005). Eg5 bildet dabei ein Homotetramer mit zwei beidseitig liegenden Motordomänen und ist somit dazu fähig, an zwei Mikrotubuli gleichzeitig entlang zu wandern. Bei antiparallel verlaufenden Mikrotubulifilamenten verursacht Eg5 durch die beidseitige Wanderung ein Auseinanderschere der Filamente und ist deshalb maßgeblich an der Teilung der Centrosomen während des Aufbaus der mitotischen Spindel beteiligt (Sawin et al., 1992; Blangy et al., 1995). Mklp2 ist ein Mitglied der Kinesin-verwandten Proteinfamilie (Kinesin-like Proteins) und gehört zur Untergruppe der mitotischen Kinesine. Diese Kinesinfamilie ist am Transport von zellulären Organellen, wie den Chromosomen, Transkriptionskomplexen oder dem Golgiapparat in die Tochterzellen beteiligt. Zudem spielen sie eine wichtige Rolle bei der Positionierung der genannten Organellen während der Mitose (Vernos und Karsenti, 1996; Gruneberg et al., 2004). Mklp2 lokalisiert während der Anaphase am Spindelapparat. Durch die Inhibition des Kinesins wurde zudem seine essentielle Rolle für die Zytokinese gezeigt (Hill et al., 2000; Fontijn et al., 2001; Neef et al., 2006). Die Funktion von Mklp2 während der Mitose wird maßgeblich durch die Kinase plk-1 reguliert (Neef et al., 2003).

Um den Einfluss der genannten Kinesine auf die NPC-Bildung im zellfreien System zu untersuchen, wurden Antikörper beider Kinesine verwendet. Zunächst wurde der Effekt der Mklp2- und Eg5-Antikörper bei in vitro Kernen in *Xenopus* Eiextrakt untersucht. Vor der Inkubation mit Chromatin erfolgte die Inhibierung der Kinesine durch die Zugabe des entsprechenden Antikörpers (siehe 4.5.18). Mklp2 besitzt eine wichtige Rolle bei der Bildung der NPC's, da durch die Inhibition dieses Kinesins der NPC-Aufbau verhindert wird (Abb. 5.29, c'').



**Abb. 5.29:** Die Inhibition von Mklp2 verhindert den Aufbau von NPC's. Der Einfluss von Kinesinen wurde durch die Verwendung von Mklp2- und Eg5-Antikörpern im zellfreien System untersucht. *Xenopus* Eiextrakt wurde mit dem jeweiligen Antikörper inkubiert und die in den jeweiligen Extrakten gebildeten Kerne für eine indirekte Immunfluoreszenz gegen Nup62 verwendet. In Mklp2-inhibierten Extrakten können nach der Rekonstitution von in vitro Kernen keine NPC's nachgewiesen werden (c''). Im Gegensatz dazu kann die Inhibition von Eg5 die Assemblierung von NPC's nicht verhindern (b''), ebenso wie in unbehandeltem Kontrolleextrakt (a''). Die korrespondierenden Phasenkontrastaufnahmen (a – c) sowie die Färbung der DNA mit Hoechst (a' – c') sind ebenfalls dargestellt. Der Eichstrich entspricht 10  $\mu$ m.

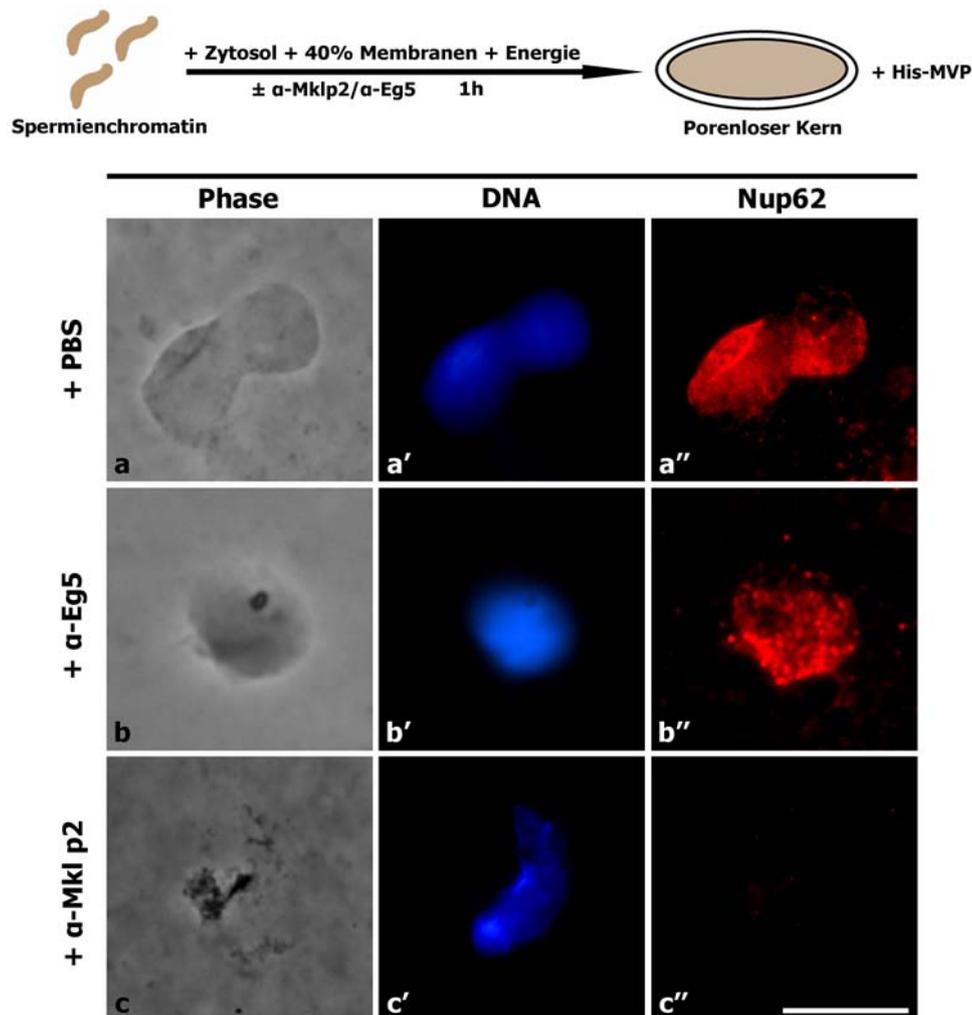
Im Gegensatz dazu wurden trotz der Inhibition von Eg5 NPC's in die Kernhülle integriert und Nup62 konnte in den Kernen nachgewiesen werden (Abb. 5.29, b''). In weiteren Versuchen wurde analysiert, auf welcher Ebene der NPC-Bildung im zellfreien System Mklp2 eine Rolle spielt. Da in den vorangegangenen Versuchen gezeigt werden konnte, dass die MVP-assoziierte 30% Membranfraktion in Abhängigkeit eines Mikrotubulinetzwerkes zur Kernhülle transportiert wird (siehe Abb. 5.28), wurde der Kinesin-abhängige Transport der Membranen untersucht. Mit Hilfe der 40% Membranfraktion und Zytosol wurden porenlose Kerne gebildet. Das Zytosol war für die Kinesininhibition zuvor mit je einem der beiden zur Verfügung stehenden Antikörper inkubiert worden (siehe 4.5.18).



**Abb. 5.30:** Die Inhibition von Mklp2 verhindert die Porenbildung durch die 30% Membranfraktion. Das für die Bildung der porenlosen Kerne verwendete Zytosol war zuvor mit Antikörpern gegen Mklp2, bzw. Eg5 inkubiert worden. Nach der Bildung der porenlosen Kerne in den jeweiligen Extrakten wurde die 30% Membranfraktion hinzugefügt. Die Inhibition von Mklp2 verhindert die Induktion der NPC-Insertion durch die 30% Membranfraktion (c''). Im Gegensatz dazu werden in den Eg5-inhibierten Extrakten und im unbehandelten Kontrollansatz NPC's in die Kernhülle inseriert (a'' und b''). Die korrespondierenden Phasenkontrastaufnahmen (a – c) sowie die Färbung der DNA mit Hoechst (a' – c') sind ebenfalls dargestellt. Der Eichstrich entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

Die Inhibition von Mklp2 verhindert die Induktion der NPC-Insertion durch die 30% Membranfraktion (Abb. 5.30, c''). Die Inhibition von Eg5 hat keine Auswirkung auf die NPC-Bildung (Abb. 5.30, b''). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die 30% Membranfraktion durch Mklp2 entlang der Plus-Enden der Mikrotubuli zur Kernhülle gelangt. Die poreninduzierende Funktion der 30% Membranfraktion beruht auf dessen Assoziation mit MVP. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob Mklp2 nur am Transport der MVP-assoziierten Membranen oder auch am direkten Transport von MVP zur Kernmembran beteiligt ist. Hierfür wurde ein vereinfachtes zellfreies System verwendet, gebildet durch die Zugabe von rekombinantem MVP zu porenlosen Kernen. Die porenlosen Kerne wurden wie zuvor durch die

40% Membranfraktion gebildet. Das Zytosol wurde vor der Rekonstitution der Kerne mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. Die Inhibition von Mklp2 blockierte den Transport von His-MVP zur Kernmembran und ein Einbau von NPC's blieb aus (Abb. 5.31, c''). Wie bei den Versuchsansätzen zuvor wurde die NPC-Bildung durch die Inhibition von Eg5 nicht beeinflusst, Nup62 war in der Kernhülle detektierbar (Abb. 5.31, b'').

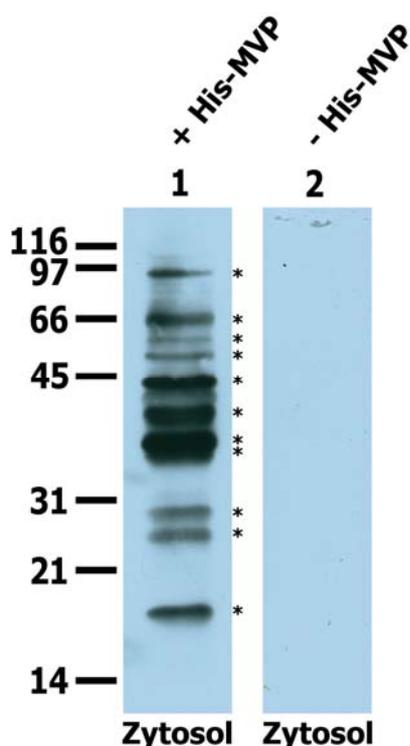


**Abb. 5.31:** Die Inhibition von Mklp2 verhindert die MVP-induzierte de novo Bildung von NPC's. Zu porenlosen Kernen wurde His-MVP hinzugefügt. Das Zytosol wurde zuvor mit Antikörpern gegen Mklp2 bzw. Eg5 inkubiert. In den Mklp2-inhibierten Extrakten konnten die NPC-Insertion durch His-MVP nicht vollzogen werden, Nup62 ist in den Kernen nicht nachweisbar (c''). Die Inhibition von Eg5 verhindert die Poren-indzierende Funktion von His-MVP nicht (b''). In den Kontrollkernen, gebildet in unbehandeltem Extrakt, konnte Nup62 ebenfalls nachgewiesen werden (a''). Die korrespondierenden Phasenkontrastaufnahmen (a – c) sowie die Färbung der DNA mit Hoechst (a' – c') sind ebenfalls dargestellt. Der Eichstrich entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

Der gerichtete Transport von MVP wird im zellfreien System somit durch das Motorprotein Mklp2 vermittelt. Da MVP durch die Inhibition von Mklp2 nicht an die Kernmembran gelangt, kann in der Folge die MVP-vermittelte Bildung von NPC's nicht stattfinden.

## 5.25 MVP interagiert mit zahlreichen zytosolischen Proteinen

In der Arbeit wurde gezeigt, dass zur de novo Bildung von NPC's in eine bestehende Doppelmembran MVP und zytosolische Faktoren ausreichend sind. Es ist bekannt, dass sich die zum Aufbau der NPC's notwendigen Nukleoporine im Zytosol befinden. Es stellt sich nun die Frage, ob MVP bei der Bildung der NPC's direkt an der Kernmembran bindet oder ob MVP mit Nukleoporinen interagiert. Um potentielle Bindungspartner von MVP im Zytosol zu identifizieren, die am eventuellen Aufbau von NPC's beteiligt sind, wurde ein Overlay-Blot-Assay mit rekombinantem MVP durchgeführt. Die im Zytosol gelösten Faktoren wurden über eine SDS-Page aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran in einem Renaturierungspuffer partiell zurückgefaltet (siehe 4.3.7). Durch diese Renaturierung sollten Bindungsstellen und Interaktionsbereiche der zytosolischen Proteine für MVP zugänglich gemacht werden. Die Inkubation der Nitrozellulose mit His-MVP ermöglicht die Bindung des rekombinanten Proteins an seine Bindungspartner. Finden Interaktionen von His-MVP mit zytosolischen Proteinen statt, so können diese durch eine anschließende Immunreaktion mit einem Histidin- oder MVP-Antikörper nachgewiesen werden. Da MVP in dem verwendeten Zytosol nicht enthalten ist (siehe 4.5.2), konnte der Nachweis potentieller Bindungspartner über den MVP-Antikörper erbracht werden. Im Overlay-Blot wurden eine Vielzahl von zytosolischen Bindungspartnern durch den MVP-Antikörper nachgewiesen (Abb. 5.32, A, Spur 1, siehe \*).



**Abb. 5.32:** Interaktion von MVP mit zytosolischen Proteinen im Overlay Blot Assay. Zytosolische Polypeptide wurden über 15% SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose transferiert. Die Polypeptide wurden mit 2,5 µg His-MVP (Spur 1) und ohne His-MVP (Spur 2) inkubiert. Die Antikörperinkubation der Nitrozellulose mit  $\alpha$ -MVP

zeigt, dass MVP an mehrere zytosolische Polypeptide bindet (Spur 1, siehe \*), während in Abwesenheit von His-MVP keine Bindungspartner nachgewiesen werden können (Spur 2). Die Referenzproteine sind in kDa angegeben.

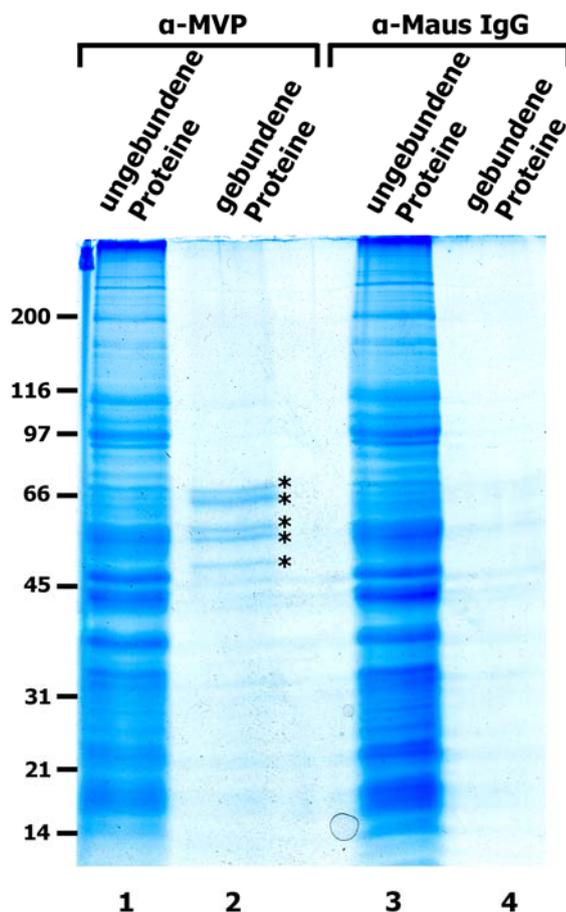
Über die im Gel zurückgelegte Wegstrecke der Polypeptide im Bezug auf die verwendeten Referenzproteine konnten die Molekularmassen der 11 detektierten Proteinbanden errechnet werden (Tab. 5.1).

<b>Proteinbande im Overlay-Blot</b>	<b>Molekularmasse in Da</b>
1	<b>92.909</b>
2	<b>67.394</b>
3	<b>59.044</b>
4	<b>50.762</b>
5	<b>42.017</b>
6	<b>41.619</b>
7	<b>37.456</b>
8	<b>34.795</b>
9	<b>27.893</b>
10	<b>25.526</b>
11	<b>18.689</b>

**Tab. 5.1:** Errechnete Molekularmassen der im Overlay-Blot-Assay detektierten Proteinbanden. Über die Geradengleichung der logarithmischen Molekularmassen der Referenzproteine und der zurückgelegten Wegstrecken im Gel konnten die relativen Molekularmassen der 11 detektierten Proteine errechnet werden.

Nach dem Nachweis mehrerer zytosolischer Interaktionspartner von MVP durch einen Overlay-Blot-Assay und aufgrund der Tatsache, dass die Proteine innerhalb eines Overlay-Blot-Assays denaturiert sind, sollten die möglichen Interaktionen ebenfalls im nicht denaturierten Zustand der Proteine ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurde eine Immunpräzipitation von MVP in *Xenopus* Eiextrakt durchgeführt (siehe 4.3.12). Durch den an eine Protein G Sepharose immobilisierten MVP-Antikörper kann das im Eiextrakt enthaltene MVP zusammen mit gebundenen Proteinen analysiert werden. Die Bindungspartner von MVP können anschließend in einer SDS-PAGE untersucht werden. Das mit Coomassie gefärbte Gel zeigt, dass 5 klar unterscheidbare Polypeptide durch den MVP-Antikörper aus *Xenopus* Eiextrakt präzipitiert wurden (Abb. 5.33, Spur 2, siehe \*). Über die parallel aufgetragenen Referenzproteine konnten die Molekularmassen der unbekannt Proteine errechnet werden (Tab. 5.2). Mit etwa 68, 58

und 55 kDa haben 3 der Polypeptide eine ähnliche Molekularmasse wie die durch den Overlay-Blot-Assay identifizierten MVP-Bindungspartner und könnten die selben Proteine darstellen.



**Abb. 5.33:** Interaktion von MVP mit Proteinen aus *Xenopus* Eiextrakt, gezeigt in der Immunpräzipitation. Monoklonaler MVP-Antikörper, bzw. unspezifischer  $\alpha$ -Maus-IgG wurde an Protein G Sepharose immobilisiert und anschließend mit verdünntem Eiextrakt (1:2 in PBS) inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. 5 unterschiedliche Proteinbanden wurden detektiert (Spur 2, siehe \*). Im Gegensatz dazu präzipitierten bei der Verwendung von unspezifischem  $\alpha$ -Maus-IgG keine Proteine aus dem Eiextrakt (Spur 4). Die korrespondierenden ungebundenen Proteine des Eiextrakts sind parallel aufgetragen worden (Spuren 1 und 3). Die Referenzproteine sind in kDa angegeben.

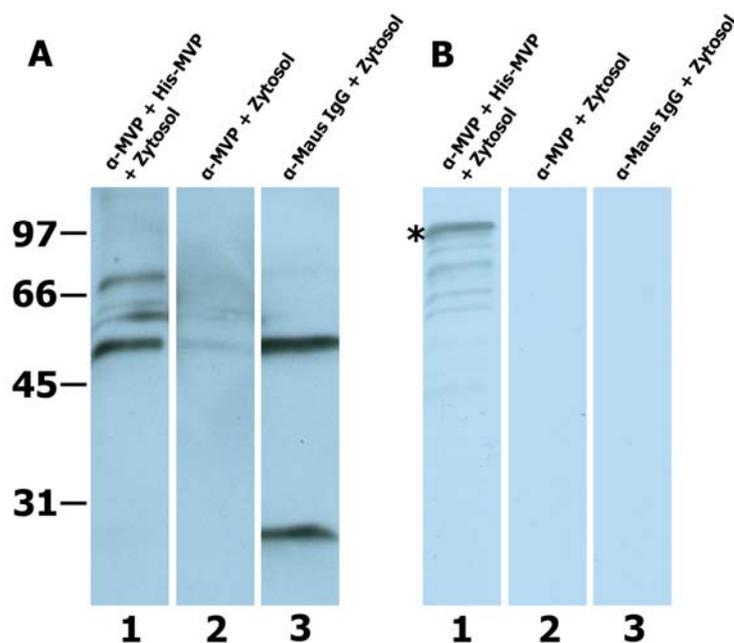
Proteinbande der Immunpräzipitation	Molekularmasse in Da
1	<b>71.428</b>
2	<b>67.978</b>
3	<b>58.127</b>
4	<b>54.855</b>
5	<b>47.686</b>

**Tab. 5.2:** Errechnete Molekularmassen der bei der Immunpräzipitation detektierten Proteinbanden. Über die Geradengleichung der logarithmischen Molekularmassen der Referenzproteine und der zurückgelegten Wegstrecken im Gel konnten die relativen Molekularmassen der 5 detektierten Proteine errechnet werden.

## **5.26 MVP interagiert nicht mit Nukleoporinen mit FXFG-Sequenzmotiv-Wiederholungen**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass MVP mit zytosolischen Proteinen interagieren kann, sollte überprüft werden, ob unter den detektierten MVP-Bindungspartnern Nukleoporine enthalten sind. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass MVP an der Kernhülle in der Nähe von NPC's lokalisiert (Chugani et al., 1993; Dickenson et al., 2007). Um eine direkte Interaktion von MVP mit Nukleoporinen bei der Bildung der NPC's zu untersuchen, wurden die durch die Immunpräzipitation (siehe Abb. 5.33) erhaltenen MVP-Bindungspartner durch einen Immunblot mit dem monoklonalen Antikörper 414 (mab414) analysiert. Durch mab414 werden Nukleoporine mit einer repetitiven FXFG-Domäne detektiert. Hierzu zählen Nup62, Nup153, Nup214 und Nup358 (Davis und Blobel, 1987). In den durch die Immunpräzipitation an MVP gebundenen Proteinen konnten keine Nukleoporine identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

Da durch die Immunpräzipitation möglicherweise zu geringe Proteinmengen im Gel aufgetragen waren, um im Immunblot mit mab414 detektiert zu werden, wurden im nächsten Schritt Pull-Down-Experimente durchgeführt, wobei die Proteine ebenfalls im nicht denaturierten Zustand analysiert werden können. Zunächst wurde rekombinantes His-MVP über seine Histidinreste an eine Matrix aus Nickel-Agarose gebunden und anschließend mit Zytosol inkubiert, in welchem sich unter anderem die löslichen Nukleoporine befinden (siehe 4.3.13.1). Über MVP sollten mögliche Bindungspartner aus dem Extrakt gezogen werden. Die gebundenen Proteine können anschließend über einen Immunblot mit spezifischen Antikörpern gegen bestimmte Nukleoporine analysiert werden. Die Pull-Down-Experimente mit einer Matrix aus Nickel-Agarose zeigten sich jedoch zu unspezifisch, da bei den Negativkontrollen, durch die Inkubation von Zytosol mit einer Nickel-Agarose-Matrix in Abwesenheit von His-MVP, zu viele Bindungen ein klares Ergebnis verfälschten (Daten nicht gezeigt). Um unspezifische Bindungen von zytosolischen Proteinen an die Matrix zu minimieren, wurde Protein G Sepharose als Matrix gewählt (siehe 4.3.13.2). An die Sepharose wurde zunächst der monoklonale MVP-Antikörper gebunden. Parallel hierzu wurde eine Kontrollsäule mit unspezifischem  $\alpha$ -Maus-IgG angefertigt. Anschließend wurden die an die Säulen gebundenen Antikörper in An- bzw. Abwesenheit von His-MVP inkubiert. Die Inkubation des gebundenen His-MVP mit Zytosol ermöglicht die Interaktion von Bindungspartnern. Alle gebundenen Proteine wurden nach der Elution von der Matrix in einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend durch Immunblot mit mab414 verwendet. Durch mab414 kann keine der oben beschriebenen Nukleoporine in dem Immunblot nachgewiesen werden (Abb. 5.34, A, Spur 1).



**Abb. 5.34:** MVP interagiert nicht mit FXFG-Domänen tragenden Nukleoporinen. Die Bindung von FG-Nukleoporinen wurde durch einen Pull-Down untersucht. His-MVP wurde über einen monoklonalen MVP-Antikörper an eine Protein G Sepharose immobilisiert und anschließend mit Zytosol inkubiert. Die an MVP gebundenen Proteine wurden per SDS-PAGE aufgetrennt. A: Der Immunblot mit dem monoklonalen Antikörper 414 (mab414) zeigt, dass MVP an mehrere zytosolische Proteine bindet (Spur 1). Die FXFG-Nukleoporine Nup62, Nup153, Nup214 und Nup358 können durch den Pull-Down nicht nachgewiesen werden (Spur 1). Zur Bindungskontrolle wurde der Pull Down in Abwesenheit von His-MVP und mit unspezifischem  $\alpha$ -Maus-IgG durchgeführt (Spuren 2 und 3). Hierbei konnte keine Bindung von MVP mit zytosolischen Proteinen nachgewiesen werden. B: Der Immunblot wurde nach dem Entfernen aller Antikörper mit monoklonalem Antikörper gegen MVP inkubiert und zeigt, dass His-MVP erfolgreich an der Säule gebunden hatte (siehe \* in Spur 1). In beiden Kontrollsäulen ist kein MVP nachweisbar (Spur 2 und 3). Die Referenzproteine sind in kDa angegeben.

Proteinbande des Pull-Down-Assays	Molekularmasse in Da
1	74.112
2	65.761
3	61.939
4	53.599

**Tab. 5.3:** Errechnete Molekularmassen der bei dem Pull-Down-Experiment detektierten Proteinbanden. Über die Geradengleichung der logarithmischen Molekularmassen der Referenzproteine und der zurückgelegten Wegstrecken im Gel konnten die relativen Molekularmassen der 4 detektierten Proteine errechnet werden.

Der Antikörper detektiert jedoch 5 Proteinbanden, deren Molekularmassen über eine Geradengleichung, erstellt über die verwendeten Referenzproteine, errechnet wurde (Tab. 5.3). Die Bande bei ca. 54 kDa entspricht der durch den sekundären  $\alpha$ -Maus-Antikörper detektierten leichten Kette des teilweise von der Säule eluierten MVP-Antikörpers. Somit verbleiben 4

unbekannte Proteine, die durch mab414 nachgewiesen wurden. Ob es sich bei den unbekannt Proteinen um Nukleoporine handelt, konnte nicht belegt werden. In Abwesenheit von His-MVP binden keine Proteine an die Protein G Sepharose (Abb. 5.34, A, Spur 2), ebenso wie durch Verwendung von unspezifischem  $\alpha$ -Maus-IgG (Abb. 5.34, A, Spur 3). Die Bindung von His-MVP an den MVP-Antikörper wurde nach dem Strip des Blots mit einem MVP-Antikörper belegt (Abb. 5.34, B, siehe \*). MVP interagiert somit nicht mit den Nukleoporinen 62, 153, 214 und 358.

## 6. Diskussion

Der korrekte Aufbau von Kernporenkomplexen ist ein essentieller Vorgang am Ende der Mitose und während der Interphase. Die de novo Bildung von NPC's beinhaltet die lokale Fusion von äußerer und innerer Kernhülle, die Stabilisierung der entstandenen Pore und die Zusammenlagerung von Nukleoporinen und Subkomplexen innerhalb des Membrankanals in einer spezifischen Reihenfolge (Macaulay und Forbes, 1996; Goldberg et al. 1997; Burke und Ellenberg, 2002; Suntharalingam und Wenthe, 2003; Hetzer et al., 2005; Alber et al., 2007). Trotz zahlreicher Studien sind die beteiligten Faktoren sowie die molekularen Mechanismen, die zum Aufbau der NPC's führen, jedoch noch weitestgehend unklar. Dies gilt insbesondere für die Einlagerung von NPC's während der Kernhüllenexpansion der Interphase.

Anhand von früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Bildung einer kontinuierlichen Doppelkernmembran von der Insertion von NPC's getrennt werden kann. Bei der Bildung von Annulate Lamellae, in der Abwesenheit von Chromatin, werden membranassoziierte Faktoren depletiert, die für die NPC-Bildung notwendig sind (Ewald et al., 1997). Die Zugabe von Chromatin zu diesem prä-inkubierten Extrakt löst die Bildung von porenlosen Kernen aus. Durch eine anschließende Zugabe von in *Xenopus* Eiextrakt enthaltenen Membranen konnte die Bildung von NPC's in porenlosen Kernen induziert werden (Ewald et al., 1997). Innerhalb des Extrakts liegen verschiedene Fraktionen von Membranvesikeln vor. Diese können unterschiedliche Funktionen während der Kernhüllenbildung im zellfreien System übernehmen und sind bei verschiedenen Prozessen beteiligt. Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Isolation von zwei unterschiedlichen Membranfraktionen aus *Xenopus* Eiextrakt, um deren Beteiligung bei der Kernmembran- und NPC-Bildung näher zu charakterisieren. Vergleiche der Proteinzusammensetzung beider Membranfraktionen offenbarte überraschenderweise das Major Vault Protein als Bestandteil einer der beiden Fraktionen (Vollmar et al., 2009). Über zwei Jahrzehnte nach der erstmaligen Beschreibung der Vault-Partikel (Kedersha und Rome, 1986) wurde in dieser Arbeit eine neue zelluläre Funktion von MVP bei der NPC-Bildung beschrieben. MVP ist Hauptkomponente der Vault-Komplexe, deren zelluläre Funktion bis heute nicht vollständig geklärt werden konnte. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der molekularen Mechanismen während der NPC-Bildung im zellfreien System, basierend auf *Xenopus laevis* im Bezug auf die Funktion des Major Vault Proteins.

## **6.1 Experimentelle Trennung der Ausbildung einer Kernmembran und der Insertion von Kernporenkomplexen**

Um die Vorgänge bei der Kernhüllenbildung im zellfreien System zu analysieren, wurde die Rolle der 40% und 30% Membranfraktionen separat und in Kombination analysiert. Die Untersuchung der beiden Membranfraktionen zeigte, dass die 40% Membranfraktion selbstständig an Chromatin bindet und dort zur Ausbildung einer porenlosen Doppelkernmembran führt (siehe 5.2 - 5.3). Jedoch fehlt dieser Fraktion die Fähigkeit zur Induktion der NPC-Insertion. Die 30% Membranfraktion kann in eine bestehende Doppelmembran integriert werden und breitet sich innerhalb weniger Minuten kontinuierlich auf die gesamte Kernhülle aus. Im Gegensatz zur 40% Membranfraktion kann die MVP-assoziierte 30% Membranfraktion die Insertion von NPC's in eine geschlossene Doppelmembran induzieren, ist jedoch nicht selbstständig in der Lage, an Chromatin zu binden, um dort eine Kernhülle zu bilden. Werden beide Membranfraktionen gleichzeitig in einen Ansatz gegeben, so beginnen die Membranvesikel sofort miteinander zu fusionieren und es bildet sich eine Kernhülle aus.

In einer vorangegangenen Arbeit wurden beide Membranfraktionen auf ihre Proteinzusammensetzung hin analysiert. Dabei wurden die Membranen speziell auf Proteine untersucht, welche eine wichtige Rolle bei der NPC-Bildung übernehmen, wie Transmembranproteine, Lamine und Chromatin-bindende Proteine. Es zeigte sich, dass die untersuchten integralen Membranproteine LBR, LAP2, die membranassoziierten Nukleoporine Pom121 und gp210, Lamin B, sowie Importin  $\alpha$  und  $\beta$  in jeweils beiden Membranfraktionen detektierbar sind. Diese Proteine sind deswegen für die Kernporenkomplexbildung nicht entscheidend. Im Gegensatz zur 30% Membranfraktion beinhaltet die 40% Membranfraktion jedoch die GTPase Ran (Dissertation Friederike Vollmar). RanGTP wird bei sowohl bei der Chromatinbindung von Membranen als auch bei den bei der Kernhüllenbildung stattfindenden Fusionsprozessen eine entscheidende Rolle zugeschrieben (Hetzer et al., 2001; Zhang et al., 2002). Über RanGTP könnte die Chromatinbindung und Membranfusion der 40% Membranvesikel bei der Bildung einer kontinuierlichen Kernmembran reguliert werden. Es lässt sich somit erklären, weshalb die 30% Membranfraktion isoliert nicht in der Lage ist, an Chromatin zu binden. Die Ergebnisse lassen ebenso darauf schließen, dass RanGTP nicht für die NPC-Bildung verantwortlich ist.

Auch in früheren Untersuchungen konnten verschiedene Membranfraktionen isoliert werden, die Unterschiede bei der Bindung an Chromatin, dem Fusionieren zu einer Doppelmembran und der Insertion von NPC's aufweisen (Vigers und Lohka, 1991; Sasagawa et al., 1999; Oke und Inoue, 2003).

Die von Vigers und Lohka isolierte Membranfraktion NEP-B ist in der Lage, an Chromatin zu binden, jedoch wird zum Aufbau einer Doppelmembran und zur Insertion von NPC's ebenfalls die Fraktion NEP-A benötigt (Vigers und Lohka, 1991; Salpingidou et al., 2008). Ebenso besitzen die von Oke isolierten leichten Vesikel (LV) die Fähigkeit, an Chromatin zu binden, eine Fusion zu einer Doppelmembran findet jedoch nur zusammen mit den schweren Vesikeln (HV) statt (Oke und Inoue, 2003). Die in einer Studie von Sasagawa verwendeten Membranfraktionen PV1 und PV2 sind den in dieser Arbeit verwendeten Membranfraktionen ähnlich. Die isolierte Fraktion PV1 bindet homolog zur 40% Membranfraktion an Chromatin und fusioniert dort zu einer porenlosen Doppelmembran. Die Fraktion PV2 vermag ebenfalls an Chromatin zu binden, jedoch fusioniert sie nicht an der Chromatinoberfläche und bildet auch keine Kernhülle aus. Wiederum sind nur beide Vesikelfraktionen kombiniert dazu befähigt, eine intakte Kernhülle zu bilden (Sasagawa et al., 1999). Die in dieser früheren Studie isolierten Membranfraktionen unterscheiden sich jedoch alle von denen, die in dieser Doktorarbeit verwendet wurden. Der Unterschied liegt dabei in der Herstellung der verschiedenen Membranfraktionen. In den drei beschriebenen Studien diente Eiextrakt der Interphase als Ausgangsmaterial für die Membranaufreinigung, während in dieser Arbeit mitotischer Eiextrakt verwendet wurde. Außerdem müssen bei allen diesen publizierten Studien stets alle Membranfraktionen gleichzeitig in einem Ansatz vorhanden sein, um die Ausbildung einer Kernmembran und NPC's zu gewährleisten.

Bislang haben die verschiedenen Arbeitsgruppen, die die Bildung der Kernmembran getrennt von der Insertion von NPC's analysieren wollten, einerseits chemische Inhibitoren verwendet, wie den Calcium-Chelator BAPTA (Macaulay und Forbes, 1996). Durch die Zugabe von BAPTA kann die Bildung von NPC's inhibiert werden, nicht jedoch die Membranfusion zu einer Doppelmembran. Ein zweiter Versuchsansatz war bislang die Depletion von Faktoren aus dem zellfreien System, die bei der Bildung der NPC's beteiligt sind, beispielsweise von RanGTP (D'Angelo et al., 2006). Alternativ wurden Faktoren im zellfreien System angereichert, die normalerweise an der Regulation der NPC-Bildung beteiligt sind, indem sie den Aufbau der NPC's unterdrücken, wie Importin  $\beta$  (Harel et al., 2003). Durch diese Versuche konnte ebenfalls die Membranfusion von der NPC-Insertion separiert werden. Im Gegensatz zu diesen Untersuchungen wurden die zur Kernmembran- und NPC-Bildung nötigen Membranfraktionen in dieser Arbeit jedoch ausschließlich durch Zentrifugationsschritte von einander getrennt, so dass kein weiteres Eingreifen im zellfreien System notwendig ist. Somit konnte in dieser Doktorarbeit die Ausbildung einer kontinuierlichen Doppelkernmembran von der Insertion von NPC's experimentell getrennt und zwei unterschiedlichen Membranfraktionen zugewiesen werden.

## **6.2 Der membranassoziierte Faktor der 30% Membranen, der zur Insertion von Kernporenkomplexen führt, ist MVP**

Vault wurde schon in früheren Arbeiten mit dem Kernporenkomplex in Verbindung gebracht, einerseits weil Vault-Partikel an der Kernhülle in der unmittelbaren Nähe von NPC's nachgewiesen wurden (Chugani et al., 1993; Dickenson et al., 2007), andererseits weil postuliert wurde, dass Vaults aufgrund ihrer hohlen tonnenförmigen Struktur an zytokleoplasmatischen Transportprozessen beteiligt sind (Rome et al., 1991; Kickhoefer et al., 1996; Suprenant, 2002; Steiner et al., 2006). In dieser Arbeit konnte nun erstmals eine direkte Funktion von MVP im Zusammenhang mit der NPC-Biogenese dargestellt werden.

Durch massenspektrometrische Analysen konnte spezifisch in der 30% Membranfraktion das Major Vault Protein nachgewiesen werden (Vollmar et al., 2009). Da das Protein jedoch im Zuge der in der Membranaufreinigung durchgeführten Gradientenzentrifugation zusammen mit den Membranvesikeln isoliert wird, musste zunächst belegt werden, dass MVP physikalisch mit der 30% Membranfraktion assoziiert ist. Durch eine Flotationszentrifugation und subzelluläre Fraktionierung konnte gezeigt werden, dass MVP nicht nur aufgrund seiner Dichte mit den 30% Membranvesikeln isoliert wird, sondern fest an der Membran gebunden ist (siehe 5.8 u. 5.9). Diese Ergebnisse passen zu früheren Studien, bei denen eine überwiegend zytoplasmatische Verteilung von MVP detektiert wurde (Kickhoefer et al., 1996; van Zon et al., 2003; Steiner et al., 2006). Innerhalb von Eiern und somatischen Zellen können Vault-Partikel mit verschiedenen Organellen assoziiert sein. Eine Co-Lokalisation von Vaults mit Lysosomen konnte bereits belegt werden (Schroeijers et al., 2002). Ebenso wurde die Assoziation von Vault mit Lipid Rafts gezeigt (Kowalski et al., 2007). Durch immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung von verschiedenen Geweben von *Xenopus laevis* konnte die zytoplasmatische Verteilung von MVP bestätigt werden. Zudem konnten wir die Lokalisation von MVP an der Kernhülle zeigen (siehe 5.16).

Nachdem belegt werden konnte, dass die 30% Membranen zur Insertion der NPC's in eine porenlose Doppelmembran führen, wurde anhand eines rekombinanten MVP-Fusionsproteins oder mit aufgereinigten Vault-Komplexen überprüft, ob diese Poren-induzierende Funktion tatsächlich auf MVP beruht. Hierfür wurde eine vereinfachte Variante des zellfreien Systems von *Xenopus* Eiextrakt gewählt. Diese Variante beruht auf der experimentellen Trennung von Doppelkernmembran- und NPC-Bildung. Zuerst wurde mit Hilfe von 40% Membranen und Zytosol eine kontinuierliche Doppelkernmembran um Spermienchromatin gebildet. Zu diesen porenlosen Kernen können nun anschließend Faktoren hinzugefügt werden, die auf ihre Funktion bei der de novo NPC-Bildung untersucht werden. In dieser Arbeit konnte durch dieses vereinfachte System erstmals die de novo Bildung von NPC's durch MVP und Vault-Partikel belegt werden (siehe 5.6). Die zur NPC-Bildung ausreichenden Komponenten sind somit MVP

bzw. Vault, Nukleoporine, die 40% Membranfraktion und Chromatin. Die Ergebnisse bestätigen zudem den Befund, dass zur Ausbildung einer intakten Kernhülle *in vitro* sowohl die löslichen Bestandteile, also Nukleoporine, sowie die Membrankomponenten des Eiextrakts benötigt werden (Vigers und Lohka, 1991; Goldberg et al., 1997; Gant und Wilson, 1997).

Im Folgenden wurde die MVP-initiierte Kernporenkomplexbildung auf molekularer Ebene untersucht. Da in früheren Versuchen gezeigt wurde, dass sich aus MVP-Molekülen spontan Vault-ähnliche Partikel assemblieren können (Stephen et al., 2001; Poderycki et al., 2006), wurde untersucht, ob die Induktion der NPC-Bildung im zellfreien System nur durch Vault-Partikel initiiert wird, oder ob dazu auch MVP-Monomere in der Lage sind. Durch immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen konnte dargelegt werden, dass sowohl Vault-ähnliche Partikel, als auch lösliche MVP-Moleküle zu der Induktion der NPC-Insertion befähigt sind (siehe 5.7). *In vivo* muss jedoch davon ausgegangen werden, dass der Großteil des endogenen MVP's innerhalb der Vault-Partikel assoziiert ist (Kedersha et al., 1991) und deshalb auch die Induktion der NPC-Bildung vermutlich eher durch Vault reguliert wird.

### **6.3 MVP und Annulate Lamellae**

In früheren Studien wurde gezeigt, dass die Zugabe von Energie zu *Xenopus* Eiextrakt in der Abwesenheit von Chromatin zur spontanen Bildung von Annulate Lamellae führt (Dabauvalle et al., 1991). Gibt man in diesen vorinkubierten Extrakt anschließend Spermienchromatin, so bilden sich porenlose Kerne. Durch die vorangegangene Bildung der Annulate Lamellae werden dem Extrakt membranassoziierte Faktoren depletiert, die bei der Bildung der NPC's essentiell sind (Ewald et al., 1997). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob es sich bei diesem membranassoziierten Faktor um MVP bzw. Vault handelt. Durch immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass MVP in diesem vorinkubierten Extrakt selektiv mit den gebildeten Annulate Lamellae lokalisiert und an der Kernmembran nicht detektierbar ist (siehe 5.11). Es ist somit belegt worden, dass bei der Bildung der Annulate Lamellae MVP-assoziierte Membranbestandteile beteiligt sind. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die MVP-assoziierte 30% Membranfraktion bei der Bildung von Annulate Lamellae eine wichtige Rolle spielt. Da sich nach der Bildung der Annulate Lamellae in dem Extrakt nur porenlose Kerne bilden, liegt die Vermutung nahe, dass die 40% Membranfraktion im Extrakt im Überschuss vorliegt oder bei der Bildung der Annulate Lamellae nicht beteiligt ist.

Homolog zu Vault-Partikeln wurden Annulate Lamellae in schnell proliferierenden Zellen lokalisiert, was auf eine Speicherung von Komponenten hinweist, die bei raschen Zellteilungen benötigt werden (Kessel 1992; Hamill und Suprenant, 1997; Berger et al., 2001). Ob MVP an der Bildung der in den Annulate Lamellae vorhandenen Porenkomplexen beteiligt ist, konnte

nicht direkt nachgewiesen werden. Die Co-Lokalisation der Porenkomplexe und MVP deutet jedoch auf eine mögliche Beteiligung von MVP bei dem stattfindenden Prozess hin. Eine Rolle für MVP bei der Bildung der zytoplasmatischen Porenkomplexe konnte durch die MVP-initiierte Porenbildung innerhalb von ER in vitro erbracht werden. Es konnte gezeigt werden, dass MVP innerhalb von isolierten ER-Membranen die Bildung von Poren induzieren kann (Diplomarbeit Anne Meinzing). Dies lässt zudem darauf schließen, dass sich Annulate Lamellae aus den Membranen des ER bilden und dass die 30% Membranfraktion diesen Membranen entspricht.

#### **6.4 Die NPC-Bildung durch MVP ist abhängig vom Kinesin-vermittelten Transport über Mikrotubuli**

Schon in vorangegangenen Arbeiten wurde die Notwendigkeit des Mikrotubuli-Netzwerkes bei der Bildung der NPC's im zellfreien System festgestellt (Ewald et al., 2001). Wird die Polymerisation von Mikrotubulifilamenten durch die Inkubation des Extrakts mit chemischen Inhibitoren wie Vinblastinsulfat, Nocodazol oder Colcemid blockiert, so bilden sich porenlose in vitro Kerne. In dieser Arbeit wurden die beiden isolierten 40% und 30% Membranfraktionen im Bezug auf ihre Interaktion mit Mikrotubuli untersucht.

Die 40% Membranfraktion bildete eine kontinuierliche Doppelmembran unabhängig von Mikrotubuli. (siehe 5.21 und 5.22). Bei der Bildung der Doppelkernmembran ist deshalb zu erwarten, dass andere Transportwege vollzogen zu werden, wie der Transport der Membranen über Aktinfilamente, oder dass die Membranvesikel über passive Diffusion an die Chromatinoberfläche gelangen. Die Mikrotubuli-unabhängige Bildung einer Doppelmembran bekräftigt die früheren Studien, nach denen die Inhibition der Mikrotubulipolymerisation zur Ausbildung von porenlosen Kernen führt (Ewald et al., 2001).

Im Gegensatz dazu interagierten die MVP-assoziierten 30% Membranvesikel mit dem Mikrotubulinetzwerk und eine Inhibition der Mikrotubulipolymerisation verhinderte die poreninduzierende Funktion der Membranvesikel (siehe 5.21 und 5.23).

Da die Poren-induzierende Funktion der 30% Membranen auf das assoziierte MVP bzw. Vault zurückzuführen ist, wurde ebenfalls die Interaktion von MVP mit Mikrotubuli näher analysiert. Der gerichtete Transport von Vault-Partikeln über Mikrotubuli wurde bereits in mehreren Arbeiten gezeigt (Herrmann et al., 1999; Slesina et al., 2006). Dabei interagieren die Partikel mit den Mikrotubulifasern über ihre Kappenstruktur (Eichenmuller et al., 2003). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl Vault-Partikel als auch rekombinante MVP-Moleküle aktiv über Mikrotubuli zur Kernhülle transportiert werden, wo sie die Induktion der NPC-Bildung auslösen (siehe 5.23). Wird MVP von den 30% Membranen dissoziiert, so können die Membranvesikel nicht mehr mit dem Mikrotubulinetzwerk interagieren und die Bildung von NPC's nicht induzieren. Die Interaktion der 30% Membranfraktion ist somit abhängig von

membranassoziierten Faktoren und die direkte Assoziation von MVP mit Mikrotubuli bekräftigt die Annahme, dass der gerichtete Transport der 30% Membranfraktion über MVP bzw. assoziierte Vault-Partikel stattfindet. Diese Ergebnisse sprechen klar gegen eine Fortbewegung und Lokalisation von Vault-Partikeln über passive Diffusion (van Zon et al., 2003) und bekräftigen den Befund, dass der Einbau von NPC's im zellfreien System den aktiven und gerichteten Transport über Mikrotubuli-Netzwerke benötigt (Ewald et al., 2001).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte die Kinetik der Kernhüllenbildung im Bezug auf Mikrotubuli analysiert werden. Zu diesem Zweck sollte anhand eines Fluorophor-gekoppelten Tubulins die Interaktion der Membranvesikel mit Mikrotubuli direkt verfolgt werden, ohne dass eine Fixierung der Präparate notwendig wäre. Die Analysen des EYFP-gekoppelten  $\alpha$ -Tubulins zeigten sich jedoch als unbrauchbar, da keine Fluoreszenz des Fusionsproteins nachweisbar war. Die Problematik liegt hierbei vermutlich in der korrekten Faltung des bakteriell exprimierten Fusionsproteins, was eine komplexe Mischung aus Chaperonen, einem Chaperonin-Komplex und mindestens fünf zusätzlichen Co-Faktoren benötigt (Liang und McRae, 1997; Lewis et al., 1997). Aufgrund einer fehlerhaften Faltung war das aufgereinigte EYFP- $\alpha$ -Tubulin-Fusionsprotein nicht in der Lage zu fluoreszieren und die Interaktion der Membranvesikel bei der Bildung der Kernhülle wurde stattdessen durch Fixierung der Präparate und der Verwendung von Tubulin-Antikörper analysiert (siehe 5.21).

Im nächsten Schritt wurden die bei dem Transportprozess beteiligten Motorproteine näher untersucht. Da Mikrotubuli im zellfreien System mit ihren Plus-Enden gegen das Chromatin gerichtet sind (Joshi 1998), sind bei dem gerichteten Transport von Proteinen, Proteinkomplexen und Faktoren in Richtung des Nukleus die Motorproteine der Kinesinfamilie beteiligt. Durch den Kinesininhibitor AS-2 konnte in einer früheren Studie gezeigt werden, dass der Einbau der NPC's in die Kernhülle über Kinesin-vermittelten Transport bewerkstelligt wird (Ewald et al., 2001). Die Inhibition von Dyneinen hatte dagegen keinen Effekt auf die Bildung von NPC's (persönliches Gespräch mit Prof. Dabauvalle). Um die Rolle von spezifischen Kinesinen bei dem MVP-vermittelten Prozess der NPC-Biogenese näher zu charakterisieren, wurden in dieser Arbeit Antikörper gegen zwei verschiedene Kinesine gewählt. Bei den Versuchen konnte gezeigt werden, dass durch die Inhibition des Kinesin-verwandten Motorproteins Mklp2 die Bildung von NPC's *in vitro* unterbunden wird (siehe 5.24). Dagegen hatte die Inhibition des Kinesins Eg5 keine Auswirkung auf die NPC-Biogenese. Mklp2 ist somit ein Kinesin, welches durch den gerichteten Transport von MVP direkt an der NPC-Biogenese beteiligt ist.

Die Notwendigkeit von Mklp2 bei mitotischen Vorgängen wurde bereits in mehreren Arbeiten gezeigt (Vernos und Karsenti, 1996; Hill et al., 2000; Fontijn et al., 2001; Gruneberg et al., 2004; Neef et al., 2006). Mklp2 ist während der Mitose am Spindelapparat lokalisiert, wobei die

Lokalisation erst ab der frühen Anaphase eintritt, wenn der Spindelapparat bereits ausgebildet ist. Eine Beteiligung von Mklp2 beim Aufbau des Spindelapparats wird deshalb ausgeschlossen. Mklp2 verbleibt während des Rests der Mitose in der Mitte des Spindelapparats und ist schließlich an der Zytokinese beteiligt (Hill et al., 2000). Das Motorprotein spielt eine wichtige Rolle bei der Lokalisation von bestimmten Kinasen während der Mitose, bei der Verteilung von Zellorganellen auf die beiden Tochterzellen nach der Mitose und ist essentiell für den korrekten Ablauf der Zytokinese. Mklp2 wurde zunächst als ein Rab-Bindungsprotein (Rab6-KIFL) beschrieben, welches zwei Bindestellen für Mikrotubuli besitzt und am Membrantransport innerhalb des Golgiapparats und vom Golgiapparat zum ER beteiligt ist (Echard et al., 1998). Eine Mikrotubuli-Bindedomäne liegt N-terminal an der Kinesin-Motordomäne, die andere Bindedomäne liegt C-terminal nach der Rab6-Bindedomäne. Die Inhibition von Mklp2 führt nach der Zellteilung zu binukleären Zellen, das Kinesin spielt somit bei der Zellteilung eine entscheidende Rolle. Interessanterweise konnte Mklp2 während der Interphase in Hela-Zellen nur sporadisch lokalisiert werden (Hill et al., 2000). Jedoch wurde in einigen Zellen eine gleichmäßige nukleäre Verteilung während der Interphase detektiert, was einen Hinweis auf Vorgänge an der Kernhülle geben kann und somit ebenfalls eine Rolle von Mklp2 bei der NPC-Bildung während der Interphase in vivo nicht ausschließt. Die Rolle von Mklp2 bei der NPC-Biogenese müsste diesbezüglich in vivo näher analysiert werden, jedoch zeigt der indirekte Beweis über die Inhibition von Mklp2, dass dieses Kinesin am Transport von MVP und Vault im zellfreien System beteiligt ist.

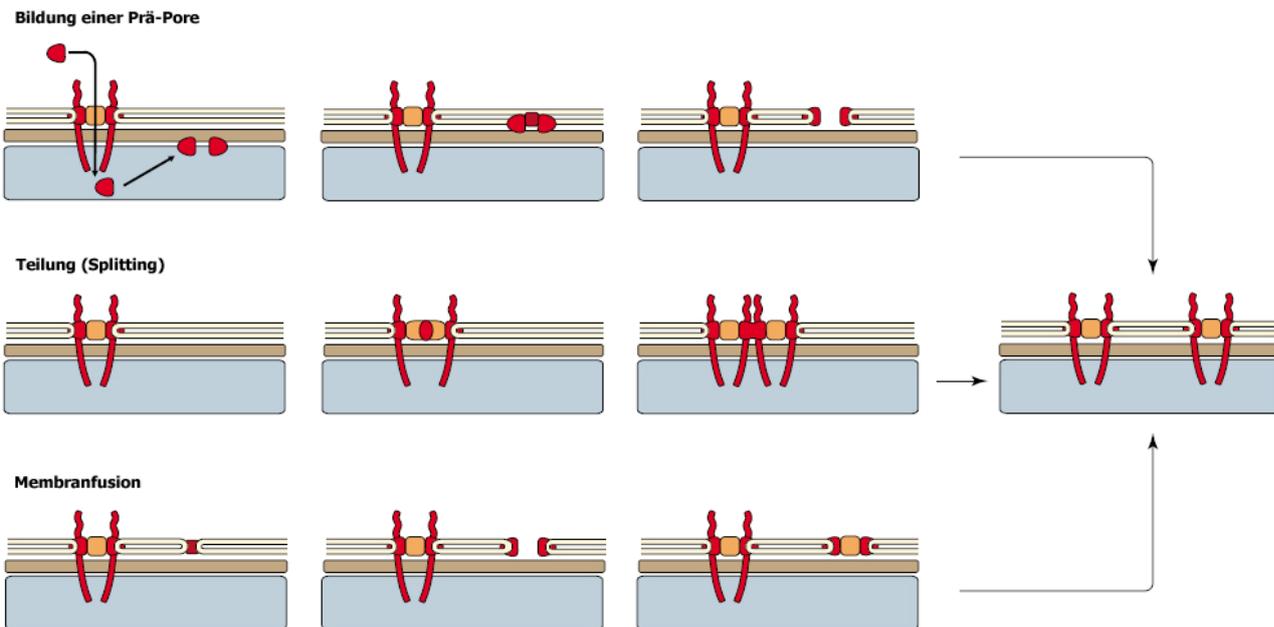
Das Kinesin Eg5 konnte in dieser Arbeit nicht mit den Prozessen der NPC-Bildung in Verbindung gebracht werden. Das Motorprotein ist an der Teilung der Centrosomen und am Aufbau des Spindelapparates beteiligt (Sawin et al., 1992; Blangy et al., 1995) und spielt somit im Gegensatz zu Mklp2 bei anderen mitotischen Prozessen eine Rolle.

## **6.5 Molekulare Mechanismen der Porenbildung durch MVP**

Die in dieser Arbeit untersuchte Einlagerung von NPC's in eine kontinuierliche Kernmembran ist ein interphasischer Vorgang, welcher bislang stark debattiert wurde (Rabut et al., 2004; Maeshima et al., 2006; Ryan et al., 2006; Rexach 2009). Eine der wichtigsten Fragen ist dabei, ob neue NPC's de novo in die Kernhülle integriert werden können, oder ob zum Aufbau neuer NPC's bereits vorhandene NPC's notwendig sind.

Für den Einbau von NPC's in die Kernhülle während der Interphase gibt es drei unterschiedliche Modellvorstellungen (siehe Abb. 6.1).

**Kernporenkomplexbildung während der Interphase**



**Abb. 6.1:** Schematische Darstellung der unterschiedlichen Modelle der Bildung von NPC's während der Interphase. Nach Rabut et al., 2004.

Das erste Modell beruht auf dem Import von neu synthetisierten Nukleoporinen durch schon vorhandene NPC's in das Innere des Zellkerns, wodurch der Aufbau von neuen NPC's entsprechend den Prozessen während der Mitose am Chromatin starten könnte. Die für den Aufbau neuer NPC's beteiligten Subkomplexe würden nach dem Import in den Zellkern an der Chromatinoberfläche binden. Anschließend bildet sich ausgehend von einer Prä-Pore ein neuer NPC. Gegen dieses Modell des interphasischen NPC-Aufbaus spricht die Tatsache, dass NPC's in kontinuierliche Kernmembranen eingelagert werden können, ohne dass zuvor Importprozesse durch schon bestehende NPC's stattfinden (Kiseleva et al., 2001; D'Angelo et al., 2006;), und die Bildung von Porenkomplexen in Annulate Lamellae in Abwesenheit von Chromatin (Dabauvalle et al., 1991).

Das zweite Modell beruht auf der Annahme, dass sich die schon vorhandenen NPC's teilen und beide Teile wieder zu vollständigen NPC's aufgebaut werden. Durch GFP-markierte Nukleoporine konnte jedoch gezeigt werden, dass sich NPC's nicht teilen, sondern neue NPC's unabhängig in die Kernhülle integriert werden (Dultz et al., 2008).

Das dritte Modell unterscheidet sich von den beiden zuvor genannten dadurch, dass es die Neubildung von NPC's während der Interphase völlig unabhängig von bereits vorhandenen NPC's darstellt. Demnach werden neue NPC's in Stellen der Kernhülle integriert, an denen durch die Fusion von äußerer und innerer Kernmembran eine Pore entsteht. In dieser Arbeit konnte nun erstmals gezeigt werden, dass MPV die de novo Bildung von NPC's in eine kontinuierliche Kernmembran initiieren kann. Diese Ergebnisse bekräftigen das Modell, nachdem sich neue

NPC's während der Interphase unabhängig von schon vorhandenen NPC's in die Kernhülle einbauen können.

Bei der Frage, in welcher Art und Weise MVP bei der NPC-Bildung beitragen kann, existieren verschiedene Erklärungsansätze. MVP könnte entsprechend dem Membranfusionsmodell der de novo Bildung von NPC's direkt mit der Kernmembran interagieren. In dieser Arbeit konnte erstmals ein direkter Einfluss von MVP auf Lipidmembranen belegt werden. MVP beeinflusste dabei einerseits die Form und Kontinuität von Liposomen und führte zu deren Perforation. Zudem konnte anhand von artifiziellen schwarzen Lipidmembranen eine Porenbildung von MVP direkt nachgewiesen werden (siehe 5.12 – 5.14). Um zu belegen, dass die Poreninduktion hierbei tatsächlich auf MVP beruht und nicht durch Verunreinigung des verwendeten Fusionsproteins mit bakteriellen Porinen entstanden ist, wurden Kontrollversuche mit Enrofloxacin durchgeführt, einem Antibiotikum, welches mit bakteriellen Poren interagiert und diese blockiert. Wären die in der schwarzen Lipidmembran entstandenen Poren bakterieller Herkunft, so würde die Zugabe von Enrofloxacin dazu führen, dass keine Ströme mehr über die Membran fließen. Durch Versuche mit Enrofloxacin wurde die Porenbildung von MVP jedoch nicht beeinträchtigt und beruht somit ausschließlich auf das Fusionsprotein (Daten nicht gezeigt). Die Funktion von MVP bei der Bildung der NPC's kann somit auf die Lipid-beeinflussende Wirkung von MVP an der Kernmembran beruhen. Eine Assoziation von MVP an Membranen konnte in früheren Studien im Zusammenhang mit Lipid Rafts gezeigt werden (Kowalski et al., 2007). Ebenso wurde schon mehrfach die Lokalisation und Assoziation von MVP an der Kernmembran demonstriert (Kickhoefer et al., 1998; Slesina et al., 2005; van Zon et al., 2006; Dickenson et al., 2007). Ein Ansatz, wie die Modifikation der Kernmembran durch MVP bewerkstelligt werden kann, findet sich in der Tertiärstruktur von MVP. In einer Kristallstrukturanalyse von rekombinantem MVP konnte gezeigt werden, dass sich im Bereich der Vault-Domänen mehrere Tryptophan-Reste befinden, die parallel angeordnet sind (Anderson et al., 2007). Diese Tryptophan-Reste sind in der Lage, eine Art Membrananker zu bilden. Dabei könnte durch das Eintauchen der Tryptophan-Reste in die Membran die Membranstruktur lokal verformt werden, was die Lipid-beeinflussende Wirkung von MVP erklären würde. Ebenso könnte durch eine lokale Verformung die ONM in die unmittelbare Nähe der INM gelangen und dort die Fusion beider Kernmembranen auslösen. In diese durch MVP induzierten Kernporen könnte dann die Insertion der Subkomplexe des NPC's initiiert werden. Erst kürzlich konnte in unserer Arbeitsgruppe die Notwendigkeit der Vault-Domänen von MVP bei der NPC-Bildung demonstriert werden. Die Verwendung einer Deletionsmutante, bestehend aus dem C-terminalen Bereich von MVP ohne die Vault-Domänen, führte im zellfreien System von *Xenopus* nicht zur Ausbildung von NPC's in porenlosen Kernen. Im Gegensatz zum vollständigen MVP assoziierte die Deletionsmutante nicht mit der Kernmembran und eine

Insertion von NPC's blieb aus. Da sich die bereits erwähnten Tryptophan-Reste innerhalb des N-terminalen Bereichs von MVP befinden, könnte erklären, warum die Vault-Domänen für die Bildung von NPC's notwendig sind.

Aufgrund der Tatsache, dass MVP in vivo hauptsächlich zu Vault-Partikeln zusammengelagert ist, ergibt sich eine weitere Möglichkeit, wie MVP bei der NPC-Bildung beteiligt sein könnte. Vault-Partikel wurden anfänglich als Transporter eines NPC's beschrieben (Kedersha et al., 1991). Dieser auch als Central Plug bezeichnete Teil eines NPC's wurde inzwischen als Artefakt eingestuft und stellt wahrscheinlich Partikel dar, die zur Zeit der Präparatfixierung durch den NPC transportiert wurden (Stoffler et al., 2003). Die Größe und Symmetrie der Vault-Partikel gibt jedoch einen Hinweis darauf, dass sie im Zusammenhang mit NPC's stehen. So könnten Vault-Partikel bei der Stabilisierung der Porenmembran während des Aufbaus der NPC's eine Rolle spielen, indem sie die relative Größe der Zentralpore vorgeben, bis das Zentralgerüst des NPC's mit der Porenmembran assoziiert ist. Zudem würde ein ungehinderter Austausch von Makromolekülen durch die Kernpore verhindert werden, da der Vault-Partikel die Pore aufgrund seiner Größe verschließen kann.

MVP könnte jedoch auch indirekt an der Bildung von NPC's beteiligt sein, indem es am gerichteten Transport von Membranen bzw. Faktoren für die NPC-Bildung zur Kernmembran beteiligt ist. MVP und insbesondere Vault-Partikel wurden schon früh mit Transportprozessen in Verbindung gebracht und könnten durch Mikrotubuli-vermittelten Transport auch bei der NPC-Biogenese beteiligt sein (Rome et al., 1991; Kickhoefer et al., 1996; Suprenant, 2002; Steiner et al., 2006). Proteine, die an der Bildung von NPC's beteiligt sind, könnten innerhalb eines Vault-Partikels an die Kernmembran transportiert werden. Es ist denkbar, dass MVP bei diesem Prozess mit Nukleoporinen interagiert, welche ebenfalls am Beginn der NPC-Assemblierung beteiligt sind. Es wurden bislang einige Proteine identifiziert, die für die Bildung von NPC's während der Interphase notwendig sind, wie beispielsweise das lösliche Nukleoporin Nup53, welches mit der Kernmembran und der Lamina assoziiert ist (Lusk et al., 2002; Hawryluk-Gara et al., 2008; Rodenas et al., 2009). Nup53 scheint bei der Kernhüllenbildung, insbesondere in der Frühentwicklung, eine wichtige Rolle zu spielen und ist daher ein wichtiger Kandidat für eine mögliche Interaktion mit MVP. In dieser Arbeit wurde die Interaktion von MVP mit zahlreichen zellulären Proteinen nachgewiesen (siehe 5.25). Unter diesen Interaktionspartnern könnten sich möglicherweise auch lösliche Nukleoporine befinden, die über MVP-vermittelten Transport zu den sich bildenden NPC's gelangen. Durch einen Overlay-Blot-Assay wurden 11 potentielle MVP-Bindungspartner detektiert (siehe 5.25). Da bei einem Overlay-Blot Proteine und Proteinkomplexe denaturiert und getrennt sind, sind mehr Bindungen möglich als durch Bindungsstudien mit nicht denaturierten Proteinen. Deshalb wurden in der durchgeführten Immunpräzipitation von MVP in *Xenopus* Eiextrakt weniger Bindungspartner detektiert als durch

den Overlay-Blot (vgl Tab. 5.1 und Tab. 5.2). Möglicherweise sind einige der durch den Overlay-Blot identifizierten Bindungsstellen *in vivo* nicht zugänglich für MVP. Durch die Immunpräzipitation wurden jedoch 5 MVP-Bindungspartner nachgewiesen, von denen drei eine ähnliche Molekularmasse besitzen wie Proteine, die durch den Overlay-Blot nachgewiesen wurden. Die Analyse der durch die Immunpräzipitation ermittelten MVP-Bindungspartner im Immunblot mit dem Nukleoporin-Antikörper mab414 erbrachte keine verwertbaren Ergebnisse, es konnten keine Nukleoporine nachgewiesen werden. Wahrscheinlich sind die Proteinmengen, die durch die Immunpräzipitation aus dem Extrakt gezogen wurden, für eine Detektion durch mab414 zu gering, oder es waren keine Nukleoporine, die vom Antikörper mab414 erkannt werden, unter den Bindungspartnern. Um zu analysieren, ob MVP bei der Bildung der NPC's mit Nukleoporinen interagiert, wurden deswegen Pull-Down-Versuche durchgeführt und die an MVP gebundenen Proteine ebenfalls im Immunblot mit mab414 analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass MVP nicht mit den von mab414 detektierbaren Nukleoporinen Nup62, Nup153, Nup214 und Nup358 interagiert (siehe 5.26). Dies lässt sich dadurch erklären, dass diese FXFG-Sequenzmotiv beinhaltenden Nukleoporine nicht an der Initiation der NPC-Assemblierung beteiligt sind. Nup153 vermittelt den Aufbau des nukleären Korbes (Frosst et al., 2002; Hase und Cardes, 2003; Krull et al., 2004), während Nup214 und Nup358 die zytoplasmatischen Filamente ausbilden (Bernad et al., 2004). Nup62 wird erst gegen Ende der NPC-Bildung in den Komplex integriert und dient als Marker für komplett assemblierte NPC's (Bodoor et al., 1999; Dultz et al., 2008). Von den in der Arbeit detektierten zytosolischen Bindungspartnern von MVP wäre aufgrund der identifizierten Molekularmassen Nup53 ein möglicher Kandidat für die Interaktion von MVP mit Nukleoporinen. Da aber keine Antikörper gegen das Nup53 vorlagen und die Bindungspartner von MVP nicht massenspektrometrisch analysiert wurden, kann bei der Frage nach der Identität der Proteine nur spekuliert werden. Eine Analyse der in dieser Arbeit detektierten zellulären MVP-Bindungspartner durch 2D-gelelektrophoretische Auftrennung wäre hierbei notwendig.

Neben dieser Funktion als Transportfaktor von Bestandteilen eines NPC's könnte MVP jedoch auch spezifisch an Transmembranproteine binden und somit die Stellen in der Kernhülle definieren, an denen neue NPC's integriert werden. Es ist deshalb notwendig, weitere Interaktionspartner von MVP zu identifizieren und zu analysieren, ob MVP unspezifisch an die Lipidstruktur oder spezifisch über Transmembranproteine an die Kernmembran bindet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eindeutig, dass MVP mit Membranen interagieren kann und zur Bildung von Poren befähigt ist. Da bislang eine Interaktion von MVP mit Nukleoporinen nicht bestätigt werden konnte, ist es deshalb auch möglich, dass MVP bei der NPC-Bildung eher an strukturellen Veränderungen an der Kernmembran beteiligt ist, als am direkten Aufbau der

NPC's durch die einzelnen Subkomplexe. Die Identifikation der MVP-Bindungspartner ist deshalb notwendig, um die Beteiligung von MVP bei der NPC-Bildung genauer zu bestimmen.

### **6.6 Ist MVP ein ubiquitärer Faktor für die Kernporenkomplexbildung?**

Eine Beteiligung von MVP bei der NPC-Biogenese lässt auf eine essentielle zelluläre Funktion schließen. Bei niederen Spezies wie *Dyctiostelium discoideum* konnte bereits eine lebensnotwendige Funktion von MVP nachgewiesen werden (Vasu und Rome, 1995). Die Inhibition der MVP-Expression durch siRNA, sowie die Mikroinjektion von MVP-Antikörpern führte ebenso in *Xenopus* Zellen zum Absterben der Zellen bzw. zu Deformationen der Kernhülle (Dissertation Friederike Vollmar).

MVP wird in *Xenopus* ubiquitär in allen Organen und Geweben exprimiert (siehe 5.15 und 5.16). Um die poreninduzierende Funktion von MVP im Bezug auf proliferierende Zellen näher zu untersuchen, wurden Mikroinjektionen von MVP-Morpholinos in *Xenopus* Embryonen durchgeführt (siehe 5.17). Die durch die Morpholinos verhinderte Translation von MVP führte in Zweizellstadien zum völligen Entwicklungsstopp der injizierten Seite des Embryos und lässt somit auf eine essentielle Funktion in der frühen Embryogenese von *Xenopus laevis* schließen. Dies ist zudem ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung von MVP bei der NPC-Biogenese schnell teilender Zellen und gerade bei der frühen Phase der Embryogenese. So beinhalten *Xenopus* Oozyten bis zu  $5 \times 10^7$  NPC's, deren Zahl nach der Befruchtung und den folgenden raschen Zellteilungen stetig anwachsen muss (Gorlich und Kutay, 1999; Lim et al., 2008). Da bis zur Mid Blastula Transition ausschließlich maternale Faktoren während der Proliferation aufgebraucht werden, finden sich alle für die NPC-Biogenese notwendigen Faktoren und Bestandteile schon innerhalb der Oozyten. Die Tatsache, dass Vault-Partikel in Oozyten in großer Menge vorkommen, spricht ebenfalls für die Notwendigkeit bei der Bildung der NPC's in den frühen Stadien der Embryogenese. Im Zuge der Untersuchung der Beteiligung von MVP am Aufbau einer multiplen Chemoresistenz wurde eine MVP-Knock-Out-Maus hergestellt. Interessanterweise ist jedoch der vollständige Knock-Out des MVP-Gens in Mäusen nicht letal (Mossink et al., 2002). Es stellt sich somit die Frage, warum MVP trotz der Beteiligung an der NPC-Biogenese nicht bei allen Vertebraten essentiell ist. Dass ein völliges Fehlen von MVP und somit auch Vault-Partikeln in der Knock-Out Maus die Embryonalentwicklung der Maus nicht gravierend beeinträchtigt, lässt sich damit erklären, dass für einen so lebensnotwendigen Vorgang wie der Bildung von NPC's redundante Mechanismen existieren, die bei höher entwickelten Spezies sicherstellen, dass der Prozess trotz des Verlustes von Faktoren nach wie vor durchgeführt wird. Ein weiterer Grund ist die Vorstellung, dass MVP eher bei den Prozessen während der Interphase zum Tragen kommt. In vivo sind unmittelbar nach der Mitose zahlreiche NPC's in der expandierenden Kernhülle vorhanden. Die Bildung von NPC's während

der Interphase könnte in vivo durchaus auch durch den Import von Nukleoporinen durch bereits vorhandene NPC's initiiert werden, was einen Verlust von MVP und dessen Funktion bei der de novo Bildung von NPC's kompensieren würde. Interessant wäre die Analyse der Kernhüllen der MVP-Knock-Out Maus in Bezug auf die Anzahl an NPC's, die während der Interphase in die Kernhülle integriert werden. Möglicherweise wird durch den Verlust von MVP die Anzahl der neu inserierten NPC's vermindert, was zwar in der Folge nicht letal für die Maus wäre, aber einen Hinweis darauf gibt, warum der Ausfall von MVP bei Mäusen verkräftet werden kann.

Die Studien von MVP in verschiedenen Spezies haben bislang eine Vielzahl von zellulären Funktionen offenbart. Hierbei könnte eine weitere Erklärung für die unterschiedlichen Auswirkungen eines Verlustes von MVP zwischen den Spezies liegen. Vault ähnelt in seinem Aufbau in Grundzügen dem von Viren. Wie die Virenhülle wird Vault aus hauptsächlich einem Protein aufgebaut und besteht aus einem hohlen symmetrischen Körper. Aufgrund dieser Homologie ergibt sich die Vermutung, dass Vaults im Laufe der Entwicklung als ehemals virale Parasiten von ihren Wirten integriert wurden und sich endosymbiontisch in den Wirten evolvierten (Nandy et al., 2009). Somit könnten sich in verschiedenen Spezies unterschiedliche Funktionen für Vaults entwickelt haben, was die hohe Zahl an unterschiedlichen zellulären Aufgaben erklärt und einen Hinweis darauf gibt, weshalb Vault speziesabhängig zu den lebensnotwendigen Faktoren zählt.

## **6.7 Ausblick**

In dieser Arbeit wurde erstmals der molekulare Mechanismus bei der Beteiligung von MVP bei der NPC-Bildung untersucht. Ein wichtiger Schritt ist nun die Identifikation der Bindungspartner, die eventuell zu der Insertion der NPC's in die Kernmembran beitragen. Bislang konnte noch nicht geklärt werden, ob MVP bei der NPC-Bildung direkt mit Nukleoporinen interagiert, oder ob die Funktion von MVP ausschließlich auf dessen Fähigkeit beruht, Lipidmembranen zu beeinflussen und somit Poren zu induzieren.

Um eine Interaktion von MVP mit bestimmten Nukleoporinen nachzuweisen, wurden in dieser Arbeit verschiedene Bindungsstudien durchgeführt, bei denen mehrere zelluläre MVP-Bindungspartner nachgewiesen wurden. Um diese Bindungspartner näher zu analysieren, müssen die Polypeptide 2D-gelelektrophoretisch untersucht werden. Eine Identifikation der ermittelten Proteine kann durch massenspektrometrische Untersuchungen erfolgen. Eine weitere Möglichkeit, um zu prüfen, ob sich unter den MVP-Bindungspartnern Nukleoporine befinden, ist die Analyse der zellulären Bindungspartner mit spezifischen Antikörpern. In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit mab414 gearbeitet. Durch eine Vielzahl von weiteren Nukleoporin-Antikörpern könnte analysiert werden, ob MVP bei der NPC-Bildung direkt mit bestimmten Nukleoporinen interagiert. Ebenso könnte untersucht werden, ob es bei dem MVP-

vermittelten Prozess der NPC-Bildung zu spezifischen Bindungen von MVP mit Transmembranproteinen kommt oder ob MVP an zufälligen Stellen mit der Kernmembran interagiert.

Um die Kinetik der Kernhüllenbildung unter Beteiligung der isolierten 40% und 30% Membranfraktionen in Bezug auf den Transport über Mikrotubuli näher zu untersuchen, könnte das in dieser Arbeit erstellte Tubulin-Fusionsprotein eukaryotisch exprimiert werden, um die Probleme, die durch die bakterielle Expression entstanden sind, zu umgehen. Mit Hilfe eines Konfokalmikroskopes kann dann das Verhalten beider Membranfraktionen beim Aufbau der Kernhülle direkt verfolgt werden. Ziel ist die Erstellung einer aus zahlreichen Einzelaufnahmen zusammengesetzten Videoaufnahme der Entstehung der Kernhülle durch die 40% und 30% Membranfraktion in dem in dieser Arbeit beschriebenen Modellsystem.

Da MVP mindestens drei unterschiedliche Domänen beinhaltet, wäre es wichtig zu wissen, welche Domänen bei der Porenbildung eine Rolle spielen (siehe Abb. 2.5). In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits damit begonnen, die einzelnen Domänen von MVP bei der NPC-Bildung näher zu betrachten. Nach der Deletion des N-terminalen Bereichs von MVP, welcher die Vault-Domänen enthält, ist MVP nicht mehr in der Lage, die Bildung von NPC's zu initiieren. Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob die Vault-Domänen für die Porenbildung ausreichend sind. Durch die Herstellung weiterer Mutanten könnte der für die NPC-Bildung notwendige Bereich weiter eingegrenzt werden und möglicherweise distinkten Domänen von MVP zugeordnet werden. Erste Ergebnisse lassen zudem darauf schließen, dass die unterschiedlichen MVP-Domänen neben ihrer Funktion für die Bildung der Vault-Partikel und der Bildung von NPC's für die intrazelluläre Lokalisation entscheidend sind.

Um die Funktion von MVP bei der NPC-Bildung weiter zu untersuchen, muss das Verhalten von MVP in verschiedenen Systemen analysiert werden. Durch den Einsatz von GFP-markiertem MVP können die Vorgänge während der Zellteilung in Bezug auf die Lokalisation von MVP in verschiedenen Zelltypen unterschiedlicher Spezies beobachtet werden.

Wichtig ist hierbei das Verhalten von GFP-MVP während der Mitose und bei der Bildung von NPC's während der Interphase in lebenden Zellen. Hierbei sollte sowohl das Gesamt-MVP als auch die verschiedenen Deletionsmutanten analysiert werden. Um die Rolle von MVP bei der NPC-Bildung in vivo näher zu untersuchen, könnten Mikroinjektionsversuche von MVP-Antikörper in mitotischen Zellen durchgeführt werden, welche zuvor synchronisiert wurden. Interessant wäre auch die Analyse von Zellen der MVP-Knock-Out-Maus, um eine Erklärung dafür zu finden, warum das völlige Fehlen von MVP bei der Maus keine fatalen Folgen hat.

## 7. Literaturverzeichnis

- Abbondanza, C., Rossi, V., Roscigno, A., Gallo, L., Belsito, A., Piluso, G., Medici, N., Nigro, V., Molinari, A. M., Moncharmont, B. et al.** (1998). Interaction of vault particles with estrogen receptor in the MCF-7 breast cancer cell. *J Cell Biol* **141**, 1301-1310.
- Akey, C. W.** (1989). Interactions and structure of the nuclear pore complex revealed by cryo-electron microscopy. *J Cell Biol* **109**, 955-970.
- Akey, C. W. and Radermacher, M.** (1993). Architecture of the *Xenopus* nuclear pore complex revealed by three-dimensional cryo-electron microscopy. *J Cell Biol* **122**, 1-19.
- Akhtar, A. and Gasser, S. M.** (2007). The nuclear envelope and transcriptional control. *Nat Rev Genet* **8**, 507-517.
- Alber, F., Dokudovskaya, S., Veenhoff, L. M., Zhang, W., Kipper, J., Devos, D., Suprpto, A., Karni-Schmidt, O., Williams, R., Chait, B. T. et al.** (2007 a). The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature* **450**, 695-701.
- Alber, F., Dokudovskaya, S., Veenhoff, L. M., Zhang, W., Kipper, J., Devos, D., Suprpto, A., Karni-Schmidt, O., Williams, R., Chait, B. T. et al.** (2007 b). Determining the architectures of macromolecular assemblies. *Nature* **450**, 683-694.
- Ame, J. C., Spenlehauer, C. and de Murcia, G.** (2004). The PARP superfamily. *Bioessays* **26**, 882-893.
- An, H. J., Ryu, S. J., Kim, S. Y., Choi, H. R., Chung, J. H. and Park, S. C.** (2009). Age associated high level of major vault protein is p53 dependent. *Cell Biochem Funct* **27**, 289-295.
- Anderson, D. H., Kickhoefer, V. A., Sievers, S. A., Rome, L. H. and Eisenberg, D.** (2007). Draft crystal structure of the vault shell at 9-A resolution. *PLoS Biol* **5**, e318.
- Anderson, D. J. and Hetzer, M. W.** (2007). Nuclear envelope formation by chromatin-mediated reorganization of the endoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol* **9**, 1160-1166.
- Anderson, D. J. and Hetzer, M. W.** (2008). Shaping the endoplasmic reticulum into the nuclear envelope. *J Cell Sci* **121**, 137-142.
- Antonin, W., Franz, C., Haselmann, U., Antony, C. and Mattaj, I. W.** (2005). The integral membrane nucleoporin pom121 functionally links nuclear pore complex assembly and nuclear envelope formation. *Mol Cell* **17**, 83-92.
- Antonin, W., Ellenberg, J. and Dultz, E.** (2008). Nuclear pore complex assembly through the cell cycle: regulation and membrane organization. *FEBS Lett* **582**, 2004-2016.
- Arnautov, A., Azuma, Y., Ribbeck, K., Joseph, J., Boyarchuk, Y., Karpova, T., McNally, J. and Dasso, M.** (2005). Crm1 is a mitotic effector of Ran-GTP in somatic cells. *Nat Cell Biol* **7**, 626-632.
- Askjaer, P., Galy, V., Hannak, E. and Mattaj, I. W.** (2002). Ran GTPase cycle and importins alpha and beta are essential for spindle formation and nuclear envelope assembly in living *Caenorhabditis elegans* embryos. *Mol Biol Cell* **13**, 4355-4370.
- Audhya, A., Desai, A. and Oegema, K.** (2007). A role for Rab5 in structuring the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **178**, 43-56.
- Azuma, Y. and Dasso, M.** (2000). The role of Ran in nuclear function. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 302-307.
- Baldwin, E. T., Sarver, R. W., Bryant, G. L., Jr., Curry, K. A., Fairbanks, M. B., Finzel, B. C., Garlick, R. L., Henrikson, R. L., Horton, N. C., Kelley, L. L. et al.** (1998). Cation binding to the integrin CD11b I domain and activation model assessment. *Structure* **6**, 923-935.
- Bateman, A. and Kickhoefer, V.** (2003). The TROVE module: a common element in Telomerase, Ro and Vault ribonucleoproteins. *BMC Bioinformatics* **4**, 49.
- Baur, T., Ramadan, K., Schlundt, A., Kartenbeck, J. and Meyer, H. H.** (2007). NSF- and SNARE-mediated membrane fusion is required for nuclear envelope formation and completion of nuclear pore complex assembly in *Xenopus laevis* egg extracts. *J Cell Sci* **120**, 2895-2903.
- Beaudouin, J., Gerlich, D., Daigle, N., Eils, R. and Ellenberg, J.** (2002). Nuclear envelope breakdown proceeds by microtubule-induced tearing of the lamina. *Cell* **108**, 83-96.
- Beck, M., Forster, F., Ecke, M., Plitzko, J. M., Melchior, F., Gerisch, G., Baumeister, W. and Medalia, O.** (2004). Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography. *Science* **306**, 1387-1390.
- Beck, M., Lucic, V., Forster, F., Baumeister, W. and Medalia, O.** (2007). Snapshots of nuclear pore complexes in action captured by cryo-electron tomography. *Nature* **449**, 611-615.
- Beck, M. and Medalia, O.** (2008). Structural and functional insights into nucleocytoplasmic transport. *Histol Histopathol* **23**, 1025-1033.

- Belgareh, N., Rabut, G., Bai, S. W., van Overbeek, M., Beaudouin, J., Daigle, N., Zatsepina, O. V., Pasteau, F., Labas, V., Fromont-Racine, M. et al.** (2001). An evolutionarily conserved NPC subcomplex, which redistributes in part to kinetochores in mammalian cells. *J Cell Biol* **154**, 1147-1160.
- Bell, P., Dabauvalle, M. C. and Scheer, U.** (1992). In vitro assembly of prenucleolar bodies in *Xenopus* egg extract. *J Cell Biol* **118**, 1297-1304.
- Benz, R., Janko, K., Boos, W. and Lauger, P.** (1978). Formation of large, ion-permeable membrane channels by the matrix protein (porin) of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **511**, 305-319.
- Berger, W., Elbling, L. and Micksche, M.** (2000). Expression of the major vault protein LRP in human non-small-cell lung cancer cells: activation by short-term exposure to antineoplastic drugs. *Int J Cancer* **88**, 293-300.
- Berger, W., Spiegl-Kreinecker, S., Buchroithner, J., Elbling, L., Pirker, C., Fischer, J. and Micksche, M.** (2001). Overexpression of the human major vault protein in astrocytic brain tumor cells. *Int J Cancer* **94**, 377-382.
- Berger, W., Steiner, E., Grusch, M., Elbling, L. and Micksche, M.** (2009). Vaults and the major vault protein: novel roles in signal pathway regulation and immunity. *Cell Mol Life Sci* **66**, 43-61.
- Bernad, R., van der Velde, H., Fornerod, M. and Pickersgill, H.** (2004). Nup358/RanBP2 attaches to the nuclear pore complex via association with Nup88 and Nup214/CAN and plays a supporting role in CRM1-mediated nuclear protein export. *Mol Cell Biol* **24**, 2373-2384.
- Blangy, A., Lane, H. A., d'Herin, P., Harper, M., Kress, M. and Nigg, E. A.** (1995). Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell* **83**, 1159-1169.
- Blower, M. D., Nachury, M., Heald, R. and Weis, K.** (2005). A Rae1-containing ribonucleoprotein complex is required for mitotic spindle assembly. *Cell* **121**, 223-234.
- Bodoor, K., Shaikh, S., Salina, D., Raharjo, W. H., Bastos, R., Lohka, M. and Burke, B.** (1999). Sequential recruitment of NPC proteins to the nuclear periphery at the end of mitosis. *J Cell Sci* **112** (Pt 13), 2253-2264.
- Boehmer, T., Jeudy, S., Berke, I. C. and Schwartz, T. U.** (2008). Structural and functional studies of Nup107/Nup133 interaction and its implications for the architecture of the nuclear pore complex. *Mol Cell* **30**, 721-731.
- Bork, P., Hofmann, K., Bucher, P., Neuwald, A. F., Altschul, S. F. and Koonin, E. V.** (1997). A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *FASEB J* **11**, 68-76.
- Bouhamyia, L., Chantot-Bastarud, S., Zaidi, S., Roynard, P., Prengel, C., Bernaudin, J. F. and Fleury-Feith, J.** (2007). Immunolocalization and cell expression of lung resistance-related protein (LRP) in normal and tumoral human respiratory cells. *J Histochem Cytochem* **55**, 773-782.
- Brody, J. R., Calhoun, E. S., Gallmeier, E., Creavalle, T. D. and Kern, S. E.** (2004). Ultra-fast high-resolution agarose electrophoresis of DNA and RNA using low-molarity conductive media. *Biotechniques* **37**, 598, 600, 602.
- Brohawn, S. G., Leksa, N. C., Spear, E. D., Rajashankar, K. R. and Schwartz, T. U.** (2008). Structural evidence for common ancestry of the nuclear pore complex and vesicle coats. *Science* **322**, 1369-1373.
- Brohawn, S. G., Partridge, J. R., Whittle, J. R. and Schwartz, T. U.** (2009). The nuclear pore complex has entered the atomic age. *Structure* **17**, 1156-1168.
- Brohawn, S. G. and Schwartz, T. U.** (2009). A lattice model of the nuclear pore complex. *Commun Integr Biol* **2**, 205-207.
- Brown, C. R. and Silver, P. A.** (2007). Transcriptional regulation at the nuclear pore complex. *Curr Opin Genet Dev* **17**, 100-106.
- Brown, C. R., Kennedy, C. J., Delmar, V. A., Forbes, D. J. and Silver, P. A.** (2008). Global histone acetylation induces functional genomic reorganization at mammalian nuclear pore complexes. *Genes Dev* **22**, 627-639.
- Burger, K. N.** (2000). Greasing membrane fusion and fission machineries. *Traffic* **1**, 605-613.
- Burke, B. and Ellenberg, J.** (2002). Remodelling the walls of the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 487-497.
- Byrne, R. D., Garnier-Lhomme, M., Han, K., Dowicki, M., Michael, N., Totty, N., Zhendre, V., Cho, A., Pettitt, T. R., Wakelam, M. J. et al.** (2007). PLCgamma is enriched on poly-phosphoinositide-rich vesicles to control nuclear envelope assembly. *Cell Signal* **19**, 913-922.

- Cabal, G. G., Genovesio, A., Rodriguez-Navarro, S., Zimmer, C., Gadal, O., Lesne, A., Buc, H., Feuerbach-Fournier, F., Olivo-Marin, J. C., Hurt, E. C. et al.** (2006). SAGA interacting factors confine sub-diffusion of transcribed genes to the nuclear envelope. *Nature* **441**, 770-773.
- Cai, Y., Gao, Y., Sheng, Q., Miao, S., Cui, X., Wang, L., Zong, S. and Koide, S. S.** (2002). Characterization and potential function of a novel testis-specific nucleoporin BS-63. *Mol Reprod Dev* **61**, 126-134.
- Casolari, J. M., Brown, C. R., Komili, S., West, J., Hieronymus, H. and Silver, P. A.** (2004). Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization. *Cell* **117**, 427-439.
- Casolari, J. M., Brown, C. R., Drubin, D. A., Rando, O. J. and Silver, P. A.** (2005). Developmentally induced changes in transcriptional program alter spatial organization across chromosomes. *Genes Dev* **19**, 1188-1198.
- Chernomordik, L. V., Zimmerberg, J. and Kozlov, M. M.** (2006). Membranes of the world unite! *J Cell Biol* **175**, 201-207.
- Chernomordik, L. V. and Kozlov, M. M.** (2008). Mechanics of membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 675-683.
- Chi, Y. H., Haller, K., Peloponese, J. M., Jr. and Jeang, K. T.** (2007). Histone acetyltransferase hALP and nuclear membrane protein hsSUN1 function in de-condensation of mitotic chromosomes. *J Biol Chem* **282**, 27447-27458.
- Chien, A., Edgar, D. B. and Trela, J. M.** (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* **127**, 1550-1557.
- Choi-Miura, N. H., Sano, Y., Oda, E., Nakano, Y., Tobe, T., Yanagishita, T., Taniyama, M., Katagiri, T. and Tomita, M.** (1995). Purification and characterization of a novel glycoprotein which has significant homology to heavy chains of inter-alpha-trypsin inhibitor family from human plasma. *J Biochem* **117**, 400-407.
- Chugani, D. C., Rome, L. H. and Kedersha, N. L.** (1993). Evidence that vault ribonucleoprotein particles localize to the nuclear pore complex. *J Cell Sci* **106 (Pt 1)**, 23-29.
- Chung, C. T., Niemela, S. L. and Miller, R. H.** (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2172-2175.
- Chung, J. H., Ginn-Pease, M. E. and Eng, C.** (2005). Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) has nuclear localization signal-like sequences for nuclear import mediated by major vault protein. *Cancer Res* **65**, 4108-4116.
- Chung, J. H. and Eng, C.** (2005). Nuclear-cytoplasmic partitioning of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) differentially regulates the cell cycle and apoptosis. *Cancer Res* **65**, 8096-8100.
- Churchward, M. A., Rogasevskaia, T., Brandman, D. M., Khosravani, H., Nava, P., Atkinson, J. K. and Coorsen, J. R.** (2008). Specific lipids supply critical negative spontaneous curvature--an essential component of native Ca<sup>2+</sup>-triggered membrane fusion. *Biophys J* **94**, 3976-3986.
- Collas, P. and Courvalin, J. C.** (2000). Sorting nuclear membrane proteins at mitosis. *Trends Cell Biol* **10**, 5-8.
- Collins, K., Kobayashi, R. and Greider, C. W.** (1995). Purification of *Tetrahymena* telomerase and cloning of genes encoding the two protein components of the enzyme. *Cell* **81**, 677-686.
- Coorsen, J. R. and Rand, R. P.** (1990). Effects of cholesterol on the structural transitions induced by diacylglycerol in phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayer systems. *Biochem Cell Biol* **68**, 65-69.
- Cordes, V. C., Reidenbach, S., Rackwitz, H. R. and Franke, W. W.** (1997). Identification of protein p270/Tpr as a constitutive component of the nuclear pore complex-attached intranuclear filaments. *J Cell Biol* **136**, 515-529.
- Cotter, L., Allen, T. D., Kiseleva, E. and Goldberg, M. W.** (2007). Nuclear membrane disassembly and rupture. *J Mol Biol* **369**, 683-695.
- Cronshaw, J. M., Krutchinsky, A. N., Zhang, W., Chait, B. T. and Matunis, M. J.** (2002). Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol* **158**, 915-927.
- Cronshaw, J. M. and Matunis, M. J.** (2004). The nuclear pore complex: disease associations and functional correlations. *Trends Endocrinol Metab* **15**, 34-39.
- Dabauvalle, M. C., Loos, K., Merkert, H. and Scheer, U.** (1991). Spontaneous assembly of pore complex-containing membranes ("annulate lamellae") in *Xenopus* egg extract in the absence of chromatin. *J Cell Biol* **112**, 1073-1082.

- Daigle, N., Beaudouin, J., Hartnell, L., Imreh, G., Hallberg, E., Lippincott-Schwartz, J. and Ellenberg, J.** (2001). Nuclear pore complexes form immobile networks and have a very low turnover in live mammalian cells. *J Cell Biol* **154**, 71-84.
- D'Angelo, M. A., Anderson, D. J., Richard, E. and Hetzer, M. W.** (2006 a). Nuclear pores form de novo from both sides of the nuclear envelope. *Science* **312**, 440-443.
- D'Angelo, M. A. and Hetzer, M. W.** (2006 b). The role of the nuclear envelope in cellular organization. *Cell Mol Life Sci* **63**, 316-332.
- D'Angelo, M. A. and Hetzer, M. W.** (2008). Structure, dynamics and function of nuclear pore complexes. *Trends Cell Biol* **18**, 456-466.
- D'Angelo, M. A., Raices, M., Panowski, S. H. and Hetzer, M. W.** (2009). Age-dependent deterioration of nuclear pore complexes causes a loss of nuclear integrity in postmitotic cells. *Cell* **136**, 284-295.
- Danker, T., Schillers, H., Storck, J., Shahin, V., Kramer, B., Wilhelmi, M. and Oberleithner, H.** (1999). Nuclear hourglass technique: an approach that detects electrically open nuclear pores in *Xenopus laevis* oocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13530-13535.
- Das, S. and Rand, R. P.** (1986). Modification by diacylglycerol of the structure and interaction of various phospholipid bilayer membranes. *Biochemistry* **25**, 2882-2889.
- Davis, L. I. and Blobel, G.** (1987). Nuclear pore complex contains a family of glycoproteins that includes p62: glycosylation through a previously unidentified cellular pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 7552-7556.
- Dawson, T. R., Lazarus, M. D., Hetzer, M. W. and Wenthe, S. R.** (2009). ER membrane-bending proteins are necessary for de novo nuclear pore formation. *J Cell Biol* **184**, 659-675.
- De Matteis, M. A. and Godi, A.** (2004). Protein-lipid interactions in membrane trafficking at the Golgi complex. *Biochim Biophys Acta* **1666**, 264-274.
- De Souza, C. P., Osmani, A. H., Hashmi, S. B. and Osmani, S. A.** (2004). Partial nuclear pore complex disassembly during closed mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Curr Biol* **14**, 1973-1984.
- Debler, E. W., Ma, Y., Seo, H. S., Hsia, K. C., Noriega, T. R., Blobel, G. and Hoelz, A.** (2008). A fence-like coat for the nuclear pore membrane. *Mol Cell* **32**, 815-826.
- Dechat, T., Pflieger, K., Sengupta, K., Shimi, T., Shumaker, D. K., Solimando, L. and Goldman, R. D.** (2008). Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes Dev* **22**, 832-853.
- Denning, D. P. and Rexach, M. F.** (2007). Rapid evolution exposes the boundaries of domain structure and function in natively unfolded FG nucleoporins. *Mol Cell Proteomics* **6**, 272-282.
- Deutscher, S. L., Harley, J. B. and Keene, J. D.** (1988). Molecular analysis of the 60-kDa human Ro ribonucleoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 9479-9483.
- Devos, D., Dokudovskaya, S., Alber, F., Williams, R., Chait, B. T., Sali, A. and Rout, M. P.** (2004). Components of coated vesicles and nuclear pore complexes share a common molecular architecture. *PLoS Biol* **2**, e380.
- Devos, D., Dokudovskaya, S., Williams, R., Alber, F., Eswar, N., Chait, B. T., Rout, M. P. and Sali, A.** (2006). Simple fold composition and modular architecture of the nuclear pore complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2172-2177.
- Di Paolo, G. and De Camilli, P.** (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **443**, 651-657.
- Dickenson, N. E., Moore, D., Suprenant, K. A. and Dunn, R. C.** (2007). Vault ribonucleoprotein particles and the central mass of the nuclear pore complex. *Photochem Photobiol* **83**, 686-691.
- Drummond, S. P., Rutherford, S. A., Sanderson, H. S. and Allen, T. D.** (2006). High resolution analysis of mammalian nuclear structure throughout the cell cycle: implications for nuclear pore complex assembly during interphase and mitosis. *Can J Physiol Pharmacol* **84**, 423-430.
- Dultz, E., Zanin, E., Wurzenberger, C., Braun, M., Rabut, G., Sironi, L. and Ellenberg, J.** (2008). Systematic kinetic analysis of mitotic dis- and reassembly of the nuclear pore in living cells. *J Cell Biol* **180**, 857-865.
- Dultz, E., Huet, S. and Ellenberg, J.** (2009). Formation of the nuclear envelope permeability barrier studied by sequential photoswitching and flux analysis. *Biophys J* **97**, 1891-1897.
- Echard, A., Jollivet, F., Martinez, O., Lacapere, J. J., Rousselet, A., Janoueix-Lerosey, I. and Goud, B.** (1998). Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6. *Science* **279**, 580-585.

- Edouard, T., Montagner, A., Dance, M., Conte, F., Yart, A., Parfait, B., Tauber, M., Salles, J. P. and Raynal, P.** (2007). How do Shp2 mutations that oppositely influence its biochemical activity result in syndromes with overlapping symptoms? *Cell Mol Life Sci* **64**, 1585-1590.
- Ehrnsperger, C. and Volkhardt, W.** (2001). Major vault protein is a substrate of endogenous protein kinases in CHO and PC12 cells. *Biol Chem* **382**, 1463-1471.
- Eichenmüller, B., Kedersha, N., Solovyeva, E., Everley, P., Lang, J., Himes, R. H. and Suprenant, K. A.** (2003). Vaults bind directly to microtubules via their caps and not their barrels. *Cell Motil Cytoskeleton* **56**, 225-236.
- Elad, N., Maimon, T., Frenkiel-Krispin, D., Lim, R. Y. and Medalia, O.** (2009). Structural analysis of the nuclear pore complex by integrated approaches. *Curr Opin Struct Biol* **19**, 226-232.
- Ellenberg, J., Siggia, E. D., Moreira, J. E., Smith, C. L., Presley, J. F., Worman, H. J. and Lippincott-Schwartz, J.** (1997). Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis. *J Cell Biol* **138**, 1193-1206.
- Ellenberg, J. and Lippincott-Schwartz, J.** (1999). Dynamics and mobility of nuclear envelope proteins in interphase and mitotic cells revealed by green fluorescent protein chimeras. *Methods* **19**, 362-372.
- Emre, N., Raval-Fernandes, S., Kickhoefer, V. A. and Rome, L. H.** (2004). Analysis of MVP and VPARP promoters indicates a role for chromatin remodeling in the regulation of MVP. *Biochim Biophys Acta* **1678**, 33-46.
- Enss, K., Danker, T., Schlune, A., Buchholz, I. and Oberleithner, H.** (2003). Passive transport of macromolecules through *Xenopus laevis* nuclear envelope. *J Membr Biol* **196**, 147-155.
- Ewald, A., Kossner, U., Scheer, U. and Dabauvalle, M. C.** (1996). A biochemical and immunological comparison of nuclear and cytoplasmic pore complexes. *J Cell Sci* **109 ( Pt 7)**, 1813-1824.
- Ewald, A., Hofbauer, S., Dabauvalle, M. C. and Lourim, D.** (1997). Preassembly of annulate lamellae in egg extracts inhibits nuclear pore complex formation, but not nuclear membrane assembly. *Eur J Cell Biol* **73**, 259-269.
- Ewald, A., Zunkler, C., Lourim, D. and Dabauvalle, M. C.** (2001). Microtubule-dependent assembly of the nuclear envelope in *Xenopus laevis* egg extract. *Eur J Cell Biol* **80**, 678-691.
- Fahrenkrog, B. and Aebi, U.** (2003). The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 757-766.
- Farsad, K., Ringstad, N., Takei, K., Floyd, S. R., Rose, K. and De Camilli, P.** (2001). Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions. *J Cell Biol* **155**, 193-200.
- Favreau, C., Worman, H. J., Wozniak, R. W., Frappier, T. and Courvalin, J. C.** (1996). Cell cycle-dependent phosphorylation of nucleoporins and nuclear pore membrane protein Gp210. *Biochemistry* **35**, 8035-8044.
- Feuerbach, F., Galy, V., Trelles-Sticken, E., Fromont-Racine, M., Jacquier, A., Gilson, E., Olivo-Marin, J. C., Scherthan, H. and Nehrbass, U.** (2002). Nuclear architecture and spatial positioning help establish transcriptional states of telomeres in yeast. *Nat Cell Biol* **4**, 214-221.
- Foisner, R.** (2001). Inner nuclear membrane proteins and the nuclear lamina. *J Cell Sci* **114**, 3791-3792.
- Fontijn, R. D., Goud, B., Echard, A., Jollivet, F., van Marle, J., Pannekoek, H. and Horrevoets, A. J.** (2001). The human kinesin-like protein RB6K is under tight cell cycle control and is essential for cytokinesis. *Mol Cell Biol* **21**, 2944-2955.
- Ford, L. P., Shay, J. W. and Wright, W. E.** (2001). The La antigen associates with the human telomerase ribonucleoprotein and influences telomere length in vivo. *RNA* **7**, 1068-1075.
- Franz, C., Walczak, R., Yavuz, S., Santarella, R., Gentzel, M., Askjaer, P., Galy, V., Hetzer, M., Mattaj, I. W. and Antonin, W.** (2007). MEL-28/ELYS is required for the recruitment of nucleoporins to chromatin and postmitotic nuclear pore complex assembly. *EMBO Rep* **8**, 165-172.
- Frey, S., Richter, R. P. and Gorlich, D.** (2006). FG-rich repeats of nuclear pore proteins form a three-dimensional meshwork with hydrogel-like properties. *Science* **314**, 815-817.
- Frey, S. and Gorlich, D.** (2007). A saturated FG-repeat hydrogel can reproduce the permeability properties of nuclear pore complexes. *Cell* **130**, 512-523.
- Frosst, P., Guan, T., Subauste, C., Hahn, K. and Gerace, L.** (2002). Tpr is localized within the nuclear basket of the pore complex and has a role in nuclear protein export. *J Cell Biol* **156**, 617-630.
- Galy, V., Olivo-Marin, J. C., Scherthan, H., Doye, V., Rascalou, N. and Nehrbass, U.** (2000). Nuclear pore complexes in the organization of silent telomeric chromatin. *Nature* **403**, 108-112.

- Galy, V., Askjaer, P., Franz, C., Lopez-Iglesias, C. and Mattaj, I. W.** (2006). MEL-28, a novel nuclear-envelope and kinetochore protein essential for zygotic nuclear-envelope assembly in *C. elegans*. *Curr Biol* **16**, 1748-1756.
- Gant, T. M. and Wilson, K. L.** (1997). Nuclear assembly. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 669-695.
- Garnier-Lhomme, M., Byrne, R. D., Hobday, T. M., Gschmeissner, S., Woscholski, R., Poccia, D. L., Dufourc, E. J. and Larijani, B.** (2009). Nuclear envelope remnants: fluid membranes enriched in sterols and polyphosphoinositides. *PLoS One* **4**, e4255.
- Georgatos, S. D., Pyrasopoulou, A. and Theodoropoulos, P. A.** (1997). Nuclear envelope breakdown in mammalian cells involves stepwise lamina disassembly and microtubule-drive deformation of the nuclear membrane. *J Cell Sci* **110 (Pt 17)**, 2129-2140.
- Gerace, L. and Blobel, G.** (1980). The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell* **19**, 277-287.
- Gerace, L. and Burke, B.** (1988). Functional organization of the nuclear envelope. *Annu Rev Cell Biol* **4**, 335-374.
- Gillespie, P. J., Khoudoli, G. A., Stewart, G., Swedlow, J. R. and Blow, J. J.** (2007). ELYS/MEL-28 chromatin association coordinates nuclear pore complex assembly and replication licensing. *Curr Biol* **17**, 1657-1662.
- Glavy, J. S., Krutchinsky, A. N., Cristea, I. M., Berke, I. C., Boehmer, T., Blobel, G. and Chait, B. T.** (2007). Cell-cycle-dependent phosphorylation of the nuclear pore Nup107-160 subcomplex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3811-3816.
- Goldberg, M. W., Wiese, C., Allen, T. D. and Wilson, K. L.** (1997). Dimples, pores, star-rings, and thin rings on growing nuclear envelopes: evidence for structural intermediates in nuclear pore complex assembly. *J Cell Sci* **110 (Pt 4)**, 409-420.
- Gonczy, P., Pichler, S., Kirkham, M. and Hyman, A. A.** (1999). Cytoplasmic dynein is required for distinct aspects of MTOC positioning, including centrosome separation, in the one cell stage *Caenorhabditis elegans* embryo. *J Cell Biol* **147**, 135-150.
- Gorjanacz, M., Klerkx, E. P., Galy, V., Santarella, R., Lopez-Iglesias, C., Askjaer, P. and Mattaj, I. W.** (2007). *Caenorhabditis elegans* BAF-1 and its kinase VRK-1 participate directly in post-mitotic nuclear envelope assembly. *EMBO J* **26**, 132-143.
- Gorlich, D. and Kutay, U.** (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 607-660.
- Griffis, E. R., Altan, N., Lippincott-Schwartz, J. and Powers, M. A.** (2002). Nup98 is a mobile nucleoporin with transcription-dependent dynamics. *Mol Biol Cell* **13**, 1282-1297.
- Griffis, E. R., Craige, B., Dimaano, C., Ullman, K. S. and Powers, M. A.** (2004). Distinct functional domains within nucleoporins Nup153 and Nup98 mediate transcription-dependent mobility. *Mol Biol Cell* **15**, 1991-2002.
- Gruenbaum, Y., Margalit, A., Goldman, R. D., Shumaker, D. K. and Wilson, K. L.** (2005). The nuclear lamina comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 21-31.
- Gruneberg, U., Neef, R., Honda, R., Nigg, E. A. and Barr, F. A.** (2004). Relocation of Aurora B from centromeres to the central spindle at the metaphase to anaphase transition requires MKlp2. *J Cell Biol* **166**, 167-172.
- Guttinger, S., Laurell, E. and Kutay, U.** (2009). Orchestrating nuclear envelope disassembly and reassembly during mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 178-191.
- Hamill, D. R. and Suprenant, K. A.** (1997). Characterization of the sea urchin major vault protein: a possible role for vault ribonucleoprotein particles in nucleocytoplasmic transport. *Dev Biol* **190**, 117-128.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Handa, N., Kukimoto-Niino, M., Akasaka, R., Kishishita, S., Murayama, K., Terada, T., Inoue, M., Kigawa, T., Kose, S., Imamoto, N. et al.** (2006). The crystal structure of mouse Nup35 reveals atypical RNP motifs and novel homodimerization of the RRM domain. *J Mol Biol* **363**, 114-124.
- Harel, A., Chan, R. C., Lachish-Zalait, A., Zimmerman, E., Elbaum, M. and Forbes, D. J.** (2003). Importin beta negatively regulates nuclear membrane fusion and nuclear pore complex assembly. *Mol Biol Cell* **14**, 4387-4396.
- Harrington, L., McPhail, T., Mar, V., Zhou, W., Oulton, R., Bass, M. B., Arruda, I. and Robinson, M. O.** (1997). A mammalian telomerase-associated protein. *Science* **275**, 973-977.

- Hase, M. E. and Cordes, V. C.** (2003). Direct interaction with nup153 mediates binding of Tpr to the periphery of the nuclear pore complex. *Mol Biol Cell* **14**, 1923-1940.
- Hassa, P. O. and Hottiger, M. O.** (2008). The diverse biological roles of mammalian PARPs, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases. *Front Biosci* **13**, 3046-3082.
- Hawryluk-Gara, L. A., Platani, M., Santarella, R., Wozniak, R. W. and Mattaj, I. W.** (2008). Nup53 is required for nuclear envelope and nuclear pore complex assembly. *Mol Biol Cell* **19**, 1753-1762.
- Hebbar, S., Mesngon, M. T., Guillotte, A. M., Desai, B., Ayala, R. and Smith, D. S.** (2008). Lis1 and Ndel1 influence the timing of nuclear envelope breakdown in neural stem cells. *J Cell Biol* **182**, 1063-1071.
- Herlevsen, M., Oxford, G., Owens, C. R., Conaway, M. and Theodorescu, D.** (2007). Depletion of major vault protein increases doxorubicin sensitivity and nuclear accumulation and disrupts its sequestration in lysosomes. *Mol Cancer Ther* **6**, 1804-1813.
- Herrmann, C., Volkandt, W., Wittich, B., Kellner, R. and Zimmermann, H.** (1996). The major vault protein (MVP100) is contained in cholinergic nerve terminals of electric ray electric organ. *J Biol Chem* **271**, 13908-13915.
- Herrmann, C., Zimmermann, H. and Volkandt, W.** (1997). Analysis of a cDNA encoding the major vault protein from the electric ray *Discopyge ommata*. *Gene* **188**, 85-90.
- Herrmann, C., Kellner, R. and Volkandt, W.** (1998). Major vault protein of electric ray is a phosphoprotein. *Neurochem Res* **23**, 39-46.
- Herrmann, C., Golkaramnay, E., Inman, E., Rome, L. and Volkandt, W.** (1999). Recombinant major vault protein is targeted to neuritic tips of PC12 cells. *J Cell Biol* **144**, 1163-1172.
- Hetzer, M., Meyer, H. H., Walther, T. C., Bilbao-Cortes, D., Warren, G. and Mattaj, I. W.** (2001). Distinct AAA-ATPase p97 complexes function in discrete steps of nuclear assembly. *Nat Cell Biol* **3**, 1086-1091.
- Hetzer, M. W., Walther, T. C. and Mattaj, I. W.** (2005). Pushing the envelope: structure, function, and dynamics of the nuclear periphery. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 347-380.
- Hetzer, M. W. and Wente, S. R.** (2009). Border control at the nucleus: biogenesis and organization of the nuclear membrane and pore complexes. *Dev Cell* **17**, 606-616.
- Hiebl-Dirschmied, C. M., Adolf, G. R. and Prohaska, R.** (1991). Isolation and partial characterization of the human erythrocyte band 7 integral membrane protein. *Biochim Biophys Acta* **1065**, 195-202.
- Higa, M. M., Alam, S. L., Sundquist, W. I. and Ullman, K. S.** (2007). Molecular characterization of the Ran-binding zinc finger domain of Nup153. *J Biol Chem* **282**, 17090-17100.
- Hill, E., Clarke, M. and Barr, F. A.** (2000). The Rab6-binding kinesin, Rab6-KIFL, is required for cytokinesis. *EMBO J* **19**, 5711-5719.
- Hinshaw, J. E., Carragher, B. O. and Milligan, R. A.** (1992). Architecture and design of the nuclear pore complex. *Cell* **69**, 1133-1141.
- Holzmann, K., Ambrosch, I., Elbling, L., Micksche, M. and Berger, W.** (2001). A small upstream open reading frame causes inhibition of human major vault protein expression from a ubiquitous mRNA splice variant. *FEBS Lett* **494**, 99-104.
- Hsia, K. C., Stavropoulos, P., Blobel, G. and Hoelz, A.** (2007). Architecture of a coat for the nuclear pore membrane. *Cell* **131**, 1313-1326.
- Hu, J., Shibata, Y., Voss, C., Shemesh, T., Li, Z., Coughlin, M., Kozlov, M. M., Rapoport, T. A. and Prinz, W. A.** (2008). Membrane proteins of the endoplasmic reticulum induce high-curvature tubules. *Science* **319**, 1247-1250.
- Huffman, K. E. and Corey, D. R.** (2005). Major vault protein does not play a role in chemoresistance or drug localization in a non-small cell lung cancer cell line. *Biochemistry* **44**, 2253-2261.
- Ishii, K., Arib, G., Lin, C., Van Houwe, G. and Laemmli, U. K.** (2002). Chromatin boundaries in budding yeast: the nuclear pore connection. *Cell* **109**, 551-562.
- Izquierdo, M. A., Scheffer, G. L., Flens, M. J., Shoemaker, R. H., Rome, L. H. and Scheper, R. J.** (1996). Relationship of LRP-human major vault protein to in vitro and clinical resistance to anticancer drugs. *Cytotechnology* **19**, 191-197.
- Jahn, R., Lang, T. and Sudhof, T. C.** (2003). Membrane fusion. *Cell* **112**, 519-533.
- Jeady, S. and Schwartz, T. U.** (2007). Crystal structure of nucleoporin Nic96 reveals a novel, intricate helical domain architecture. *J Biol Chem* **282**, 34904-34912.
- Jia, J., Han, Q., Borregaard, N., Lollike, K. and Cygler, M.** (2000). Crystal structure of human grancalcin, a member of the penta-EF-hand protein family. *J Mol Biol* **300**, 1271-1281.

- Joseph, J., Tan, S. H., Karpova, T. S., McNally, J. G. and Dasso, M.** (2002). SUMO-1 targets RanGAP1 to kinetochores and mitotic spindles. *J Cell Biol* **156**, 595-602.
- Joseph, J., Liu, S. T., Jablonski, S. A., Yen, T. J. and Dasso, M.** (2004). The RanGAP1-RanBP2 complex is essential for microtubule-kinetochore interactions in vivo. *Curr Biol* **14**, 611-617.
- Joseph, J. and Dasso, M.** (2008). The nucleoporin Nup358 associates with and regulates interphase microtubules. *FEBS Lett* **582**, 190-196.
- Joshi, H. C.** (1998). Microtubule dynamics in living cells. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 35-44.
- Jun, Y., Fratti, R. A. and Wickner, W.** (2004). Diacylglycerol and its formation by phospholipase C regulate Rab- and SNARE-dependent yeast vacuole fusion. *J Biol Chem* **279**, 53186-53195.
- Kalverda, B. and Fornerod, M.** (2007). The nuclear life of nucleoporins. *Dev Cell* **13**, 164-165.
- Kalverda, B., Roling, M. D. and Fornerod, M.** (2008). Chromatin organization in relation to the nuclear periphery. *FEBS Lett* **582**, 2017-2022.
- Kamal, A. and Goldstein, L. S.** (2002). Principles of cargo attachment to cytoplasmic motor proteins. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 63-68.
- Kampmann, M. and Blobel, G.** (2009). Three-dimensional structure and flexibility of a membrane-coating module of the nuclear pore complex. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 782-788.
- Kang, D., Ghong, Y.S., Shu, M. and Kang, C.** (2002). Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bull Korean Chem Soc* **23**, 1511-1512.
- Kapitein, L. C., Peterman, E. J., Kwok, B. H., Kim, J. H., Kapoor, T. M. and Schmidt, C. F.** (2005). The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it crosslinks. *Nature* **435**, 114-118.
- Karcher, R. L., Deacon, S. W. and Gelfand, V. I.** (2002). Motor-cargo interactions: the key to transport specificity. *Trends Cell Biol* **12**, 21-27.
- Karsenti, E., Newport, J., Hubble, R. and Kirschner, M.** (1984). Interconversion of metaphase and interphase microtubule arrays, as studied by the injection of centrosomes and nuclei into *Xenopus* eggs. *J Cell Biol* **98**, 1730-1745.
- Kashina, A. S., Baskin, R. J., Cole, D. G., Wedaman, K. P., Saxton, W. M. and Scholey, J. M.** (1996). A bipolar kinesin. *Nature* **379**, 270-272.
- Kato, K., Tanaka, H., Sumizawa, T., Yoshimura, M., Yamashita, E., Iwasaki, K. and Tsukihara, T.** (2008). A vault ribonucleoprotein particle exhibiting 39-fold dihedral symmetry. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **64**, 525-531.
- Kau, T. R., Way, J. C. and Silver, P. A.** (2004). Nuclear transport and cancer: from mechanism to intervention. *Nat Rev Cancer* **4**, 106-117.
- Kedersha, N. L. and Rome, L. H.** (1986 a). Preparative agarose gel electrophoresis for the purification of small organelles and particles. *Anal Biochem* **156**, 161-170.
- Kedersha, N. L. and Rome, L. H.** (1986 b). Isolation and characterization of a novel ribonucleoprotein particle: large structures contain a single species of small RNA. *J Cell Biol* **103**, 699-709.
- Kedersha, N. L., Miquel, M. C., Bittner, D. and Rome, L. H.** (1990). Vaults. II. Ribonucleoprotein structures are highly conserved among higher and lower eukaryotes. *J Cell Biol* **110**, 895-901.
- Kedersha, N. L., Heuser, J. E., Chugani, D. C. and Rome, L. H.** (1991). Vaults. III. Vault ribonucleoprotein particles open into flower-like structures with octagonal symmetry. *J Cell Biol* **112**, 225-235.
- Kerscher, O., Hieter, P., Winey, M. and Basrai, M. A.** (2001). Novel role for a *Saccharomyces cerevisiae* nucleoporin, Nup170p, in chromosome segregation. *Genetics* **157**, 1543-1553.
- Kessel, R. G.** (1992). Annulate lamellae: a last frontier in cellular organelles. *Int Rev Cytol* **133**, 43-120.
- Kickhoefer, V. A., Searles, R. P., Kedersha, N. L., Garber, M. E., Johnson, D. L. and Rome, L. H.** (1993). Vault ribonucleoprotein particles from rat and bullfrog contain a related small RNA that is transcribed by RNA polymerase III. *J Biol Chem* **268**, 7868-7873.
- Kickhoefer, V. A. and Rome, L. H.** (1994). The sequence of a cDNA encoding the major vault protein from *Rattus norvegicus*. *Gene* **151**, 257-260.
- Kickhoefer, V. A., Vasu, S. K. and Rome, L. H.** (1996). Vaults are the answer, what is the question? *Trends Cell Biol* **6**, 174-178.
- Kickhoefer, V. A., Rajavel, K. S., Scheffer, G. L., Dalton, W. S., Schepers, R. J. and Rome, L. H.** (1998). Vaults are up-regulated in multidrug-resistant cancer cell lines. *J Biol Chem* **273**, 8971-8974.
- Kickhoefer, V. A., Stephen, A. G., Harrington, L., Robinson, M. O. and Rome, L. H.** (1999 a). Vaults and telomerase share a common subunit, TEP1. *J Biol Chem* **274**, 32712-32717.

- Kickhoefer, V. A., Siva, A. C., Kedersha, N. L., Inman, E. M., Ruland, C., Streuli, M. and Rome, L. H. (1999 b). The 193-kD vault protein, VPARP, is a novel poly(ADP-ribose) polymerase. *J Cell Biol* **146**, 917-928.
- Kickhoefer, V. A., Liu, Y., Kong, L. B., Snow, B. E., Stewart, P. L., Harrington, L. and Rome, L. H. (2001). The Telomerase/vault-associated protein TEP1 is required for vault RNA stability and its association with the vault particle. *J Cell Biol* **152**, 157-164.
- Kickhoefer, V. A., Poderycki, M. J., Chan, E. K. and Rome, L. H. (2002). The La RNA-binding protein interacts with the vault RNA and is a vault-associated protein. *J Biol Chem* **277**, 41282-41286.
- Kickhoefer, V. A., Emre, N., Stephen, A. G., Poderycki, M. J. and Rome, L. H. (2003). Identification of conserved vault RNA expression elements and a non-expressed mouse vault RNA gene. *Gene* **309**, 65-70.
- Kickhoefer, V. A., Garcia, Y., Mikyas, Y., Johansson, E., Zhou, J. C., Raval-Fernandes, S., Minoofar, P., Zink, J. I., Dunn, B., Stewart, P. L. et al. (2005). Engineering of vault nanocapsules with enzymatic and fluorescent properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4348-4352.
- Kim, E., Lee, S., Mian, M. F., Yun, S. U., Song, M., Yi, K. S., Ryu, S. H. and Suh, P. G. (2006). Crosstalk between Src and major vault protein in epidermal growth factor-dependent cell signalling. *FEBS J* **273**, 793-804.
- Kiseleva, E., Goldberg, M. W., Cronshaw, J. and Allen, T. D. (2000). The nuclear pore complex: structure, function, and dynamics. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **10**, 101-112.
- Kiseleva, E., Rutherford, S., Cotter, L. M., Allen, T. D. and Goldberg, M. W. (2001). Steps of nuclear pore complex disassembly and reassembly during mitosis in early Drosophila embryos. *J Cell Sci* **114**, 3607-3618.
- Kiseleva, E., Rutherford, S., Cotter, L. M., Allen, T. D. and Goldberg, M. W. (2001). Steps of nuclear pore complex disassembly and reassembly during mitosis in early Drosophila embryos. *J Cell Sci* **114**, 3607-3618.
- Kitazono, M., Sumizawa, T., Takebayashi, Y., Chen, Z. S., Furukawa, T., Nagayama, S., Tani, A., Takao, S., Aikou, T. and Akiyama, S. (1999). Multidrug resistance and the lung resistance-related protein in human colon carcinoma SW-620 cells. *J Natl Cancer Inst* **91**, 1647-1653.
- Kitazono, M., Okumura, H., Ikeda, R., Sumizawa, T., Furukawa, T., Nagayama, S., Seto, K., Aikou, T. and Akiyama, S. (2001). Reversal of LRP-associated drug resistance in colon carcinoma SW-620 cells. *Int J Cancer* **91**, 126-131.
- Kobe, B. and Kajava, A. V. (2000). When protein folding is simplified to protein coiling: the continuum of solenoid protein structures. *Trends Biochem Sci* **25**, 509-515.
- Kolli, S., Zito, C. I., Mossink, M. H., Wiemer, E. A. and Bennett, A. M. (2004). The major vault protein is a novel substrate for the tyrosine phosphatase SHP-2 and scaffold protein in epidermal growth factor signaling. *J Biol Chem* **279**, 29374-29385.
- Kong, L. B., Siva, A. C., Rome, L. H. and Stewart, P. L. (1999). Structure of the vault, a ubiquitous cellular component. *Structure* **7**, 371-379.
- Kong, L. B., Siva, A. C., Kickhoefer, V. A., Rome, L. H. and Stewart, P. L. (2000). RNA location and modeling of a WD40 repeat domain within the vault. *RNA* **6**, 890-900.
- Koonin, E. V. and Aravind, L. (2000). The NACHT family - a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation. *Trends Biochem Sci* **25**, 223-224.
- Kowalski, M. P., Dubouix-Bourandy, A., Bajmoczy, M., Golan, D. E., Zaidi, T., Coutinho-Sledge, Y. S., Gygi, M. P., Gygi, S. P., Wiemer, E. A. and Pier, G. B. (2007). Host resistance to lung infection mediated by major vault protein in epithelial cells. *Science* **317**, 130-132.
- Kozlov, G., Vavelyuk, O., Minailiuc, O., Banville, D., Gehring, K. and Ekiel, I. (2006). Solution structure of a two-repeat fragment of major vault protein. *J Mol Biol* **356**, 444-452.
- Kozlovsky, Y. and Kozlov, M. M. (2002). Stalk model of membrane fusion: solution of energy crisis. *Biophys J* **82**, 882-895.
- Kramer, A., Ludwig, Y., Shahin, V. and Oberleithner, H. (2007). A pathway separate from the central channel through the nuclear pore complex for inorganic ions and small macromolecules. *J Biol Chem* **282**, 31437-31443.
- Kremer, L., Dominguez, J. E. and Avila, J. (1988). Detection of tubulin-binding proteins by an overlay assay. *Anal Biochem* **175**, 91-95.
- Krishnan, V. V., Lau, E. Y., Yamada, J., Denning, D. P., Patel, S. S., Colvin, M. E. and Rexach, M. F. (2008). Intramolecular cohesion of coils mediated by phenylalanine--glycine motifs in the natively unfolded domain of a nucleoporin. *PLoS Comput Biol* **4**, e1000145.

- Krull, S., Thyberg, J., Bjorkroth, B., Rackwitz, H. R. and Cordes, V. C.** (2004). Nucleoporins as components of the nuclear pore complex core structure and Tpr as the architectural element of the nuclear basket. *Mol Biol Cell* **15**, 4261-4277.
- Kyhse-Andersen, J.** (1984). Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**, 203-209.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lambright, D. G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N. P., Hamm, H. E. and Sigler, P. B.** (1996). The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* **379**, 311-319.
- Landsverk, H. B., Kirkhus, M., Bollen, M., Kuntziger, T. and Collas, P.** (2005). PNUTS enhances in vitro chromosome decondensation in a PP1-dependent manner. *Biochem J* **390**, 709-717.
- Lange, C., Walther, W., Schwabe, H. and Stein, U.** (2000). Cloning and initial analysis of the human multidrug resistance-related MVP/LRP gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun* **278**, 125-133.
- Larijani, B., Poccia, D. L. and Dickinson, L. C.** (2000). Phospholipid identification and quantification of membrane vesicle subfractions by 31P-1H two-dimensional nuclear magnetic resonance. *Lipids* **35**, 1289-1297.
- Larijani, B., Barona, T. M. and Poccia, D. L.** (2001). Role for phosphatidylinositol in nuclear envelope formation. *Biochem J* **356**, 495-501.
- Larijani, B. and Dufourc, E. J.** (2006). Polyunsaturated phosphatidylinositol and diacylglycerol substantially modify the fluidity and polymorphism of biomembranes: a solid-state deuterium NMR study. *Lipids* **41**, 925-932.
- Larijani, B. and Poccia, D. L.** (2007). Protein and lipid signaling in membrane fusion: nuclear envelope assembly. *Signal Transduction* **7**, 142-153.
- Larijani, B. and Poccia, D. L.** (2009). Nuclear envelope formation: mind the gaps. *Annu Rev Biophys* **38**, 107-124.
- Lau, C. K., Delmar, V. A., Chan, R. C., Phung, Q., Bernis, C., Fichtman, B., Rasala, B. A. and Forbes, D. J.** (2009). Transportin regulates major mitotic assembly events: from spindle to nuclear pore assembly. *Mol Biol Cell* **20**, 4043-4058.
- Laurencot, C. M., Scheffer, G. L., Scheper, R. J. and Shoemaker, R. H.** (1997). Increased LRP mRNA expression is associated with the MDR phenotype in intrinsically resistant human cancer cell lines. *Int J Cancer* **72**, 1021-1026.
- Lee, K. K., Gruenbaum, Y., Spann, P., Liu, J. and Wilson, K. L.** (2000). C. elegans nuclear envelope proteins emerin, MAN1, lamin, and nucleoporins reveal unique timing of nuclear envelope breakdown during mitosis. *Mol Biol Cell* **11**, 3089-3099.
- Leksa, N. C., Brohawn, S. G. and Schwartz, T. U.** (2009). The structure of the scaffold nucleoporin Nup120 reveals a new and unexpected domain architecture. *Structure* **17**, 1082-1091.
- Lewis, S. A., Tian, G. and Cowan, N. J.** (1997). The alpha- and beta-tubulin folding pathways. *Trends Cell Biol* **7**, 479-484.
- Li, J. Y., Volkandt, W., Dahlstrom, A., Herrmann, C., Blasi, J., Das, B. and Zimmermann, H.** (1999). Axonal transport of ribonucleoprotein particles (vaults). *Neuroscience* **91**, 1055-1065.
- Liang, P. and MacRae, T. H.** (1997). Molecular chaperones and the cytoskeleton. *J Cell Sci* **110** (Pt 13), 1431-1440.
- Lim, R. Y. and Fahrenkrog, B.** (2006). The nuclear pore complex up close. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 342-347.
- Lim, R. Y., Ullman, K. S. and Fahrenkrog, B.** (2008). Biology and biophysics of the nuclear pore complex and its components. *Int Rev Cell Mol Biol* **267**, 299-342.
- Lim, R. Y., Aebi, U. and Fahrenkrog, B.** (2008). Towards reconciling structure and function in the nuclear pore complex. *Histochem Cell Biol* **129**, 105-116.
- Liu, J., Prunuske, A. J., Fager, A. M. and Ullman, K. S.** (2003). The COPI complex functions in nuclear envelope breakdown and is recruited by the nucleoporin Nup153. *Dev Cell* **5**, 487-498.
- Liu, Y., Snow, B. E., Kickhoefer, V. A., Erdmann, N., Zhou, W., Wakeham, A., Gomez, M., Rome, L. H. and Harrington, L.** (2004). Vault poly(ADP-ribose) polymerase is associated with mammalian telomerase and is dispensable for telomerase function and vault structure in vivo. *Mol Cell Biol* **24**, 5314-5323.
- Liu, S. M. and Stewart, M.** (2005). Structural basis for the high-affinity binding of nucleoporin Nup1p to the *Saccharomyces cerevisiae* importin-beta homologue, Kap95p. *J Mol Biol* **349**, 515-525.

- Liu, Q., Pante, N., Misteli, T., Elsagga, M., Crisp, M., Hodzic, D., Burke, B. and Roux, K. J.** (2007). Functional association of Sun1 with nuclear pore complexes. *J Cell Biol* **178**, 785-798.
- Liodice, I., Alves, A., Rabut, G., Van Overbeek, M., Ellenberg, J., Sibarita, J. B. and Doye, V.** (2004). The entire Nup107-160 complex, including three new members, is targeted as one entity to kinetochores in mitosis. *Mol Biol Cell* **15**, 3333-3344.
- Lowthert, L. A., Ku, N. O., Liao, J., Coulombe, P. A. and Omary, M. B.** (1995). Empigen BB: a useful detergent for solubilization and biochemical analysis of keratins. *Biochem Biophys Res Commun* **206**, 370-379.
- Luby-Phelps, K., Castle, P. E., Taylor, D. L. and Lanni, F.** (1987). Hindered diffusion of inert tracer particles in the cytoplasm of mouse 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 4910-4913.
- Luby-Phelps, K.** (2000). Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area. *Int Rev Cytol* **192**, 189-221.
- Lupu, F., Alves, A., Anderson, K., Doye, V. and Lacy, E.** (2008). Nuclear pore composition regulates neural stem/progenitor cell differentiation in the mouse embryo. *Dev Cell* **14**, 831-842.
- Lusk, C. P., Makhnevych, T., Marelli, M., Aitchison, J. D. and Wozniak, R. W.** (2002). Karyopherins in nuclear pore biogenesis: a role for Kap121p in the assembly of Nup53p into nuclear pore complexes. *J Cell Biol* **159**, 267-278.
- Lusk, C. P., Waller, D. D., Makhnevych, T., Dienemann, A., Whiteway, M., Thomas, D. Y. and Wozniak, R. W.** (2007). Nup53p is a target of two mitotic kinases, Cdk1p and Hrr25p. *Traffic* **8**, 647-660.
- Luthra, R., Kerr, S. C., Harreman, M. T., Apponi, L. H., Fasken, M. B., Ramineni, S., Chaurasia, S., Valentini, S. R. and Corbett, A. H.** (2007). Actively transcribed GAL genes can be physically linked to the nuclear pore by the SAGA chromatin modifying complex. *J Biol Chem* **282**, 3042-3049.
- Lutzmann, M., Kunze, R., Buerer, A., Aebi, U. and Hurt, E.** (2002). Modular self-assembly of a Y-shaped multiprotein complex from seven nucleoporins. *EMBO J* **21**, 387-397.
- Macara, I. G.** (2001). Transport into and out of the nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**, 570-594, table of contents.
- Macaulay, C., Meier, E. and Forbes, D. J.** (1995). Differential mitotic phosphorylation of proteins of the nuclear pore complex. *J Biol Chem* **270**, 254-262.
- Macaulay, C. and Forbes, D. J.** (1996). Assembly of the nuclear pore: biochemically distinct steps revealed with NEM, GTP gamma S, and BAPTA. *J Cell Biol* **132**, 5-20.
- Madrid, A. S., Mancuso, J., Cande, W. Z. and Weis, K.** (2006). The role of the integral membrane nucleoporins Ndc1p and Pom152p in nuclear pore complex assembly and function. *J Cell Biol* **173**, 361-371.
- Maehama, T. and Dixon, J. E.** (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* **273**, 13375-13378.
- Maeshima, K., Yahata, K., Sasaki, Y., Nakatomi, R., Tachibana, T., Hashikawa, T., Imamoto, F. and Imamoto, N.** (2006). Cell-cycle-dependent dynamics of nuclear pores: pore-free islands and lamins. *J Cell Sci* **119**, 4442-4451.
- Makio, T., Stanton, L. H., Lin, C. C., Goldfarb, D. S., Weis, K. and Wozniak, R. W.** (2009). The nucleoporins Nup170p and Nup157p are essential for nuclear pore complex assembly. *J Cell Biol* **185**, 459-473.
- Mansfeld, J., Guttinger, S., Hawryluk-Gara, L. A., Pante, N., Mall, M., Galy, V., Haselmann, U., Muhlhauser, P., Wozniak, R. W., Mattaj, I. W. et al.** (2006). The conserved transmembrane nucleoporin NDC1 is required for nuclear pore complex assembly in vertebrate cells. *Mol Cell* **22**, 93-103.
- Maraia, R. J. and Intine, R. V.** (2001). Recognition of nascent RNA by the human La antigen: conserved and divergent features of structure and function. *Mol Cell Biol* **21**, 367-379.
- Maraia, R. J. and Intine, R. V.** (2002). La protein and its associated small nuclear and nucleolar precursor RNAs. *Gene Expr* **10**, 41-57.
- Maraia, R. J. and Bayfield, M. A.** (2006). The La protein-RNA complex surfaces. *Mol Cell* **21**, 149-152.
- Markin, V. S., Kozlov, M. M. and Borovjagin, V. L.** (1984). On the theory of membrane fusion. The stalk mechanism. *Gen Physiol Biophys* **3**, 361-377.
- Matsuoka, Y., Takagi, M., Ban, T., Miyazaki, M., Yamamoto, T., Kondo, Y. and Yoneda, Y.** (1999). Identification and characterization of nuclear pore subcomplexes in mitotic extract of human somatic cells. *Biochem Biophys Res Commun* **254**, 417-423.
- Matunis, M. J., Wu, J. and Blobel, G.** (1998). SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex. *J Cell Biol* **140**, 499-509.

- Maul, G. G.** (1977). Nuclear pore complexes. Elimination and reconstruction during mitosis. *J Cell Biol* **74**, 492-500.
- Mazzanti, M., Bustamante, J. O. and Oberleithner, H.** (2001). Electrical dimension of the nuclear envelope. *Physiol Rev* **81**, 1-19.
- Menon, B. B., Sarma, N. J., Pasula, S., Deminoff, S. J., Willis, K. A., Barbara, K. E., Andrews, B. and Santangelo, G. M.** (2005). Reverse recruitment: the Nup84 nuclear pore subcomplex mediates Rap1/Gcr1/Gcr2 transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 5749-5754.
- Meschini, S., Marra, M., Calcabrini, A., Monti, E., Gariboldi, M., Dolfini, E. and Arancia, G.** (2002). Role of the lung resistance-related protein (LRP) in the drug sensitivity of cultured tumor cells. *Toxicol In Vitro* **16**, 389-398.
- Mikyas, Y., Makabi, M., Raval-Fernandes, S., Harrington, L., Kickhoefer, V. A., Rome, L. H. and Stewart, P. L.** (2004). Cryoelectron microscopy imaging of recombinant and tissue derived vaults: localization of the MVP N termini and VPARP. *J Mol Biol* **344**, 91-105.
- Miller, M. W., Caracciolo, M. R., Berlin, W. K. and Hanover, J. A.** (1999). Phosphorylation and glycosylation of nucleoporins. *Arch Biochem Biophys* **367**, 51-60.
- Minaguchi, T., Waite, K. A. and Eng, C.** (2006). Nuclear localization of PTEN is regulated by Ca(2+) through a tyrosil phosphorylation-independent conformational modification in major vault protein. *Cancer Res* **66**, 11677-11682.
- Mossink, M., van Zon, A., Franzel-Luiten, E., Schoester, M., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., Sonneveld, P. and Wiemer, E. A.** (2002). The genomic sequence of the murine major vault protein and its promoter. *Gene* **294**, 225-232.
- Mossink, M. H., van Zon, A., Franzel-Luiten, E., Schoester, M., Kickhoefer, V. A., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., Sonneveld, P. and Wiemer, E. A.** (2002). Disruption of the murine major vault protein (MVP/LRP) gene does not induce hypersensitivity to cytostatics. *Cancer Res* **62**, 7298-7304.
- Mossink, M. H., van Zon, A., Scheper, R. J., Sonneveld, P. and Wiemer, E. A.** (2003). Vaults: a ribonucleoprotein particle involved in drug resistance? *Oncogene* **22**, 7458-7467.
- Motsch, N., Pfuhl, T., Mrazek, J., Barth, S. and Grasser, F. A.** (2007). Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1) induces the expression of the cellular microRNA miR-146a. *RNA Biol* **4**, 131-137.
- Mrazek, J., Kreutmayer, S. B., Grasser, F. A., Polacek, N. and Huttenhofer, A.** (2007). Subtractive hybridization identifies novel differentially expressed ncRNA species in EBV-infected human B cells. *Nucleic Acids Res* **35**, e73.
- Mueller, P., Rudin, D. O., Tien, H. T. and Wescott, W. C.** (1962). Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. *Nature* **194**, 979-980.
- Muhlhauser, P. and Kutay, U.** (2007). An in vitro nuclear disassembly system reveals a role for the RanGTPase system and microtubule-dependent steps in nuclear envelope breakdown. *J Cell Biol* **178**, 595-610.
- Nandy, C., Mrazek, J., Stoiber, H., Grasser, F. A., Huttenhofer, A. and Polacek, N.** (2009). Epstein-barr virus-induced expression of a novel human vault RNA. *J Mol Biol* **388**, 776-784.
- Neef, R., Preisinger, C., Sutcliffe, J., Kopajtich, R., Nigg, E. A., Mayer, T. U. and Barr, F. A.** (2003). Phosphorylation of mitotic kinesin-like protein 2 by polo-like kinase 1 is required for cytokinesis. *J Cell Biol* **162**, 863-875.
- Neef, R., Klein, U. R., Kopajtich, R. and Barr, F. A.** (2006). Cooperation between mitotic kinesins controls the late stages of cytokinesis. *Curr Biol* **16**, 301-307.
- Newmeyer, D. D. and Wilson, K. L.** (1991). Egg extracts for nuclear import and nuclear assembly reactions. *Methods Cell Biol* **36**, 607-634.
- Newport, J.** (1987). Nuclear reconstitution in vitro: stages of assembly around protein-free DNA. *Cell* **48**, 205-217.
- Newport, J. W., Wilson, K. L. and Dunphy, W. G.** (1990). A lamin-independent pathway for nuclear envelope assembly. *J Cell Biol* **111**, 2247-2259.
- Newport, J. and Dunphy, W.** (1992). Characterization of the membrane binding and fusion events during nuclear envelope assembly using purified components. *J Cell Biol* **116**, 295-306.
- Nousiainen, M., Sillje, H. H., Sauer, G., Nigg, E. A. and Korner, R.** (2006). Phosphoproteome analysis of the human mitotic spindle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 5391-5396.
- Oke, Y. and Inoue, A.** (2003). The interaction of two classes of nuclear vesicles is induced by the dissociation of soluble proteins from one class of vesicles. *Biol Cell* **95**, 87-97.
- Oliver, F. J., Menissier-de Murcia, J. and de Murcia, G.** (1999). Poly(ADP-ribose) polymerase in the cellular response to DNA damage, apoptosis, and disease. *Am J Hum Genet* **64**, 1282-1288.

- Onischenko, E. A., Gubanov, N. V., Kieselbach, T., Kiseleva, E. V. and Hallberg, E.** (2004). Annulate lamellae play only a minor role in the storage of excess nucleoporins in *Drosophila* embryos. *Traffic* **5**, 152-164.
- Onischenko, E. A., Gubanov, N. V., Kiseleva, E. V. and Hallberg, E.** (2005). Cdk1 and okadaic acid-sensitive phosphatases control assembly of nuclear pore complexes in *Drosophila* embryos. *Mol Biol Cell* **16**, 5152-5162.
- Onischenko, E., Stanton, L. H., Madrid, A. S., Kieselbach, T. and Weis, K.** (2009). Role of the Ndc1 interaction network in yeast nuclear pore complex assembly and maintenance. *J Cell Biol* **185**, 475-491.
- Orjalo, A. V., Arnaoutov, A., Shen, Z., Boyarchuk, Y., Zeitlin, S. G., Fontoura, B., Briggs, S., Dasso, M. and Forbes, D. J.** (2006). The Nup107-160 nucleoporin complex is required for correct bipolar spindle assembly. *Mol Biol Cell* **17**, 3806-3818.
- Ostlund, C., Folker, E. S., Choi, J. C., Gomes, E. R., Gundersen, G. G. and Worman, H. J.** (2009). Dynamics and molecular interactions of linker of nucleoskeleton and cytoskeleton (LINC) complex proteins. *J Cell Sci*.
- Palancade, B. and Doye, V.** (2008). Sumoylating and desumoylating enzymes at nuclear pores: underpinning their unexpected duties? *Trends Cell Biol* **18**, 174-183.
- Patel, S. S., Belmont, B. J., Sante, J. M. and Rexach, M. F.** (2007). Natively unfolded nucleoporins gate protein diffusion across the nuclear pore complex. *Cell* **129**, 83-96.
- Paulillo, S. M., Phillips, E. M., Koser, J., Sauder, U., Ullman, K. S., Powers, M. A. and Fahrenkrog, B.** (2005). Nucleoporin domain topology is linked to the transport status of the nuclear pore complex. *J Mol Biol* **351**, 784-798.
- Paulillo, S. M., Powers, M. A., Ullman, K. S. and Fahrenkrog, B.** (2006). Changes in nucleoporin domain topology in response to chemical effectors. *J Mol Biol* **363**, 39-50.
- Persson, H., Kvist, A., Vallon-Christersson, J., Medstrand, P., Borg, A. and Rovira, C.** (2009). The non-coding RNA of the multidrug resistance-linked vault particle encodes multiple regulatory small RNAs. *Nat Cell Biol*.
- Peters, R.** (2009). Translocation through the nuclear pore: Kaps pave the way. *Bioessays* **31**, 466-477.
- Pichler, A., Gast, A., Seeler, J. S., Dejean, A. and Melchior, F.** (2002). The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* **108**, 109-120.
- Pichler, A., Knipscheer, P., Saitoh, H., Sixma, T. K. and Melchior, F.** (2004). The RanBP2 SUMO E3 ligase is neither HECT- nor RING-type. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 984-991.
- Poderycki, M. J., Rome, L. H., Harrington, L. and Kickhoefer, V. A.** (2005). The p80 homology region of TEP1 is sufficient for its association with the telomerase and vault RNAs, and the vault particle. *Nucleic Acids Res* **33**, 893-902.
- Poderycki, M. J., Kickhoefer, V. A., Kaddis, C. S., Raval-Fernandes, S., Johansson, E., Zink, J. I., Loo, J. A. and Rome, L. H.** (2006). The vault exterior shell is a dynamic structure that allows incorporation of vault-associated proteins into its interior. *Biochemistry* **45**, 12184-12193.
- Poon, I. K. and Jans, D. A.** (2005). Regulation of nuclear transport: central role in development and transformation? *Traffic* **6**, 173-186.
- Powell, L. and Burke, B.** (1990). Internuclear exchange of an inner nuclear membrane protein (p55) in heterokaryons: in vivo evidence for the interaction of p55 with the nuclear lamina. *J Cell Biol* **111**, 2225-2234.
- Pritchard, C. E., Fornerod, M., Kasper, L. H. and van Deursen, J. M.** (1999). RAE1 is a shuttling mRNA export factor that binds to a GLEBS-like NUP98 motif at the nuclear pore complex through multiple domains. *J Cell Biol* **145**, 237-254.
- Prunuske, A. J., Liu, J., Elgort, S., Joseph, J., Dasso, M. and Ullman, K. S.** (2006). Nuclear envelope breakdown is coordinated by both Nup358/RanBP2 and Nup153, two nucleoporins with zinc finger modules. *Mol Biol Cell* **17**, 760-769.
- Puhka, M., Vihinen, H., Joensuu, M. and Jokitalo, E.** (2007). Endoplasmic reticulum remains continuous and undergoes sheet-to-tubule transformation during cell division in mammalian cells. *J Cell Biol* **179**, 895-909.
- Querol-Audi, J., Perez-Luque, R., Fita, I., Lopez-Iglesias, C., Caston, J. R., Carrascosa, J. L. and Verdaguer, N.** (2005). Preliminary analysis of two and three dimensional crystals of vault ribonucleoprotein particles. *J Struct Biol* **151**, 111-115.
- Querol-Audi, J., Casanas, A., Uson, I., Luque, D., Caston, J. R., Fita, I. and Verdaguer, N.** (2009). The mechanism of vault opening from the high resolution structure of the N-terminal repeats of MVP. *EMBO J*.

- Rabut, G., Doye, V. and Ellenberg, J.** (2004). Mapping the dynamic organization of the nuclear pore complex inside single living cells. *Nat Cell Biol* **6**, 1114-1121.
- Rabut, G., Lenart, P. and Ellenberg, J.** (2004). Dynamics of nuclear pore complex organization through the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 314-321.
- Rafikova, E. R., Melikov, K., Ramos, C., Dye, L. and Chernomordik, L. V.** (2009). Transmembrane Protein-free Membranes Fuse into Xenopus Nuclear Envelope and Promote Assembly of Functional Pores. *J Biol Chem* **284**, 29847-29859.
- Ramadan, K., Bruderer, R., Spiga, F. M., Popp, O., Baur, T., Gotta, M. and Meyer, H. H.** (2007). Cdc48/p97 promotes reformation of the nucleus by extracting the kinase Aurora B from chromatin. *Nature* **450**, 1258-1262.
- Rand, R. P., Reese, T. S. and Miller, R. G.** (1981). Phospholipid bilayer deformations associated with interbilayer contact and fusion. *Nature* **293**, 237-238.
- Rand, R. P. and Fang, Y.** (1993). Structure and energetics of phospholipid and diacylglycerol assemblies relative to membrane fusion. *Biochem Soc Trans* **21**, 266-270.
- Rasala, B. A., Orjalo, A. V., Shen, Z., Briggs, S. and Forbes, D. J.** (2006). ELYS is a dual nucleoporin/kinetochore protein required for nuclear pore assembly and proper cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17801-17806.
- Razafsky, D. and Hodzic, D.** (2009). Bringing KASH under the SUN: the many faces of nucleocytoplasmic connections. *J Cell Biol* **186**, 461-472.
- Reimer, G., Raska, I., Tan, E. M. and Scheer, U.** (1987). Human autoantibodies: probes for nucleolus structure and function. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **54**, 131-143.
- Rexach, M.** (2009). Piecing together nuclear pore complex assembly during interphase. *J Cell Biol* **185**, 377-379.
- Reynolds, E. S.** (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* **17**, 208-212.
- Ribbeck, K. and Gorlich, D.** (2002). The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion. *EMBO J* **21**, 2664-2671.
- Robinson, J. T., Wojcik, E. J., Sanders, M. A., McGrail, M. and Hays, T. S.** (1999). Cytoplasmic dynein is required for the nuclear attachment and migration of centrosomes during mitosis in *Drosophila*. *J Cell Biol* **146**, 597-608.
- Rodenas, E., Klerkx, E. P., Ayuso, C., Audhya, A. and Askjaer, P.** (2009). Early embryonic requirement for nucleoporin Nup35/NPP-19 in nuclear assembly. *Dev Biol* **327**, 399-409.
- Rodriguez-Navarro, S., Fischer, T., Luo, M. J., Antunez, O., Brettschneider, S., Lechner, J., Perez-Ortin, J. E., Reed, R. and Hurt, E.** (2004). Sus1, a functional component of the SAGA histone acetylase complex and the nuclear pore-associated mRNA export machinery. *Cell* **116**, 75-86.
- Rome, L., Kedersha, N. and Chugani, D.** (1991). Unlocking vaults: organelles in search of a function. *Trends Cell Biol* **1**, 47-50.
- Rosenblatt, J.** (2005). Spindle assembly: asters part their separate ways. *Nat Cell Biol* **7**, 219-222.
- Rotem, A., Gruber, R., Shorer, H., Shaulov, L., Klein, E. and Harel, A.** (2009). Importin {beta} regulates the seeding of chromatin with initiation sites for nuclear pore assembly. *Mol Biol Cell* **20**, 4031-4042.
- Rout, M. P., Aitchison, J. D., Suprpto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y. and Chait, B. T.** (2000). The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol* **148**, 635-651.
- Rout, M. P., Aitchison, J. D., Magnasco, M. O. and Chait, B. T.** (2003). Virtual gating and nuclear transport: the hole picture. *Trends Cell Biol* **13**, 622-628.
- Roux, K. J. and Burke, B.** (2006). From pore to kinetochore and back: regulating envelope assembly. *Dev Cell* **11**, 276-278.
- Ryan, K. J., McCaffery, J. M. and Wentz, S. R.** (2003). The Ran GTPase cycle is required for yeast nuclear pore complex assembly. *J Cell Biol* **160**, 1041-1053.
- Ryan, K. J., Zhou, Y. and Wentz, S. R.** (2007). The karyopherin Kap95 regulates nuclear pore complex assembly into intact nuclear envelopes in vivo. *Mol Biol Cell* **18**, 886-898.
- Ryu, S. J., An, H. J., Oh, Y. S., Choi, H. R., Ha, M. K. and Park, S. C.** (2008). On the role of major vault protein in the resistance of senescent human diploid fibroblasts to apoptosis. *Cell Death Differ* **15**, 1673-1680.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N.** (1992). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. 1985. *Biotechnology* **24**, 476-480.

- Salina, D., Bodoor, K., Eckley, D. M., Schroer, T. A., Rattner, J. B. and Burke, B.** (2002). Cytoplasmic dynein as a facilitator of nuclear envelope breakdown. *Cell* **108**, 97-107.
- Salina, D., Enarson, P., Rattner, J. B. and Burke, B.** (2003). Nup358 integrates nuclear envelope breakdown with kinetochore assembly. *J Cell Biol* **162**, 991-1001.
- Salpingidou, G., Rzepecki, R., Kiseleva, E., Lyon, C., Lane, B., Fusiek, K., Golebiewska, A., Drummond, S., Allen, T., Ellis, J. A. et al.** (2008). NEP-A and NEP-B both contribute to nuclear pore formation in *Xenopus* eggs and oocytes. *J Cell Sci* **121**, 706-716.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- Sasagawa, S., Yamamoto, A., Ichimura, T., Omata, S. and Horigome, T.** (1999). In vitro nuclear assembly with affinity-purified nuclear envelope precursor vesicle fractions, PV1 and PV2. *Eur J Cell Biol* **78**, 593-600.
- Savino, T. M., Gebrane-Younes, J., De Mey, J., Sibarita, J. B. and Hernandez-Verdun, D.** (2001). Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells. *J Cell Biol* **153**, 1097-1110.
- Sawin, K. E., LeGuellec, K., Philippe, M. and Mitchison, T. J.** (1992). Mitotic spindle organization by a plus-end-directed microtubule motor. *Nature* **359**, 540-543.
- Scheffer, G. L., Wijngaard, P. L., Flens, M. J., Izquierdo, M. A., Slovak, M. L., Pinedo, H. M., Meijer, C. J., Clevers, H. C. and Scheper, R. J.** (1995). The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein. *Nat Med* **1**, 578-582.
- Scheper, R. J., Broxterman, H. J., Scheffer, G. L., Kaaijk, P., Dalton, W. S., van Heijningen, T. H., van Kalken, C. K., Slovak, M. L., de Vries, E. G., van der Valk, P. et al.** (1993). Overexpression of a M(r) 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Res* **53**, 1475-1479.
- Schetter, A., Askjaer, P., Piano, F., Mattaj, I. and Kempheus, K.** (2006). Nucleoporins NPP-1, NPP-3, NPP-4, NPP-11 and NPP-13 are required for proper spindle orientation in *C. elegans*. *Dev Biol* **289**, 360-371.
- Schmid, M., Arib, G., Laemmli, C., Nishikawa, J., Durussel, T. and Laemmli, U. K.** (2006). Nup-PI: the nucleopore-promoter interaction of genes in yeast. *Mol Cell* **21**, 379-391.
- Schrader, N., Stelter, P., Flemming, D., Kunze, R., Hurt, E. and Vetter, I. R.** (2008). Structural basis of the nic96 subcomplex organization in the nuclear pore channel. *Mol Cell* **29**, 46-55.
- Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J. C. and de Murcia, G.** (2006). Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 517-528.
- Schroeijers, A. B., Siva, A. C., Scheffer, G. L., de Jong, M. C., Bolick, S. C., Dukers, D. F., Slootstra, J. W., Meloen, R. H., Wiemer, E., Kickhoefer, V. A. et al.** (2000). The Mr 193,000 vault protein is up-regulated in multidrug-resistant cancer cell lines. *Cancer Res* **60**, 1104-1110.
- Schroeijers, A. B., Reurs, A. W., Scheffer, G. L., Stam, A. G., de Jong, M. C., Rustemeyer, T., Wiemer, E. A., de Gruijl, T. D. and Scheper, R. J.** (2002). Up-regulation of drug resistance-related vaults during dendritic cell development. *J Immunol* **168**, 1572-1578.
- Schwartz, T. U.** (2005). Modularity within the architecture of the nuclear pore complex. *Curr Opin Struct Biol* **15**, 221-226.
- Shahin, V., Danker, T., Enss, K., Ossig, R. and Oberleithner, H.** (2001). Evidence for Ca<sup>2+</sup>- and ATP-sensitive peripheral channels in nuclear pore complexes. *FASEB J* **15**, 1895-1901.
- Shaklai, S., Amariglio, N., Rechavi, G. and Simon, A. J.** (2007). Gene silencing at the nuclear periphery. *FEBS J* **274**, 1383-1392.
- Shen, W. H., Balajee, A. S., Wang, J., Wu, H., Eng, C., Pandolfi, P. P. and Yin, Y.** (2007). Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell* **128**, 157-170.
- Shibata, Y., Voeltz, G. K. and Rapoport, T. A.** (2006). Rough sheets and smooth tubules. *Cell* **126**, 435-439.
- Siniosoglou, S., Lutzmann, M., Santos-Rosa, H., Leonard, K., Mueller, S., Aebi, U. and Hurt, E.** (2000). Structure and assembly of the Nup84p complex. *J Cell Biol* **149**, 41-54.
- Siva, A. C., Raval-Fernandes, S., Stephen, A. G., LaFemina, M. J., Scheper, R. J., Kickhoefer, V. A. and Rome, L. H.** (2001). Up-regulation of vaults may be necessary but not sufficient for multidrug resistance. *Int J Cancer* **92**, 195-202.
- Slesina, M., Inman, E. M., Rome, L. H. and Volkandt, W.** (2005). Nuclear localization of the major vault protein in U373 cells. *Cell Tissue Res* **321**, 97-104.

- Slesina, M., Inman, E. M., Moore, A. E., Goldhaber, J. I., Rome, L. H. and Volkandt, W.** (2006). Movement of vault particles visualized by GFP-tagged major vault protein. *Cell Tissue Res* **324**, 403-410.
- Smith, A., Brownawell, A. and Macara, I. G.** (1998). Nuclear import of Ran is mediated by the transport factor NTF2. *Curr Biol* **8**, 1403-1406.
- Smith, S. and de Lange, T.** (2000). Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. *Curr Biol* **10**, 1299-1302.
- Smith, S.** (2001). The world according to PARP. *Trends Biochem Sci* **26**, 174-179.
- Snyers, L., Umlauf, E. and Prohaska, R.** (1999). Association of stomatin with lipid-protein complexes in the plasma membrane and the endocytic compartment. *Eur J Cell Biol* **78**, 802-812.
- Sollner, T., Bennett, M. K., Whiteheart, S. W., Scheller, R. H. and Rothman, J. E.** (1993). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* **75**, 409-418.
- Stavru, F., Hulsmann, B. B., Spang, A., Hartmann, E., Cordes, V. C. and Gorlich, D.** (2006). NDC1: a crucial membrane-integral nucleoporin of metazoan nuclear pore complexes. *J Cell Biol* **173**, 509-519.
- Steen, R. L., Martins, S. B., Tasken, K. and Collas, P.** (2000). Recruitment of protein phosphatase 1 to the nuclear envelope by A-kinase anchoring protein AKAP149 is a prerequisite for nuclear lamina assembly. *J Cell Biol* **150**, 1251-1262.
- Stein, U., Bergmann, S., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., Royer, H. D., Schlag, P. M. and Walther, W.** (2005). YB-1 facilitates basal and 5-fluorouracil-inducible expression of the human major vault protein (MVP) gene. *Oncogene* **24**, 3606-3618.
- Steiner, E., Holzmann, K., Pirker, C., Elbling, L., Micksche, M. and Berger, W.** (2004). SP-transcription factors are involved in basal MVP promoter activity and its stimulation by HDAC inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* **317**, 235-243.
- Steiner, E., Holzmann, K., Pirker, C., Elbling, L., Micksche, M., Sutterluty, H. and Berger, W.** (2006). The major vault protein is responsive to and interferes with interferon-gamma-mediated STAT1 signals. *J Cell Sci* **119**, 459-469.
- Steiner, E., Holzmann, K., Elbling, L., Micksche, M. and Berger, W.** (2006). Cellular functions of vaults and their involvement in multidrug resistance. *Curr Drug Targets* **7**, 923-934.
- Stephen, A. G., Raval-Fernandes, S., Huynh, T., Torres, M., Kickhoefer, V. A. and Rome, L. H.** (2001). Assembly of vault-like particles in insect cells expressing only the major vault protein. *J Biol Chem* **276**, 23217-23220.
- Stewart, P. L., Makabi, M., Lang, J., Dickey-Sims, C., Robertson, A. J., Coffman, J. A. and Suprenant, K. A.** (2005). Sea urchin vault structure, composition, and differential localization during development. *BMC Dev Biol* **5**, 3.
- Stewart, M.** (2007). Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 195-208.
- Stillwell, W. and Doram, K.** (1980). Measurement of transmembrane proton diffusion using two liposome-sequestered pH indicator dyes. *Biochem Biophys Res Commun* **93**, 326-332.
- Stoffler, D., Fahrenkrog, B. and Aebi, U.** (1999). The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 391-401.
- Stoffler, D., Feja, B., Fahrenkrog, B., Walz, J., Typke, D. and Aebi, U.** (2003). Cryo-electron tomography provides novel insights into nuclear pore architecture: implications for nucleocytoplasmic transport. *J Mol Biol* **328**, 119-130.
- Suganuma, T., Pattenden, S. G. and Workman, J. L.** (2008). Diverse functions of WD40 repeat proteins in histone recognition. *Genes Dev* **22**, 1265-1268.
- Summerton, J. and Weller, D.** (1997). Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **7**, 187-195.
- Sunnaram, B. L., Gandemer, V., Sebillot, M., Grandgirard, N., Amiot, L., Leray, E. and Goasguen, J. E.** (2003). LRP overexpression in monocytic lineage. *Leuk Res* **27**, 755-759.
- Suntharalingam, M. and Wenthe, S. R.** (2003). Peering through the pore: nuclear pore complex structure, assembly, and function. *Dev Cell* **4**, 775-789.
- Suprenant, K. A.** (2002). Vault ribonucleoprotein particles: sarcophagi, gondolas, or safety deposit boxes? *Biochemistry* **41**, 14447-14454.
- Suprenant, K. A., Bloom, N., Fang, J. and Lushington, G.** (2007). The major vault protein is related to the toxic anion resistance protein (TelA) family. *J Exp Biol* **210**, 946-955.

- Sutovsky, P., Manandhar, G., Laurincik, J., Letko, J., Caamano, J. N., Day, B. N., Lai, L., Prather, R. S., Sharpe-Timms, K. L., Zimmer, R. et al.** (2005). Expression and proteasomal degradation of the major vault protein (MVP) in mammalian oocytes and zygotes. *Reproduction* **129**, 269-282.
- Tanaka, H., Kato, K., Yamashita, E., Sumizawa, T., Zhou, Y., Yao, M., Iwasaki, K., Yoshimura, M. and Tsukihara, T.** (2009). The structure of rat liver vault at 3.5 angstrom resolution. *Science* **323**, 384-388.
- Tavernarakis, N., Driscoll, M. and Kyrpides, N. C.** (1999). The SPFH domain: implicated in regulating targeted protein turnover in stomatins and other membrane-associated proteins. *Trends Biochem Sci* **24**, 425-427.
- Theisen, U., Straube, A. and Steinberg, G.** (2008). Dynamic rearrangement of nucleoporins during fungal "open" mitosis. *Mol Biol Cell* **19**, 1230-1240.
- Thomas, J. O. and Kornberg, R. D.** (1975). An octamer of histones in chromatin and free in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 2626-2630.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354.
- Tran, E. J. and Wentz, S. R.** (2006). Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge. *Cell* **125**, 1041-1053.
- Ulbert, S., Platani, M., Boue, S. and Mattaj, I. W.** (2006). Direct membrane protein-DNA interactions required early in nuclear envelope assembly. *J Cell Biol* **173**, 469-476.
- Umlauf, E., Csaszar, E., Moertelmaier, M., Schuetz, G. J., Parton, R. G. and Prohaska, R.** (2004). Association of stomatin with lipid bodies. *J Biol Chem* **279**, 23699-23709.
- Vagnarelli, P., Hudson, D. F., Ribeiro, S. A., Trinkle-Mulcahy, L., Spence, J. M., Lai, F., Farr, C. J., Lamond, A. I. and Earnshaw, W. C.** (2006). Condensin and Repo-Man-PP1 co-operate in the regulation of chromosome architecture during mitosis. *Nat Cell Biol* **8**, 1133-1142.
- van Broekhoven, C. L., Parish, C. R., Vassiliou, G. and Altin, J. G.** (2000). Engrafting costimulator molecules onto tumor cell surfaces with chelator lipids: a potentially convenient approach in cancer vaccine development. *J Immunol* **164**, 2433-2443.
- Van Vactor, D., O'Reilly, A. M. and Neel, B. G.** (1998). Genetic analysis of protein tyrosine phosphatases. *Curr Opin Genet Dev* **8**, 112-126.
- van Zon, A., Mossink, M. H., Schoester, M., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., Sonneveld, P. and Wiemer, E. A.** (2001). Multiple human vault RNAs. Expression and association with the vault complex. *J Biol Chem* **276**, 37715-37721.
- van Zon, A., Mossink, M. H., Schoester, M., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., Sonneveld, P. and Wiemer, E. A.** (2002). Structural domains of vault proteins: a role for the coiled coil domain in vault assembly. *Biochem Biophys Res Commun* **291**, 535-541.
- van Zon, A., Mossink, M. H., Scheper, R. J., Sonneveld, P. and Wiemer, E. A.** (2003). The vault complex. *Cell Mol Life Sci* **60**, 1828-1837.
- van Zon, A., Mossink, M. H., Schoester, M., Houtsmuller, A. B., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., Sonneveld, P. and Wiemer, E. A.** (2003). The formation of vault-tubes: a dynamic interaction between vaults and vault PARP. *J Cell Sci* **116**, 4391-4400.
- van Zon, A., Mossink, M. H., Schoester, M., Scheper, R. J., Sonneveld, P. and Wiemer, E. A.** (2004). Efflux kinetics and intracellular distribution of daunorubicin are not affected by major vault protein/lung resistance-related protein (vault) expression. *Cancer Res* **64**, 4887-4892.
- van Zon, A., Mossink, M. H., Houtsmuller, A. B., Schoester, M., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., Sonneveld, P. and Wiemer, E. A.** (2006). Vault mobility depends in part on microtubules and vaults can be recruited to the nuclear envelope. *Exp Cell Res* **312**, 245-255.
- Vasu, S. K. and Rome, L. H.** (1995). Dictyostelium vaults: disruption of the major proteins reveals growth and morphological defects and uncovers a new associated protein. *J Biol Chem* **270**, 16588-16594.
- Vasu, S. K. and Forbes, D. J.** (2001). Nuclear pores and nuclear assembly. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 363-375.
- Vernos, I. and Karsenti, E.** (1996). Motors involved in spindle assembly and chromosome segregation. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 4-9.
- Vigers, G. P. and Lohka, M. J.** (1991). A distinct vesicle population targets membranes and pore complexes to the nuclear envelope in *Xenopus* eggs. *J Cell Biol* **112**, 545-556.

- Vilalta, A., Kickhoefer, V. A., Rome, L. H. and Johnson, D. L.** (1994). The rat vault RNA gene contains a unique RNA polymerase III promoter composed of both external and internal elements that function synergistically. *J Biol Chem* **269**, 29752-29759.
- Voeltz, G. K., Prinz, W. A., Shibata, Y., Rist, J. M. and Rapoport, T. A.** (2006). A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell* **124**, 573-586.
- Vollmar, F., Hacker, C., Zahedi, R. P., Sickmann, A., Ewald, A., Scheer, U. and Dabauvalle, M. C.** (2009). Assembly of nuclear pore complexes mediated by major vault protein. *J Cell Sci* **122**, 780-786.
- Walther, T. C., Alves, A., Pickersgill, H., Loiodice, I., Hetzer, M., Galy, V., Hulsmann, B. B., Kocher, T., Wilm, M., Allen, T. et al.** (2003 a). The conserved Nup107-160 complex is critical for nuclear pore complex assembly. *Cell* **113**, 195-206.
- Walther, T. C., Askjaer, P., Gentzel, M., Habermann, A., Griffiths, G., Wilm, M., Mattaj, I. W. and Hetzer, M.** (2003 b). RanGTP mediates nuclear pore complex assembly. *Nature* **424**, 689-694.
- Warren, D. T., Zhang, Q., Weissberg, P. L. and Shanahan, C. M.** (2005). Nesprins: intracellular scaffolds that maintain cell architecture and coordinate cell function? *Expert Rev Mol Med* **7**, 1-15.
- Weinrich, S. L., Pruzan, R., Ma, L., Ouellette, M., Tesmer, V. M., Holt, S. E., Bodnar, A. G., Lichtsteiner, S., Kim, N. W., Trager, J. B. et al.** (1997). Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. *Nat Genet* **17**, 498-502.
- Weis, K.** (2002). Nucleocytoplasmic transport: cargo trafficking across the border. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 328-335.
- Whittaker, C. A. and Hynes, R. O.** (2002). Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol Biol Cell* **13**, 3369-3387.
- Whittle, J. R. and Schwartz, T. U.** (2009). Architectural nucleoporins Nup157/170 and Nup133 are structurally related and descend from a second ancestral element. *J Biol Chem* **284**, 28442-28452.
- Wilhelmsen, K., Ketema, M., Truong, H. and Sonnenberg, A.** (2006). KASH-domain proteins in nuclear migration, anchorage and other processes. *J Cell Sci* **119**, 5021-5029.
- Winey, M., Yarar, D., Giddings, T. H., Jr. and Mastronarde, D. N.** (1997). Nuclear pore complex number and distribution throughout the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle by three-dimensional reconstruction from electron micrographs of nuclear envelopes. *Mol Biol Cell* **8**, 2119-2132.
- Yang, L., Guan, T. and Gerace, L.** (1997). Integral membrane proteins of the nuclear envelope are dispersed throughout the endoplasmic reticulum during mitosis. *J Cell Biol* **137**, 1199-1210.
- Yang, Q., Rout, M. P. and Akey, C. W.** (1998). Three-dimensional architecture of the isolated yeast nuclear pore complex: functional and evolutionary implications. *Mol Cell* **1**, 223-234.
- Yang, Y. S. and Strittmatter, S. M.** (2007). The reticulons: a family of proteins with diverse functions. *Genome Biol* **8**, 234.
- Yi, C., Li, S., Chen, X., Wiemer, E. A., Wang, J., Wei, N. and Deng, X. W.** (2005). Major vault protein, in concert with constitutively photomorphogenic 1, negatively regulates c-Jun-mediated activator protein 1 transcription in mammalian cells. *Cancer Res* **65**, 5835-5840.
- Yi, C., Li, S., Wang, J., Wei, N. and Deng, X. W.** (2006). Affinity purification reveals the association of WD40 protein constitutive photomorphogenic 1 with the hetero-oligomeric TCP-1 chaperonin complex in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* **38**, 1076-1083.
- Yokoyama, H., Fujii, S. and Matsui, I.** (2008). Crystal structure of a core domain of stomatin from *Pyrococcus horikoshii* Illustrates a novel trimeric and coiled-coil fold. *J Mol Biol* **376**, 868-878.
- Yu, Z., Fotouhi-Ardakani, N., Wu, L., Maoui, M., Wang, S., Banville, D. and Shen, S. H.** (2002). PTEN associates with the vault particles in HeLa cells. *J Biol Chem* **277**, 40247-40252.
- Zhang, X., Morera, S., Bates, P. A., Whitehead, P. C., Coffey, A. I., Hainbucher, K., Nash, R. A., Sternberg, M. J., Lindahl, T. and Freemont, P. S.** (1998). Structure of an XRCC1 BRCT domain: a new protein-protein interaction module. *EMBO J* **17**, 6404-6411.
- Zhang, C., Goldberg, M. W., Moore, W. J., Allen, T. D. and Clarke, P. R.** (2002). Concentration of Ran on chromatin induces decondensation, nuclear envelope formation and nuclear pore complex assembly. *Eur J Cell Biol* **81**, 623-633.
- Zheng, C. L., Sumizawa, T., Che, X. F., Tsuyama, S., Furukawa, T., Haraguchi, M., Gao, H., Gotanda, T., Jueng, H. C., Murata, F. et al.** (2005). Characterization of MVP and VPARP assembly into vault ribonucleoprotein complexes. *Biochem Biophys Res Commun* **326**, 100-107.
- Zuccolo, M., Alves, A., Galy, V., Bolhy, S., Formstecher, E., Racine, V., Sibarita, J. B., Fukagawa, T., Shiekhata, R., Yen, T. et al.** (2007). The human Nup107-160 nuclear pore subcomplex contributes to proper kinetochore functions. *EMBO J* **26**, 1853-1864.

**Zuleger, N., Korfali, N. and Schirmer, E. C.** (2008). Inner nuclear membrane protein transport is mediated by multiple mechanisms. *Biochem Soc Trans* **36**, 1373-1377.

## 8. Abkürzungen

%	Prozent
®	registriertes Warenzeichen
°C	Grad Celsius
μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
2D	zweidimensional
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-Triphosphat
bidest.	bidestilliert
Bis	N, N'-Methylen-diacrylamid
bp	Basenpaare
BSA	Bovines (Rinder-) Serum-Albumin
C	Cytosin
C-terminal	Carboxy-terminal
cDNA	complementary DNA
cm	Zentimeter
Da	Dalton
dATP	Desoxy-Adenosin-Triphosphat
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
ddH <sub>2</sub> O	doppelt deionisiertes Wasser
ddNTP	Dideoxy-Nukleosid-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiotreitol
E. coli	Escherichia coli
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EGTA	Ethylenglycol-bis-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskop
ER	Endoplasmatisches Reticulum
et al.	et altera
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Gramm
GDP	Guanosin-Diphosphat
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunde
HEPES	Hydroxyethyl-Piperazin-1-Ethansulfonsäure
HRP	Horse radish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
INM	Inner nuclear membrane (Innere Kernmembran)
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LAP	Lamina assoziiertes Polypeptid
LBR	Lamin-B-Rezeptor
m	Meter oder milli ( $10^{-3}$ )
M	Molar
mM	Millimolar
mA	Milliampere
mAb	monoclonal antibody (monoklonaler Antikörper)
MDa	Megadalton
MF	Membranfraktion
min	Minute
mL	Milliliter
MMR	Marc's modified Ringer Lösung
MVP	Major Vault Protein
N-terminal	Amino-terminal
NES	Nuclear export signal (Kernexportsignal)
NLS	Nuclear localisation signal (Kernimportsignal)
nm	Nanometer ( $10^{-9}$ )
NPC	Nuclear pore complex (Kernporenkomplex)

## Abkürzungen

---

Nup	Nukleoporin
OD	optische Dichte
ONM	Outer nuclear membrane (äußere Kernmembran)
p.A.	per analysis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
sec	Sekunde
SL	Stammlösung
Sp	Spermienschromatin
ss	Single stranded (einzelsträngig)
Tab.	Tabelle
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween-20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TEP1	Telomerase-assoziiertes Protein 1
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween-20	Polyoxyethylen-Sorbitan Monolaurat
™	Trademark
U	Unit (Einheit)
ÜNK	Übernachtkultur
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vPARP	Vault-ADP(polyribose)-Polymerase
w/v	Weight per volume (Gewicht pro Volumen)
w/w	Weight per weight (Gewicht pro Gewicht)
g	Erdbeschleunigung
X-Gal	Brom-4-Chlor-3-Indol-β-D-Galaktopyranosid

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Christian Hacker

geboren am 09.05.1980 in Schweinfurt

Familienstand: ledig

### Ausbildung

---

#### **11/2005 – 1/2010** Universität Würzburg **Promotion (Biologie)**

Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie / Elektronenmikroskopie im Zuge der Promotionsarbeit.

Thema der Dissertation: Beteiligung des Major Vault Proteins an der Kernporenkomplexbildung

#### **10/2000 - 11/2005** Universität Würzburg **Diplom (Biologie)**

Hauptfach: Zell- und Entwicklungsbiologie

Nebenfächer: Neurobiologie und Tierphysiologie

Thema der Diplomarbeit: Export von TFIIIA in Oozyten von *Xenopus laevis*

Abschlussnote: sehr gut

#### **09/1991 - 07/1999** Gymnasium Bad Königshofen **Abitur**

### Zusätzliche Aktivitäten

---

#### **08/1999 - 07/2000** Zivildienst

Beschäftigungstherapie mit geistig Behinderten und schwer erziehbaren Jugendlichen in der Behindertenwerkstätte Salem in HÖchheim.

## Publikationsliste

**Hacker, C.**, Maier, E., Ulbrich, J., Scheer, U., Benz, R. and Dabauvalle, M.-C. (2010). Illuminating the role of the major vault protein (MVP) during nuclear pore complex assembly. *J. Cell Sci.* (in preparation)

Vollmar, F., **Hacker, C.**, Zahedi, R.P., Sickmann, A., Ewald, A., Scheer, U. and Dabauvalle, M.-C. (2009). Assembly of nuclear pore complexes mediated by major vault protein. *J. Cell Sci.* **122**, 780-786.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und nur unter 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.

Neben dem akademischen Grad „Diplom-Biologe Univ.“ habe ich keinen weiteren akademischen Grad erworben oder zu erwerben versucht.

Bad Königshofen, den 6. Mai 2010 .....

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Als erstes danke ich aufrichtig Frau Prof. Marie-Christine Dabauvalle, die mir dieses interessante Thema in ihrer Arbeitsgruppe angeboten hat und mir während der gesamten Dauer dieser Arbeit bei allen Fragen mit Rat und Tat zur Seite stand und für ein angenehmes Arbeitsklima sorgte.

Herrn Prof. Clemens Müller-Reible danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Herrn Prof. Ulrich Scheer möchte ich mich für die Unterstützung beim Verfassen der Publikationen, Vorträge und Poster und für Anregungen in Bezug auf meine Arbeit recht herzlich bedanken.

Danken möchte ich auch ganz herzlich Herrn Prof. Roland Benz, Elke Maier, Jannes und Florian, die mir bei einigen Versuchen freundlich ihre Mithilfe anboten.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Georg Krohne, der bei vielen Fragen in Bezug auf bestimmte Methoden und Fragestellungen immer nützliche Ideen und Ratschläge parat hatte. Außerdem danke ich ganz herzlich Claudia und Daniela, die immer hilfsbereit und zuvorkommend bei Fragen und Aufgaben zur Seite standen.

Ein großer Dank gilt Sebastian, Hannah, Rike, Frank, Michael, Mark, Anne und allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dabauvalle, die mich während der gesamten Dauer meiner Doktorarbeit unterstützt haben und für ein anregendes Arbeitsklima sorgten.

Weiterhin möchte ich mich recht herzlich bei allen Mitgliedern des Lehrstuhls für Zell- und Entwicklungsbiologie für die gute Zusammenarbeit bedanken, insbesondere bei Kathrin, Silke, Nathalia, Eva und Claudia. Ein großer Dank geht an Hannes und Tim, die mir maßgeblich bei meinen Klonierungsversuchen geholfen haben. Danke auch an Norbert, der einfach unentbehrlich für alle Fragen im Technik- und EDV-Bereich war. Ich möchte mich auch aufrichtig bei Uli bedanken, die in organisatorischen Dingen jederzeit ausgeholfen hat. Auch allen anderen Mitgliedern des Lehrstuhls möchte ich für die schöne Zeit an der Würzburger Uni danken.

Ich danke all meinen Freunden, die mich in den fast 10 Jahren in Würzburg begleitet haben und die diese Zeit unvergesslich machten.

Zu guter Letzt danke ich von Herzen meiner gesamten Familie, ohne deren Rückhalt vieles unmöglich gewesen wäre und am allermeisten meiner Verena, die mich von Beginn an unterstützt und mir immer wieder neuen Mut zugesprochen hat – vielen Dank!!