

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg**

Vorstand: Professor Dr. med. Hermann Einsele

**Mislokalisierung von Nup214/CAN auf beiden Seiten des
Kernporenkomplexes in akuten myeloischen Leukämien – Eine erstmalige
Darstellung des DEK-CAN Fusionsproteins auf der nukleoplasmatischen
Seite des Zellkerns**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Jörg Filser

aus Hohenpeissenberg

Würzburg, Mai 2012

Referentin: Prof. Dr. med. Doris Kraemer

Koreferent: Prof. Dr. med. Detlef Drenckhahn

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

08.02.2013

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Zelle und Kernhülle	1
1.2 Die Kernpore	4
1.3 Der nukleozytoplasmatische Transport	12
1.4 DEK und CAN	32
1.5 Die akute myeloische Leukämie	37
1.6 Fragestellung	41
2. Material und Methoden	43
2.1 Verzeichnis des Materials und der Geräte	43
2.2 Methoden	45
2.2.1 Präparative Induktion der Fusionsproteine	45
2.2.2 Reinigung der Fusionsproteine	46
2.2.3 Polyacrylamidgelelectrophorese mit SDS (SDS-Page)	47
2.2.4 Affinitätschromatographie mittels Ni ²⁺ -NTA Agarose Säule (hier Beschreibung mit batch Verfahren)	49
2.2.5 Immunoblot Inkubation und Entwicklung	50
2.2.6 Affinitätsreinigung der Immunsereen	52
2.2.7 Zellkulturen	53
2.2.8 Immunhistochemie – Immunfluoreszenz	55
3. Ergebnisse	57
3.1 Amplifizierung der transfizierten E.coli	57
3.2 Induktionsprobe der Fusionsproteinfragmente	58
3.2.1 Induktionsprobe für CAN Mitte	58
3.2.2 Induktionsprobe für DEK und CAN 80/81	59
3.3 Affinitätschromatographie mittels Ni ²⁺ Agarosesäule	60
3.3.1 Affinitätschromatographie für CAN Mitte	60
3.3.2 Affinitätschromatographie für CAN 80/81	61
3.3.3 Affinitätschromatographie für DEK	62
3.4. Immunoblot	63
3.4.1 Anti CAN Mitte	63
3.4.2 Anti CAN 80/81	64

3.5. Immunfluoreszenz	65
3.6 Immunogold Lokalisation CAN/Nup214*	66
4. Diskussion	71
5. Zusammenfassung	79
6. Abkürzungsverzeichnis	81
7. Abbildungsverzeichnis	83
8. Literaturverzeichnis	91

1. Einleitung

1.1 Die Zelle und Kernhülle

Die Zelle ist die strukturelle Funktionseinheit aller lebenden Organismen. Sie ist in der Lage als einzelliger Organismus eigenständig zu überleben. Im Zellverband bildet sie durch Interaktionen eine Einheit, welche dem Wohle des Gesamtorganismus unterworfen ist.

Der Zellkern ist das Charakteristikum, welche eukaryontische von prokaryontischen Zellen unterscheidet. Er speichert die Erbinformationen in Form der DNA. Diese ist mit zahlreichen Proteinen assoziiert und liegt als Chromatin vor (Übersichtsarbeit von (Conconi 2005)). Neben der Speicherung der genetischen Informationen erfüllt der Zellkern weitere wichtige Aufgaben, wie die DNA- und RNA-Synthese, die RNA-Prozessierung und die Ribosomensynthese.

Gemäß dem Prinzip der Kompartimentierung (Blobel 1980) wird der Zellkern durch die Kernhülle vom Rest der Zelle getrennt.

Dadurch wird der Ort der Transkription vom Ort der Translation, welche im Zytoplasma stattfindet, getrennt. Die Kernhülle dient außerdem der Verankerung des Zytoskeletts und des Chromatins. Durch diese Interaktionen hilft die Kernhülle den Zellkern innerhalb der Zelle zu positionieren. Sie besteht aus drei morphologisch und biochemisch unterschiedlichen Komponenten, die kontinuierlich ineinander übergehen. Dabei handelt es sich um die äußere Kernmembran (ONM), die innere Kernmembran (INM), welche mit der Lamina assoziiert ist, und die Kernporenkomplexe (NPC). Die äußere Kernmembran ist dem Zytoplasma zugewandt. Sie ist häufig mit Ribosomen besetzt und steht mit dem rauen endoplasmatischen Retikulum in direkter Verbindung.

Dadurch kann eine Diffusion von Proteinen über das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) oder die ER-Membran zur Kernhülle hin ermöglicht werden. Bei Vertebraten sind für die Verankerung des Zellkerns mit dem Zytoskelett die Gruppe der Nesprine verantwortlich (Übersichtsarbeit (Roux and Burke 2007)).

wurden erstmalig im Jahre 1975 von Aronson und Blobel beschrieben, als bei der Isolierung von Kernporen eine ca. 15nm dicke Proteinschicht mit extrahiert wurde (Aronson and Blobel 1975). Lamine finden sich in geringer Konzentration auch im Nukleoplasma. Die Hauptfraktion bildet in Assoziation mit Lamina- assoziierten Polypeptiden (LAPs) (Aebi, Cohn et al. 1986) die Kernlamina. Lamine können in allen Metazoen, nicht jedoch bei Einzellern und Pflanzen gefunden werden (Meier 2001) und werden in Säugetierzellen in zwei Hauptgruppen A (Lamin A, A Δ 10, C und C2) und B (Lamin B1, B2 und B3) aufgeteilt. Während die Typ A Lamine alle von einem Gen (LMNA) entstammen, sind bei der B Fraktion zwei Gene ursächlich (LMNB1 für B1 und LMNB2 für B2 und B3) (Übersichtsarbeit von (Dechat, Pflieger et al. 2008)).

Die Aufgaben der Lamine bzw. der Kernlamina sind vielfältig. Die Ausbildung eines filamentösen Netzwerkes aus Laminen und LAPs gibt dem Zellkern mechanische Stabilität (Stuurman, Heins et al. 1998). Eine weitere statische Aufgabe der Lamine ist die Assoziation mit Chromatin (Bouvier, Hubert et al. 1985). Sie binden beispielsweise an mitotische Chromosomen (Burke 1990) oder als periphere Proteine an Metaphase Chromosomen (Takata, Uchiyama et al. 2007). Ebenso können Lamine direkt an DNA binden (Stierle, Couprie et al. 2003).

Wie entscheidend die korrekte Struktur der Lamina ist, zeigt sich an verschiedenen Erbkrankheiten. Bei diesen, als Laminopathien bezeichneten Erkrankungen, liegen Mutationen in den Laminen oder in Lamina-assoziierten Proteinen vor. Zu ihnen zählen unter anderem die Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie, das Hutchinson-Gilford-Progerie-Syndrom, verschiedene Formen der Lipodystrophie, eine Form des Charcot-Marie-Tooth-Syndroms, die Pelger-Huët-Anomalie oder das Buschke-Ollendorff-Syndrom (Übersicht in (Gruenbaum, Margalit et al. 2005)). Charakteristisch für diese Krankheiten ist, dass die Symptome nur gewebespezifisch auftreten. Zu den betroffenen Geweben gehören Herz- und Skelettmuskeln, Fettgewebe, Knochenstrukturen, Haut- und Nervenzellen oder eine Kombination dieser Gewebe. Mutationen in B-Typ-Laminen sind meist schon während der Embryonalentwicklung letal, da diese Proteine essentielle Zellbestandteile sind (Harborth, Elbashir et al. 2001).

1.2 Die Kernpore

Die Kernhülle als Barriere für den freien Austausch von Mikro- und Makromolekülen zwischen Zellkern und Zytoplasma erfordert ein Portal, welches die Interaktion mit den Kompartimenten gewährleistet. Diese Funktion wird in eukaryontischen Zellen von den Kernporen (Nuclear pore complexes – NPC`s), mit ihren Untereinheiten Nukleoporine (Nup`s) erfüllt. Es handelt sich hierbei um Proteinkomplexe, welche zum einen eine passive Diffusion von kleinen Molekülen, Ionen und Metaboliten erlauben, als auch einen signalvermittelten aktiven Transport von Proteinen und Ribonukleinkomplexen ermöglichen (siehe unten).

Bereits im Jahre 1950 beschrieben Callan und Tomlin Kernporen in der Säugetierzelle mittels der Elektronenmikroskopie (Callan and Tomlin 1950). Erste Details konnte Gall 1967 mit der Darstellung der oktogonalen Struktur der NPC`s liefern (Gall 1967).

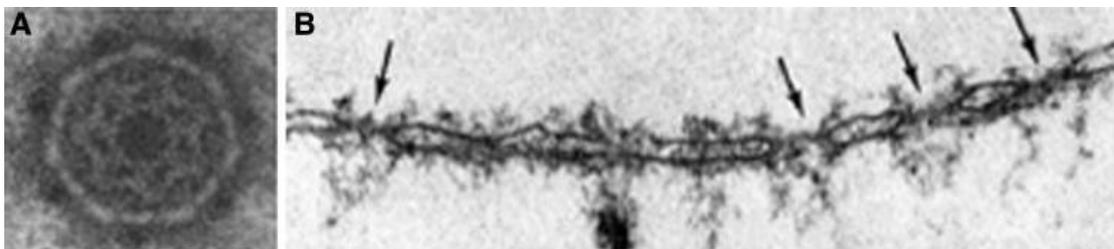


Abbildung 2: A: oktogonale Darstellung einer Kernpore (Gall 1967)

B: Kernhülle mit Darstellung von NPC`s (Pfeile) (Franke and Scheer 1970)

A+B aus (Lim, Aebi et al. 2008)

Weitere Meilensteine, um eine genauere Darstellung einer Kernpore zu erreichen, waren die Einführung der Kryo-Elektronenmikroskopie (Adrian, Dubochet et al. 1984) und der Kryo-Elektronentomographie zur 3D Rekonstruktion (Beck, Forster et al. 2004).

Eine nahezu vollständige Entschlüsselung einer Kernpore gelang im Jahre 2001 in der Hefe *S.cerevisiae* (Rout und Aitchison, 2001) mit einer Größe von 60MDa (Rout, Aitchison et al. 2000). Diese enthält etwa 30 Nukleoporine weniger als

ursprünglich erwartet (Rout M.P. 1994). NPC` s einer Säugetierzelle besitzen im Vergleich zu Hefen ein höheres Molekulargewicht von mehr als 100MDa und sind damit eines der größten Moleküle einer Zelle (Beck, Forster et al. 2004) und (Lim, Aebi et al. 2008). Des Weiteren ist die Anzahl an Nukleoporinen mit 30-50 höher als in der Hefe (Vasu and Forbes 2001).

Die Anzahl der NPC` s einer Zelle hängt von deren Größe und Aktivität ab. Hefezellen besitzen ca. 200 Kernporen/Nukleus, proliferierende menschliche Zellen 2000-5000/Nukleus und Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* 5×10^7 /Nukleus (Gerace and Burke 1988; Gorlich and Kutay 1999). Dabei ist die Verteilung nicht gleichmäßig, sondern in Clustern angeordnet (Winey, Yarar et al. 1997).

Kernporen besitzen eine Doughnut-artige Form (Fernandez-Martinez and Rout 2009); (Alber, Dokudovskaya et al. 2007), bestehend aus einer nukleoplasmatischen und einer zytoplasmatischen Ringstruktur. Diese ist durch eine oktagonale Speichensymmetrie mit einem inneren und äußeren Speichenring verbunden. Sie besteht aus acht identischen Speichen und verläuft spiegelsymmetrisch, sowohl parallel zur Kernhülle als auch lotrecht zur Achse welches sich um ein zentrales Kerngerüst anordnet. Dieser Aufbau wirkt sich ressourcensparend in Bezug auf die gesamt Anzahl der Nup`s eines NPC` s aus: 1994 gingen Rout und Wente noch von möglicherweise 100 verschiedenen Nup`s aus (Rout M.P. 1994). Im Vergleich hierzu weisen Ribosomen bei 1/20 der Größe einer Kernpore etwa 75 verschiedene Untereinheiten auf (Blobel and Wozniak 2000).

Gemeinsam mit den Ringstrukturen und der Speichenanordnung (Speichen Komplex (Rout MP 2001)) wird ein zentraler Kanal geschaffen, durch welchen der Transport von Makromolekülen stattfindet. Auf dieses Kerngerüst entfällt etwa die Hälfte der Nup`s eines NPC` s. Es weist Strukturanalogien mit behüllten Vesikeln auf, welche auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung hindeuten (Alber, Dokudovskaya et al. 2007). Sowohl auf zytoplasmatischer als auch auf nukleoplasmatischer Seite gehen von der zytoplasmatischen

Ringstruktur nach peripher Filamente aus, welche auf nukleoplasmatischer Seite eine Korbstruktur bilden (Lim and Fahrenkrog 2006) und (Tran and Wente 2006).

Im Jahre 2007 gelang es erstmalig durch Alber et al. eine vollständige Darstellung eines NPC in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, in welcher die Position der einzelnen Nup`s gezeigt werden konnte (Alber, Dokudovskaya et al. 2007).

Die zentrale Einheit bildet das oben erwähnte Kerngerüst. Dieses verleiht dem NPC Stabilität und dient als Ansatzpunkt für weitere Strukturen. Die beiden inneren Ringe stehen in der Äquatorialebene in enger Beziehung und besitzen Verbindungen zu den integralen Membranproteinen Ndc1, Pom34 und Pom152. Auf diese Weise wird ein NPC in der Kernmembran verankert.

Nic96 und Nup82 sog. „linker Nup`s“ verbinden den inneren mit dem äußeren Ring und die FG-reichen Nup`s mit dem Kerngerüst.

FG-reiche Nup`s spielen eine Schlüsselrolle im Signal-induzierten Transport von Makromolekülen. Sie enthalten eine kleine strukturell scharf definierte Domäne, die der Verankerung dient und eine unstrukturierte Domäne, welche charakteristische, repetitive FG-reiche Sequenzen aufweist. Entweder direkt am inneren Ring oder via „linker Nup`s“ verbunden, bilden sie ein wolkenähnliches Gebilde, welches den zentralen Kanal okkludiert und möglicherweise den gerichteten Transport von Makromolekülen über ihre FG-Sequenzen ermöglicht (siehe 1.4).

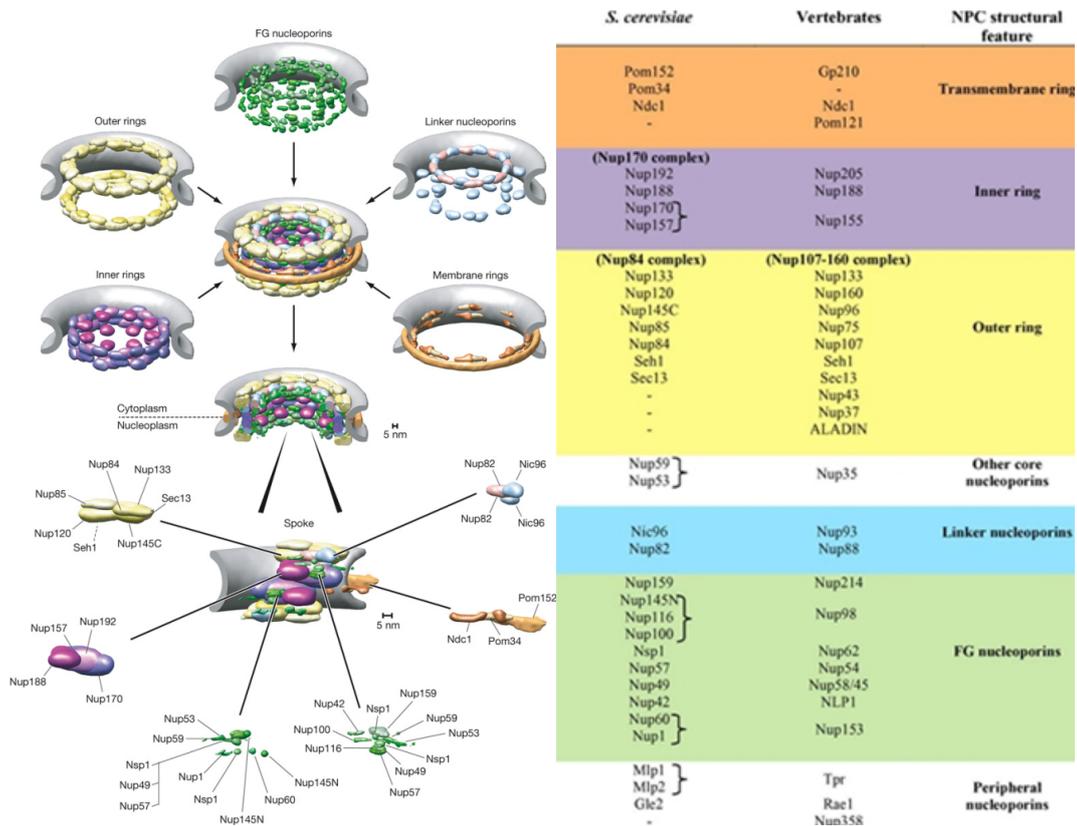


Abbildung 3 (links) aus (Alber, Dokudovskaya et al. 2007) und **Abbildung 4** (rechts) aus (Fernandez-Martinez and Rout 2009). **Zu 3:** Darstellung der einzelnen Untereinheiten eines NPC. Mlp1 und Mlp2, welche für die Bildung der Korbstruktur postuliert werden (Krull, Thyberg et al. 2004), sind nicht berücksichtigt. Entsprechend ihrer Funktion und Lokalisation wurden die Substrukturen farblich dargestellt: transmembranöser Ring (braun), innerer Ring (violett), äußerer Ring (gelb), „linker Nup`s“ (türkis) und FG Nup`s (grün). Die Kernmembran ist in grau gehalten. Eine Speiche ist als Auszug gesondert aufgeschlüsselt. **Zu 4:** Nup`s aus der Hefe- und Vertebratenzelle werden korrespondierend gelistet. Die farbliche Trennung entspricht den einzelnen Substrukturen aus Abbildung 3.

Durch die Anwendung der Kryo-Elektronentomographie durch Beck et al. konnten nunmehr Größenrelationen gezogen werden (Beck, Forster et al. 2004); (Beck, Lucic et al. 2007). In dem Modellorganismus *Dictyostelium discoideum* konnte eine Gesamtlänge von ca. 150nm ermittelt werden, bestehend aus dem ca. 50nm langen zentralen Netzwerk, den ca. 35nm langen zytoplasmatischen Filamenten und den ca. 60nm langen nukleoplasmatischen Filamenten. Im äußeren Durchmesser misst ein NPC ca. 125nm. Der innere Durchmesser folgt dem sanduhrartigen Aufbau des zentralen Netzwerkes. Jeweils ca. 60-70nm an der Peripherie und ca. 45nm in der Mitte der zentralen Pore, welche den Signal-

induzierten Transport von Makromolekülen bis zu einer Größe von 39nm erlaubt (Pante and Kann 2002).

Dieser allgemeine Aufbau (exklusive Größe und Anzahl der Nup`s), sei es nun in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum*, dem Krallenfrosch *Xenopus laevis* oder der Säugetierzelle ist nahezu identisch (Beck, Forster et al. 2004), (Kiseleva, Allen et al. 2004), (Stoffler, Feja et al. 2003).

Wie bei allen Anteilen einer eukaryontischen Zelle befinden sich auch NPC`s in einem steten Wandel aus Generierung, Reparatur und Abbau. NPC`s sind dabei eng mit dem Zyklus der Zelle und speziell der Kernhülle verknüpft (D'Angelo and Hetzer 2008), (Maul, Price et al. 1971). Die Bildung neuer NPC`s ist ein Prozess, welcher nicht ad hoc stattfindet. Verschiedene elektronenmikroskopische Studien konnten einen schrittweisen Prozess darstellen (Goldberg, Wiese et al. 1997), (Macaulay and Forbes 1996), (Sheehan, Mills et al. 1988), (Drummond, Rutherford et al. 2006). D'Ángelo et al. zeigten in Wirbeltierzellen, dass keine präformierten Bereiche für die Integration neuer Bestandteile nötig sind und die Komponenten sowohl auf zytoplasmatischer als auch auf nukleoplasmatischer Seite gebildet werden (D'Angelo, Anderson et al. 2006). RanGTP (Walther, Askjaer et al. 2003), ein auf beiden Seiten lokalisierter Pool aus Importin β (Harel, Chan et al. 2003) und der Nup107-160 Komplex sind für die Generierung erforderlich. Dieser bei Vertebraten vorkommende Komplex kann (Belgareh, Rabut et al. 2001), (Fontoura, Blobel et al. 1999), ähnlich wie sein Hefe Pendant Nup84 (Siniosoglou, Lutzmann et al. 2000), als eine Entität aus intakten NPC`s isoliert werden und legt damit die Vermutung nahe, dass wie oben beschrieben NPC`s aus Blöcken generiert werden. Ebenso konnte die Bedeutung der Karyopherine als Transportbegleiter (Wozniak, Rout et al. 1998), (Harel, Chan et al. 2003) bewiesen werden. Im Hefemodell führten Mutanten des Kap95 (entspricht dem Vertebraten Importin β) zu einer inkorrekten Integrierung von Bestandteilen von NPC`s in die Kernmembran. Ryan et al. bezeichnen deshalb Kap95 als den „Schlüssel für den Einbau von NPC`s in die Kernmembran“ (Ryan, Zhou et al. 2007).

Eine weitere Fragestellung in Punkto Generierungsort konnten Maiko et al. und Onischenko et al. klären: Welche Anteile eines NPC auf welcher Seite der Kernmembran hergestellt werden (Onischenko, Stanton et al. 2009) und (Makio, Stanton et al. 2009). Mittels Markierung durch das fluoreszierende Protein Dendra (Gurskaya, Verkhusha et al. 2006) konnten neu synthetisierte Nup Proteine (grün markiert) von bereits vorhandenen (rot markiert auf Grund UV-Licht vermittelter irreversibler Photokonversion) unterschieden werden. Es konnte nunmehr der von D'Angelo (D'Angelo, Anderson et al. 2006) beschriebene Verlauf von zwei Nup Pools belegt werden. Auf zytoplasmatischer Seite werden Kerngerüst, Transmembran Nup's und zytoplasmatisch gelegene Anteile generiert. Auf nuklearer Seite werden ebenfalls Kerngerüstanteile und Transmembran Nup's gebildet.

Das Modell zur Bildung eines neuen NPC von Fernandez-Martinez und Rout (Fernandez-Martinez and Rout 2009) gilt für Organismen, welche eine geschlossene Mitose durchlaufen. Während dem Durchlaufen der Mitose kommt es zu keinem Abbau des NE. Es werden stets neu synthetisierte NPC's in eine intakte Kernhülle implementiert. Dieser Vorgang wurde von Maul der S-Phase zugesprochen (Maul, Maul et al. 1972). Neuere Daten weisen jedoch auf den Übergang der G1- zu G2-Phase hin (Maeshima, Yahata et al. 2006).

Demgegenüber steht die offene Mitose höherer Eukaryonten, bei deren Mitose es zu einer kompletten Auflösung der NE kommt und demnach auch zu einer Dislokation der NPC. Es handelt sich hierbei um einen schnellen, geordneten Abbau (Kutay and Hetzer 2008), (Dultz, Zanin et al. 2008). Während Zellen von Metazoen in der Interphase als Entität erhalten bleiben (Daigle, Beaudouin et al. 2001), kommt es in der Prometaphase zu einer Auflösung der Kernhülle und ein Großteil der Nup's disloziert in das Zytoplasma. Transmembran Nup's gelangen zusammen mit anderen Transmembranproteinen in das ER (Daigle, Beaudouin et al. 2001), (Beaudouin, Gerlich et al. 2002).

Die Phosphorylierung verschiedener Schlüssel Nup's scheint dabei eine Destabilisierung der NPC's hervorzurufen und damit zum Abbau zu führen (Galy, Antonin et al. 2008), (Glavy, Krutchinsky et al. 2007). Wie bei der

Generierung neuer NPC`s werden bei Auf- und Abbau während der Mitose Zwischenprodukte gebildet, welche dann in unterschiedlicher Reihenfolge wieder integriert werden (Goldberg, Wiese et al. 1997), (Kiseleva, Rutherford et al. 2001).

Dabei ist der Abbau nach Dultz et al. schneller als der Aufbau von NPC`s und synchronisierter. Ebenso laufen Ab- und Aufbau nicht nach dem gleichen Schema ab (Dultz, Zanin et al. 2008).

Die momentan nicht verwendungsfähigen Kernporen Anteile sind aber keineswegs ohne Funktion. Vielmehr nehmen sie am korrekten Ablauf der Mitose teil. Als Beispiel sei der Nup107-160 Komplex oder RanBP2/Nup358 genannt. Ersterer ist mit den Kinetochoren verbunden und scheint damit eine Rolle in der korrekten Ausbildung des Spindelfaserapparats zu spielen (Zuccolo, Alves et al. 2007).

Mit Beginn der Anaphase wird eine neue Kernmembran und damit auch NPC`s benötigt. Dies ist, wie Dultz et al. dargelegt haben ein schrittweiser Prozess (Dultz, Zanin et al. 2008), welcher sich in der Anaphase (Nup107–160, Nup153, Nup98, und POM121), über die Telophase (Nup62 und Nup93 Komplex, Nup358, und Nup214) bis hin zur G1-Phase zieht (Tpr und gp210). Wieder spielt das Ran System eine wichtige Rolle, welches die Loslösung einiger Nup`s von Importin bewirkt und somit eine Wiedereingliederung und Implementierung in NPC`s bewirkt (Harel, Chan et al. 2003), (Walther, Askjaer et al. 2003). Elys/Mel-28 trägt zur Bereitstellung des Nup107-160 Komplex, (Gillespie, Khoudoli et al. 2007), der Transmembran Nup`s und Membrananteile (Antonin, Franz et al. 2005) bei. Nup155 und Nup53/35 werden für die Kernmembranfusion und den weiteren NPC Aufbau benötigt (Hawryluk-Gara, Platani et al. 2008) und (Rodenas, Klerkx et al. 2009). Zur Komplettierung werden noch FG-reiche Nup`s und Bindeproteine eingefügt (Dultz, Zanin et al. 2008).

Dieser Ablauf trifft für proliferationsaktive Zellen zu. Neurone verharren über Jahre in der G0-Phase und sind somit nicht teilungsaktiv. Trotz alledem müssen Schäden an NPC`s repariert werden. Wie auch der Rest einer eukaryontischen Zelle befinden sich Kernporen in einem steten Wandel aus Reparatur und

Erneuerung (D'Angelo and Hetzer 2008). Dabei sind aber erhebliche Zeitunterschiede zu verzeichnen. Während FG-reiche Nup`s eine kurze Verweildauer von wenigen Sekunden bis Minuten aufweisen, können Komponenten des Kerngerüsts mehrere Tage ihre Funktion erfüllen (Rabut, Doye et al. 2004). Durch diesen hohen Umsatz vermag sich eine Zelle vor länger einwirkenden Noxen auf NPC`s zu schützen. Jedoch hat jede Zelle eine mehr oder weniger lange Lebensspanne oder führt wie D'Angelo et al. an postmitotischen Metazoen Zellen gezeigt haben, keine Wartung oder Resynthese von Kernporen Bestandteilen durch (D'Angelo, Raices et al. 2009). Bei einer Akkumulation an Strukturschäden der NPC`s kommt es zum Permeabilitätsverlust der NE und damit zum Zellaltern bzw. zum Zelltod.

1.3 Der nukleozytoplasmatische Transport

Berechnungen zu Folge wird in einem menschlichen Körper jede Minute mehr als ein Kilogramm an Substrat durch die Kernporen befördert (Weis 2007). Dies ist ein Tribut, welcher der Kompartimentierung in Eukaryonten gezollt werden muss.

Trotz der Kenntnis von Kernporen als Teil der Kernhülle in den 50er Jahren (Callan and Tomlin 1950) blieb die genaue Funktion unklar. Es wurden eine Beteiligung am Austausch von Makromolekülen (Feldherr 1972) oder/und der Organisation von Chromatin vorgeschlagen (Comings and Okada 1970). Die Selektivität wurde jedoch größtenteils der Kernhülle zugesprochen (Gurdon 1970). Paine und Feldherr konnten durch Injektion von Makromolekülen in *Xenopus* Eier zeigen, dass unabhängig von der elektrischen Ladung die Größe eines Moleküls für die Anreicherung im Zellkern verantwortlich ist (Paine 1975). Für Makromoleküle wurde eine Änderung der Konformation im Sinne einer Längenzunahme auf Kosten der Breite vorgeschlagen (Übersichtsarbeit von Bonner (Bonner 1978 564)). Eine weitere Möglichkeit bestand in der Änderung der Kernmembranselektivität während des Zellzyklus (Goldstein 1974). Mit Beginn der 80er Jahre rückte zunehmend der NPC als Vermittler des NCT in den Fokus (Feldherr, Kallenbach et al. 1984).

Anfang 1990 waren für den nukleozytoplasmatischen Transport bereits folgende Merkmale bekannt (aus (Akey 1989)):

- 1 Der NPC fungiert als Portal für den Transport von Ionen, Mikro- und Makromolekülen in den Zellkern (Übersichtsarbeit von Gerace und Burke (Gerace and Burke 1988)).
- 2 Der Transport von Makromolekülen verläuft wahrscheinlich durch die NPC (Franke 1974), durch eine kanalartige Anordnung genannt „NPC - Transporter“ (Akey and Goldfarb 1989). Ionen und Moleküle <40kD können passiv durch Diffusion in den Zellkern gelangen (Paine 1975).
- 3 Ein Makromolekül, welches für den Transport in den Zellkern bestimmt ist, enthält eine NLS (Kalderon, Roberts et al. 1984) und ist ATP-

abhängig (Newmeyer, Lucocq et al. 1986). Der Transport selbst ist inhibierbar (Finlay, Newmeyer et al. 1987).

- 4 Es wurden zwei Proteine beschrieben, welche an das NLS des SV40 large T-Antigen binden und im Zytosol, der Kernhülle und im Nukleus selbst nachgewiesen wurden. Diesen wurde eine Rolle als Rezeptor oder Transportprotein zugewiesen (Adam, Lobl et al. 1989).

Der Import wurde in drei Schritte aufgeteilt (Akey and Goldfarb 1989):

- 1 Perinukleäre Akkumulation von Substraten, welche ein NLS beinhalten.
- 2 Bindung des Substrates an den NPC.
- 3 Translokation durch den NPC.

Der genaue Mechanismus war 1990 noch nicht bekannt. Es zeigte sich jedoch, dass für den Transport eines NLS Substrates möglicherweise Rezeptoren oder Transporter diese begleiten (Adam, Lobl et al. 1989). Dies konnte durch Adam et al. in einem in vitro Assay anhand von permeablen Zellen durch Digitonin gezeigt werden: *„Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors“* (Adam, Marr et al. 1990). Dieser in vitro Assay wurde von Moore und Blobel weiter modifiziert (Moore and Blobel 1992). Dadurch konnten vier elementare Mitspieler des NCT detektiert werden: Importin α (Gorlich, Prehn et al. 1994), Importin β (Radu, Blobel et al. 1995), die GTPase Ran (Moore and Blobel 1993) und der „nuclear transport factor 2“ (NTF2) (Moore and Blobel 1994).

Mittlerweile ist der Transport von Makromolekülen weitestgehend entschlüsselt. Es konnten weitere Faktoren für den Im- und Export, die Rolle der GTPase Ran und ihrer Komponenten als treibende Kraft und alternative Wege für einen gerichteten Transport identifiziert werden (Übersichtarbeiten von Görlich und Kutay (Gorlich and Kutay 1999), Macara (Macara 2001), Pemberton und Paschal (Pemberton and Paschal 2005), Stewart (Stewart 2007) und Sorokin et al. (Sorokin, Kim et al. 2007)). Der klassische nukleäre Import ist der am besten beschriebene Transportmodus und wird im Folgenden exemplarisch dargestellt.

Die Transportsubstrate mit ihrer NLS werden ebenso wie die Rolle der FG-Nukleoporine unten gesondert erläutert.

Treibende Kraft in dem energieabhängigen Vorgang ist die GTPase Ran. Dieses 25kDa große Protein (Moore 1998) ist in GTP-Form vornehmlich im Nukleus lokalisiert und um den Faktor 100 höher als im Zytosol (Kalab, Weis et al. 2002). Die asymmetrische Verteilung in Abhängigkeit vom Nukleotidstatus ist für die Transportrichtung verantwortlich (Moore and Blobel 1993) und unterliegt einem zyklischen Verlauf. Zum einen wird der Transport von Cargos gewährleistet, zum anderen wird Ran für das Recycling der Transportrezeptoren und für den nukleären Export benötigt (Übersichtsarbeit von Pemberton und Paschal (Pemberton and Paschal 2005)). Daneben existieren für dieses Enzym eine Reihe von Regulatoren, welche für eine stete Bereitstellung der jeweiligen benötigten Ran Form sorgen. „Ran binding proteins“ fungieren als Co-Aktivatoren und Co-Faktoren für Ran Regulatoren (z.B. RanBP1).

Die Karyopherine dienen beim Transport von Makromolekülen als Transportrezeptor und interagieren mit Ran und den Nukleoporinen (Übersichtsarbeit von Mosammaparast und Pemberton (Mosammaparast and Pemberton 2004)). Diese 95–145kDa großen Proteine werden je nach Transportrichtung als „Importine“ oder „Exportine“ bezeichnet. Die Anzahl der Karyopherine korreliert jedoch bei weitem nicht mit der Vielzahl an Cargos. In der Hefe sind 10 Importine, 3 Exportine und 1 Import/Exportin bekannt (Mosammaparast and Pemberton 2004), was den Schluss zulässt, dass Karyopherine nicht nur auf einzelne Substrate spezialisiert sind. Sie besitzen am N-terminalem Ende eine Bindungsstelle für Ran, im zentralen Abschnitt eine für die Interaktion mit Nukleoporinen und am C-terminalem Ende eine Domäne für die Substratbindung (Chook and Blobel 2001). Es konnte gezeigt werden, dass Karyopherine über vielfältige Bindungsstellen verfügen (Chook and Blobel 2001) und sich der verschiedenartigen Konformation ihres Substrates anpassen können (Cingolani, Petosa et al. 1999). Dieser generelle Aufbau ist jedoch ebenfalls Variationen unterworfen (Conti 2002), (Gorlich, Henklein et al. 1996).

Der klassische nukleäre Import beinhaltet ein Substrat mit einem klassischen NLS (cNLS), den Transportrezeptor Importin β , welcher über das Adapterprotein Importin α mit dem Cargo verbunden ist. Nach dem Transport durch den NPC wird durch Bindung von RanGTP an Importin β eine Dissoziation des Komplexes erreicht. Importin β wird mit RanGTP exportiert und Importin α als Trimer mit RanGTP und CAS (cellular apoptosis susceptibility gene). Importin β ist jedoch auch in der Lage ohne Adapterprotein Cargos ohne cNLS zu transportieren (Sorokin, Kim et al. 2007). Weitere Aufgaben der Karyopherine bei der Genese von Kernporen und der Zelleregulation wurden in Kapitel 1.2 dargelegt.

Daneben existieren noch weitere Importine und Exportine, welchen verschiedene spezifische Cargos zugeordnet werden konnten (siehe hierzu (Macara 2001), (Sorokin, Kim et al. 2007)).

Man kann den klassischen Import zum besseren Verständnis in vier Teilschritte unterteilen:

1. Bereitstellung des Transportkomplexes aus Rezeptor und Substrat im Zytoplasma
2. Translokation durch den NPC via FG–Nukleoporine
3. Freisetzung des Transportsubstrates
4. Recycling der Transportrezeptoren und Auffrischung des Ran Pools

Der erste Schritt für den Transport von Makromolekülen (>40kDa (Paine 1975) bis zu der von Wang und Britain ermittelten Maximalgröße von ~100kDa (Wang and Brattain 2007)) ist, dass der Transportrezeptor das zu transportierende Substrat erkennt.

Transportsubstrate enthalten Aminosäuresequenzen, welche entweder den Import (nuclear localization signal – NLS) oder den Export (nuclear export signal – NES) bewirken. Das am besten charakterisierte ist das klassische NLS (cNLS) (Übersichtsarbeit von (Lange, Mills et al. 2007)). 1984 stellten Kalderon et al. erstmalig eine NLS vor (Kalderon, Roberts et al. 1984), (Kalderon, Richardson et al. 1984). Das simian virus 40 (SV40) large T antigen enthält für

die Lokalisation im Zellkern einen monopartiellen (monopartite) Aminosäurenabschnitt. Dieser besteht aus Lysin (K) und Arginin (R) (¹²⁶PKKKRRV¹³²).

Diese Reihenfolge ist nicht zufällig entstanden. Ein Austausch der Aminosäure Lysin an zweiter Stelle führt nicht zum Import (Kalderon, Richardson et al. 1984). Bipartielle (bipartite) cNLS besitzen zwei durch ein Verbindungsstück getrennte Abschnitte an Aminosäuren, welche das Substrat als transportabel kennzeichnen (¹⁵⁵KRPAATKKAGQA¹⁷⁰KKK¹⁷⁰). Der klassische Vertreter hierfür ist das „nucleoplasmin“, welches 1982 von Dingwall et al. beschrieben wurde (Dingwall, Sharnick et al. 1982). Diese Aminosäuresequenzen dienen als Bindungsstelle für den Transportrezeptor. Dabei wird eine viel engere Bindungsaffinität (~10nm) bei Substraten mit cNLS erreicht, als bei Substraten ohne (1µm) (Hodel, Corbett et al. 2001). Die NLS bindet im 3D Bild mittels ihrer Sequenzen an zwei Vertiefungen, bestehend aus flexiblen Armadillo-Motiven (arm motif) des Transportfaktors Importin α (Conti and Kuriyan 2000), (Fontes, Teh et al. 2000). Hydrophobische und elektrostatische Interaktionen bewirken die Bindung (Lange, Mills et al. 2007).

Allein durch diese Bindung kommt ein Import nicht zustande. Vielmehr sind Substrataffinität und die Konzentration von Importin α entscheidend (Riddick and Macara 2005), (Hodel, Harreman et al. 2006). Das cNLS ist jedoch nicht der einzige Weg, Substrate mit einer Signalsequenz zu transportieren. Die Arbeitsgruppe um Lange et al. hat die Prävalenz von cNLS in der GenBank™ für *S. cerevisiae* (Benson, Karsch-Mizrachi et al. 2005) untersucht. 16,5% der untersuchten Proteine besaßen ein bipartielles cNLS, 28,6% ein monopartielles cNLS und 54,9% kein klassisches NLS (Lange, Mills et al. 2007).

Die Prolin-Tyrosin NLS besteht aus einer langen (>30 AS) ungeordneten Kette mit Prolin und Tyrosin, welche mit Karyopherin $\beta 2$ interagiert. 81 Cargos wurden mit dieser NLS in Verbindung gebracht (Lee, Cansizoglu et al. 2006). Diese von Lee et al. publizierte NLS (Lee, Cansizoglu et al. 2006) wurde von Chook und Mitarbeiter als „PY-NLS“ benannt und noch weiter charakterisiert (Suel, Gu et al. 2008). Sie sind verschiedenartig in Bezug auf Sequenz und

Struktur, haben jedoch ein gemeinsames C-terminales Motiv und können je nach N-terminalem Motiv in hydrophobe und basische Subgruppen unterteilt werden. 2008 wurde diese auch in vivo als neue Gruppe von NLS bestätigt (Lange, Mills et al. 2008).

Neben diesen beiden Gruppen existieren noch Cargos mit weiteren "nonclassical" NLS (Übersichtsarbeit von McLane und Corbett (McLane and Corbett 2009)).

Substrate, welche für den Export aus dem Nukleus bestimmt sind, enthalten ebenfalls eine Signalsequenz. Diese werden als „nucleus export signals“ (NES) bezeichnet (Stade, Ford et al. 1997). Das am besten charakterisierte ist das hydrophobe Leucin-reiche NES, bestehend aus drei bis vier hydrophoben Residuen (Fischer, Huber et al. 1995). Es sind bereits wenigstens 75 verschiedene Proteine mit dieser Signalsequenz bekannt (la Cour, Gupta et al. 2003). Standard Transportprotein ist das Exportin (Crm1 – **C**hromosome **m**aintenance **r**egion **1**) (Ossareh-Nazari, Gwizdek et al. 2001), welches verschiedenste Substrate mit oder ohne Adapterprotein transportieren kann (Johnson, Lund et al. 2002). Mit RanGTP erfolgt der Transport durch die Kernpore. Substrate ohne klassische hydrophobe NES werden über andere Transporter befördert. Ein Beispiel hierfür ist Pho4 (Komeili and O'Shea 1999). Phosphorylierung des Substrates führt zum Erkennen durch den Transporter und damit zum Export (Mosammaparast and Pemberton 2004). Neben Proteinen werden auch verschiedene Arten von RNA exportiert. Exportin 5 erkennt an tRNA und microRNA Vorläufern eine Haarnadel Struktur am 3' Ende als NES (Yi, Qin et al. 2003). Für mRNA wird kein Karyopherin benötigt, hierfür werden Proteine aus der TAP/NFX Familie verwendet (Lei and Silver 2002).

Der nächste Schritt im Import besteht in der Translokation durch die Kernpore. Dies wird durch Interaktion von Importinen mit speziellen Nukleoporinen mit charakteristischen Phenylalanin- und Glycin-reichen Sequenzabschnitten (FG-Nukleoporine) in Hefezellen (Rout, Aitchison et al. 2000) und Säugetierzellen (Cronshaw, Krutchinsky et al. 2002) ermöglicht. Diese sind mit ~20–30

Wiederholungen (repeats) pro FG-Nukleoporin vertreten. Neben den Phenylalanin- und Glycin-reichen Sequenzabschnitten existieren noch weitere Motive, wie beispielsweise die GLFG (Glycin–Leucin–Phenylalanin–Glycin) (Rout, Aitchison et al. 2000), welche in verschiedenen eukaryontischen Zellen unterschiedlich exprimiert werden. Die Bindung des Transportrezeptors an die FG-Motive geschieht über die Phenylalaninseitenketten in Einbuchtungen der Karyopherine (Bayliss, Ribbeck et al. 1999), (Bayliss, Littlewood et al. 2000). Die Interaktion ist jedoch von geringer Affinität. Eine zu starke Bindung würde den weiteren Transport behindern (Bayliss, Ribbeck et al. 1999). Dieser ist ein bidirektionaler und schneller Vorgang (<10ms) (Kubitscheck, Grunwald et al. 2005), welcher nicht durch die Pore selbst beeinflusst wird, sondern durch die Ran vermittelte Freisetzung der Transportkomplexe im Nukleus (Yang, Gelles et al. 2004). Welches Substrat transportiert wird, hängt von den verfügbaren Transportrezeptoren ab (Macara 2001). Ebenso können Transportkomplexe schneller den NPC passieren als die Rezeptoren allein (Kubitscheck, Grunwald et al. 2005).

Nach Einteilung auf Grund der Sekundärstruktur durch Devos et al. werden FG-reiche Nup`s der dritten Gruppe zugeordnet (Devos, Dokudovskaya et al. 2006), welche sich durch die erwähnten FG-Domänen in Kombination mit einer Doppelwendelstruktur ausweisen. Darüber hinaus können auch β -Propellerfaltungen beobachtet werden (Napetschnig, Blobel et al. 2007), welche als Plattform für verschiedenartige Proteininteraktionen dienen. Nach Rout et al. werden die FG-Nup`s in asymmetrische, welche entweder nukleoplasmatisch oder zytosolisch lokalisiert sind und symmetrische, welche auf beiden Seiten ausgerichtet sind, unterteilt (Rout, Aitchison et al. 2000). Die Verteilung ist jedoch nicht streng getrennt, vielmehr kommt es zu Überlappungen, was auch der Flexibilität und Reichweite einzelner FG-Nup`s geschuldet ist (Fahrenkrog, Maco et al. 2002), (Paulillo, Phillips et al. 2005). Neben einer scharf definierten Domäne, welche für die Verankerung eines FG-Nup`s verantwortlich ist (Alber, Dokudovskaya et al. 2007), besitzen sie auch eine unstrukturierte Domäne (Bayliss, Littlewood et al. 2000), die aufgefaltet ist oder sich nur durch eine geringe Sekundärstruktur auszeichnet (Denning, Patel et al. 2003).

Diese unstrukturierten Domänen bilden eine Art Wolke oder Netzwerk, die den zentralen Kanal okkludieren könnte. Ihre Rolle wird durch unten angeführte Theorien diskutiert.

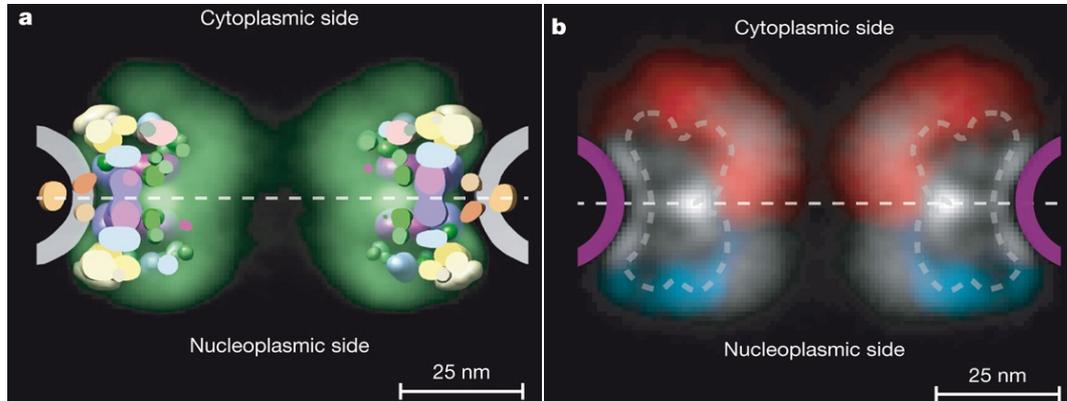


Abbildung 5: aus (Alber, Dokudovskaya et al. 2007) **a:** Schnitt durch einen NPC. Die dargestellten Nucleoporine sind entsprechend ihrer Lokalisation und Volumina (Alber, Dokudovskaya et al. 2007) dargestellt. Die farbliche Darstellung der Nucleoporine entspricht der aus Abbildung 3. Die unstrukturierten FG-Domänen werden als grüne Wolke mittels der Chimera-Technik (Pettersen, Goddard et al. 2004) dargestellt. **b:** Darstellung der wahrscheinlichen Lokalisation der FG-Nup`s. Rot dargestellt sind exklusiv zytoplasmatisch lokalisierte FG-Nup`s (Nup42, Nup100, Nup116 und Nup159), blau für die nukleoplasmatische Lokalisation (Nup60, Nup145N und Nup1). In weißer Farbe werden zu beiden Seiten ermittelte Nup`s gehalten (Nup49, Nup53, Nup57, Nup59 and Nsp1). Die Äquatorialebene ist mit einer weiß-gestrichelten Linie dargestellt, grau-gestrichelt der NPC und violett die Kernmembran. Überlappungen der einzelnen FG-Regionen sind durch Farbübergänge erkennbar. Eine 25nm Skala zeigt die Größenrelation. Die korrespondierenden Vertebraten Nucleoporine können aus Abbildung 3 entnommen werden.

Bezogen auf die Masse eines NPC nehmen die FG-Nup`s etwa ein Drittel ein (Denning, Patel et al. 2003). Durch ihre symmetrische Ausbildung mit 8 -16 Kopien eines Nup/NPC (Rout, Aitchison et al. 2000), (Cronshaw, Krutchinsky et al. 2002) sorgen wenigstens 128 FG-Domänen mit ihren Wiederholungen dafür, dass ein Transportkomplex mit einem der ca. 3500 FG-repeats in Verbindung treten kann (Strawn, Shen et al. 2004). Dies entspricht etwa einer Konzentration an FG-Sequenzen von ca. 10mM oder ~ 200-300mg/ml (Bayliss, Ribbeck et al. 1999). Bei derartigen Relationen stellt sich die Frage, welche Rolle die FG-Nucleoporine im Gefüge des NCT einnehmen. Ob sie nur eine Art Barrierefunktion einnehmen, essentiell für den Transport sind, sich aktiv am Transport beteiligen, richtungsweisend oder gar verantwortlich für den selektiven Transport bestimmter Cargos sind.

Am Beispiel des Nukleoporin Nup358 wird im Folgenden der „Andockprozess“ an die Kernpore beschrieben (aus der Übersichtsarbeit von (Sorokin, Kim et al. 2007)). Dieses zytoplasmatisch gelegene Nup bindet das Importsubstrat via Importin β als auch Ran (Wu, Matunis et al. 1995) und wird deshalb auch als RanBP2 bezeichnet (Sorokin, Kim et al. 2007). Es nimmt bei den weiteren FG–Nup`s eine Sonderstellung ein, da es selbst bei vermindertem RanGTP Gradienten das bevorzugte Bindungsprotein darstellt (Delphin, Guan et al. 1997). Die Interaktion von Komplex und RanBP2 ist energieabhängig, der kleine Pool an RanGTP wird durch den Transportfaktor Mog1p gewährleistet (Oki and Nishimoto 2000). Damit es durch RanGTP nicht zu einer vorzeitigen Dissoziation des Transportkomplexes kommt, befindet sich an RanBP2 eine enzymatisch modifizierte Form von RanGAP, welche eine schnelle Hydrolyse nach Interaktion mit Importin β gewährleistet (Lounsbury and Macara 1997). Der Transportkomplex wird nun nach Hydrolyse in der Nähe des Zentralkanals freigegeben und durchgeschleust. Es sei jedoch vermerkt, dass dieser von Sorokin et al. beschriebene Prozess nur ein Beispiel ist und mit Einschränkungen bewertet werden muss. Zum einen ist der Ran Gradient zwischen Zytosol und Nukleus die treibende Kraft der Transportrichtung (Moore and Blobel 1993). Zum anderen ist Nup358 als asymmetrisches Nukleoporin für den Transport verzichtbar (Strawn, Shen et al. 2004).

Den genauen Mechanismus wie der NCT vonstattengeht, besonders die Passage durch den Zentralkanal ist bis heute nicht ausreichend geklärt und Teil unterschiedlicher Modellansätze. Es ist allgemein anerkannt, dass die FG–Domänen als Teil der NPC Barriere fungieren (Ben-Efraim and Gerace 2001), (Macara 2001), (Ribbeck and Gorlich 2002) (aus der Übersichtsarbeit (Lim, Aebi et al. 2008)).

Vor der Entdeckung der Rolle von Karyopherinen entwickelte Akey ein Modell, indem der Zentralkanal über eine Art Verschlussmechanismus oder Transporter verfügt (Akey 1989), (Akey 1990), welcher sich ähnlich der Iris öffnet und so das Substrat passieren lässt.

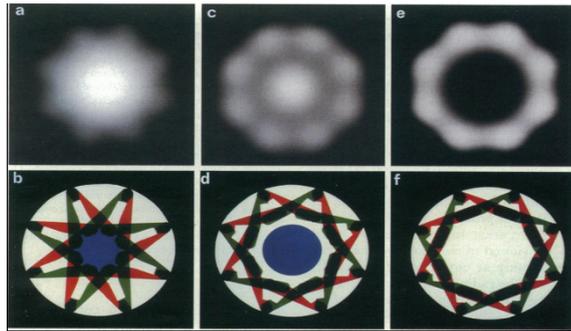


Abbildung 6: aus (Akey 1990): Verschiedene Transportkonfiguration im “double iris model” mit Buchstabennummierungen (rechts oben a-e). In der oberen Zeile sind elektronenmikroskopische Aufnahmen zu sehen, in der unteren Zeile Schemazeichnungen. a und b zeigt das Andocken eines Substrates, c und d während des Transportvorganges und e und f in der geöffneten Form.

In diesem Modell wurden bereits Grundlagen gegenwärtiger Transportmodelle propagiert (Akey and Goldfarb 1989).

Im „virtual gating model“ (Rout, Aitchison et al. 2003), vormals „Brownian gating model“ (Rout, Aitchison et al. 2000) blockieren die unstrukturierten FG-Domänen aufgrund ihres entropischen Verhaltens den Zentralkanal und werden auf diese Weise zu einer physikalischen Barriere, welche nur von Substrat-Rezeptorkomplexen und ihrer Interaktion mit den FG-Nup's passiert werden können.

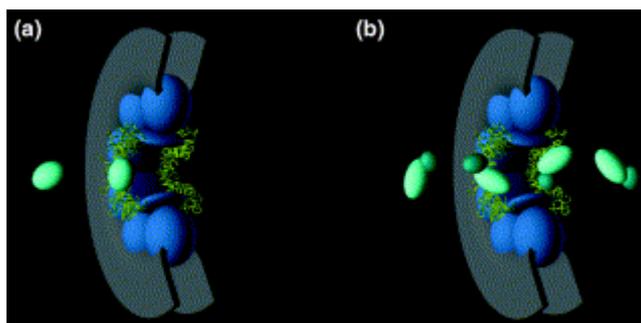


Abbildung 7: aus (Rout, Aitchison et al. 2003): Das „virtual gating model“ Es zeigt das Verhalten (a) eines Substrates (türkis) ohne Transportrezeptor und (b) mit einem Transportrezeptor (grün) mit Substrat (türkis). Nur mit Hilfe eines Rezeptors gelingt die Passage durch die Kernpore NPC (blau).

Für dieses Modell sprechen einige Argumente. Wie oben bereits erwähnt, ist im Zentralkanal eine hohe Konzentration an FG-Motiven zu verzeichnen (Bayliss,

Ribbeck et al. 1999). Zusammen mit der Tatsache, dass die FG-Motive ungeordnet und in hohem Maße unstrukturiert sind (Denning, Patel et al. 2003), kann diese Kombination in der Lage sein den Zentralkanal zu okkludieren und so eine physikalische Barriere für Makromoleküle darstellen (Lim, Huang et al. 2006). Ebenso wurde in theoretischen Studien gezeigt, dass die FG-Filamente den Transport steigern können (Zilman 2009). Lim et al. konnten an Hand von Nup153 ebenfalls zeigen, dass periphere FG-Nukleoporine, unstrukturiert in der Konfiguration, eine bürstenartige Konformation annehmen. Auf diese Weise bilden sie eine entropische Barriere (Lim, Huang et al. 2006). Die Bindung eines Transportkomplexes an die FG-Motive könnte diese entropische Barriere durchbrechen und so einen signifikanten kinetischen Vorteil für ein gebundenes Cargo bedeuten. Diese Barriere kann durch Temperaturabfall (Auroy, Mir et al. 1992) zusammenbrechen, was die von Shulga und Goldfarb beschriebene Störung des Tormechanismus eines NPC erklären könnte (Shulga and Goldfarb 2003). Ebenso kann durch Zugabe/Wegnahme von Hexanediol ein Kollaps/Aufrichtung der Bürstenkonformation erreicht werden (Shulga and Goldfarb 2003). In einem weiteren in vitro Versuch wurden von Lim et. al Kap β 1, RanGTP und RanGDP mit den FG-Domänen in Verbindung gebracht. Kap β 1 führt zu einem Kollaps der Bürstenkonformation und durch Sequestration von Kap β 1 durch RanGTP wieder zu einem Aufrichten (Lim, Fahrenkrog et al. 2007).

Allerdings sprechen auch Argumente gegen diesen Ansatz. Strawn et al. konnten zeigen, dass mehr als die Hälfte der FG-Motive depletiert werden kann, ohne dass sich ein Verlust der Transportfähigkeit eines NPC erreicht wird (Strawn, Shen et al. 2004). Darüber hinaus sind auch die zytoplasmatischen Fibrillen für den NCT entbehrlich (Walther, Pickersgill et al. 2002). Eine Depletion von 5 asymmetrischen Fibrillen reduziert die Transportkapazität eines NPC nur um den Faktor 3-4 (Strawn, Shen et al. 2004).

Das „oily-spaghetti“ Modell wurde von Macara eingeführt (Macara 2001). Normalerweise ist der Zentralkanal durch die FG-Domänen okkludiert. Ein

Substrat-Rezeptorkomplex kann sich daran vorbeischieben. Dabei werden nicht interagierende FG-Domänen beiseitegeschoben.

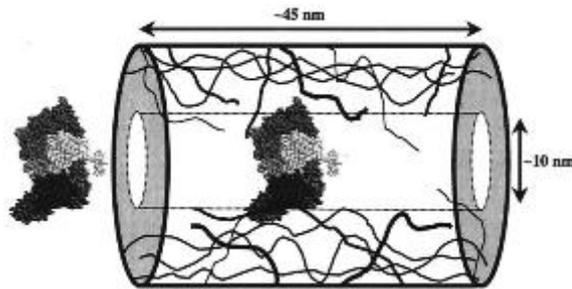


Abbildung 8: aus (Macara 2001): Das „oily-spaghetti“ Modell. Moleküle >10nm können nicht durch die Pore diffundieren, sie werden durch die FG-Domänen (zufällig gezeichnete Striche) abgehalten. Substrat-Rezeptorkomplexe binden via Transportprotein mit schwachen intermolekularen Wechselwirkungen an den FG-Domänen und können so hindurchdiffundieren. Die Richtung wird dabei durch RanGTP vorgegeben und nicht durch die Pore selbst.

Bei dem „affinity gradient model“ von Ben-Efraim und Gerace werden Transportkomplexe mit Importin β durch Bindung an FG-Nukleoporine mit steigender Affinität schrittweise transportiert (Ben-Efraim and Gerace 2001).

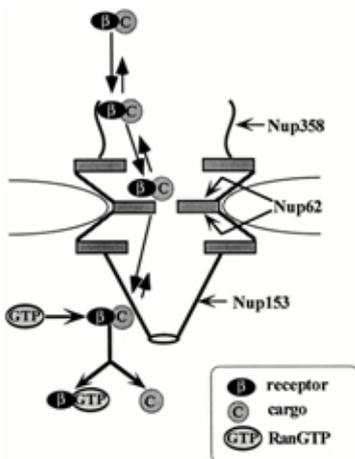
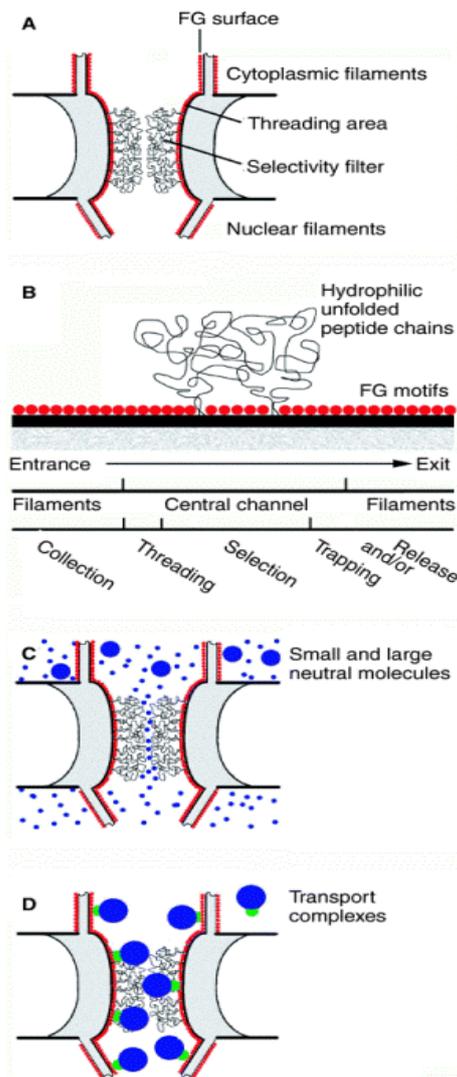


Abbildung 9: aus (Ben-Efraim and Gerace 2001): Das „affinity gradient model“ für den Import von Substraten mit Importin β

“.....In conclusion, we propose that the increasing affinity of importin β for nucleoporins that are localized progressively closer to the nucleoplasmic surface of the NPC contributes to the directional movement of import complexes through the NPC. This mechanism would clearly enhance the efficiency of directional nuclear transport that is promoted by compartmentalization of different components of the Ran system.” (Ben-Efraim and Gerace 2001)

Phytilla und Rexach konnten ebenfalls zeigen, dass die Affinität für den Importin α : β Import in zunehmendem Maße ansteigt (Pyhtila and Rexach 2003) und die treibende Kraft im nukleären Import spielen könnte. Jedoch ist der gerichtete Transport von Transportkomplexen ein umkehrbarer Prozess. Eine Umkehr des RanGTP Gradienten führt zu einem reversen Transport (Nachury and Weis

1999). Des weiteren zeigten kinetische Messungen, dass Interaktionen basierend auf hoher Affinität für einen Transport entbehrlich sind (Ribbeck and Gorlich 2001). Am Beispiel von Nup60 weisen Matsuura und Stewart den FG–Nukleoporinen eher eine katalytische Rolle zu (Matsuura and Stewart 2005).



Das „reduction of dimensionality model“ von Peters sieht die Transportrezeptoren als Föhren, welche an den Oberflöhchen von FG–Nup’s entlang gleiten (Peters 2005). Eine kontinuierliche Oberflöhche an FG–Nup’s zieht sich durchgehend von zytoplasmatischer zur nukleoplasmatischen Seite. Die Transportrezeptoren binden an den FG „Rasen“ und gleiten in 2 D Weise durch den Zentralkanal. Den FG–Domänen wird ebenfalls eine Filterfunktion zugesprochen, ohne dass es zu einer Obstruktion des Zentralkanals kommt. Dadurch wird die passive Diffusion von Ionen und kleinen Molekülen ermöglicht. Einzelnen inerten Molekülen ohne Transportrezeptor bleibt auf Grund fehlender FG-Interaktion eine Passage verwehrt.

Abbildung 10: aus (Peters 2005): Das “Reduction-of-dimensionality model” **A:** Der NPC wird als großer Kanal dargestellt, welcher durch FG Motive (rot dargestellt) ausgekleidet ist und als Bindungsstelle für Transportrezeptoren dient. Der Zentralkanal ist mit einem losen Netzwerk von hydrophoben ungefalteten Peptidketten ausgefüllt. **B:** Die FG Oberflöhche wird in verschiedene Regionen eingeteilt. Während in dem filamentösen Abschnitt die Transportkomplexe gesammelt werden, werden sie im Zentralkanal durchgeleitet, um dann wieder auf der gegenüberliegenden filamentösen Seite entlassen zu werden. **C:** Kleine Moleküle, wie Ionen können via Diffusion den NPC passieren, große inerte Moleküle ohne Transportrezeptor können nicht passieren. **D:** Transportkomplexe binden an Filamente oder dem Kanaleingang, um in zufälliger 2D Manier dem Kanalausgang überführt zu werden.

Im „selective phase model“ von Ribbeck und Görlich (Ribbeck and Görlich 2001), (Ribbeck and Görlich 2002) nimmt der Zentralkanal eines NPC einen Durchmesser von 40nm ein, welcher den Transport von Makromolekülen dieser Größe gewährleistet (Pante and Kann 2002). Jedoch ist dieser Kanal nicht vollständig offen, sondern wird durch eine Phase aus FG-repeats okkludiert, welcher nur für Transportkomplexe passierbar ist. Grundgedanke ist hierbei, dass jede lösliche Phase durch Interaktionen mit löslichen Molekülen gekennzeichnet ist. Die FG-Domänen werden untereinander durch schwache hydrophobische Kräfte angezogen und formen auf diese Weise ein Netzwerk, welches den Durchtritt von inerten hydrophilen Molekülen verhindert. Eher hydrophobe Transportkomplexe können jedoch mit den FG-repeats interagieren und so einen Durchtritt ermöglichen. Es gibt durchaus Anzeichen, dass die Überlegungen von Ribbeck und Görlich auch einen Schritt in die richtige Richtung bedeuten können. Das Hefenukleoporin Nsp1 kann in der Tat ein makroskopisches Hydrogel ausbilden (Frey, Richter et al. 2006), jedoch wird nicht zwischen inertem Substrat und Transportkomplex unterschieden. Erst wenn die Konzentration des Hydrogels auf ~50mM angehoben wird, entsteht ein geordnetes Netzwerk mit Barrierefunktion auf Grund der kohäsiven Kräfte zwischen den FG-Motiven. Es entsteht ein „gesättigtes Gel“ (Frey and Görlich 2007). Es konnte eine Barriere für inerte Moleküle generiert und annähernd gleiche Transportraten wie beim Transport in eine Kernpore erreicht werden (Kubitscheck, Grunwald et al. 2005). Der Importin β vermittelte Durchtritt eines Cargos war um den Faktor 20000 schneller als alleinig.

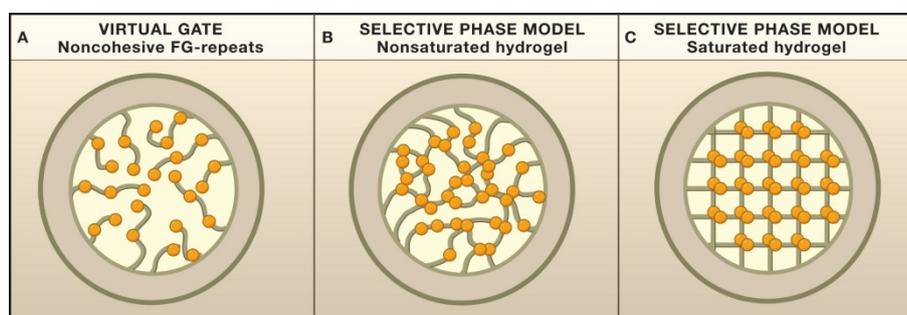


Abbildung 11: aus (Weis 2007): schematische Darstellung wie FG–Domänen eine Selektivität erreichen können. **A:** zeigt das „virtual gate model“ von Rout (Rout, Aitchison et al. 2003), in welchem FG-repeats (orange) eine entropische Barriere bilden. Die Interaktion mit den FG-repeats erleichtert den Durchtritt. **B:** Im „selective phase model“ (Ribbeck and Gorlich 2001) bilden die FG–Filamente durch Interaktionen ein 3D Maschenwerk, welches inerten Substraten die Passage verwehrt. **C:** Das „saturated hydrogel“ von Frey und Görlich (Frey and Gorlich 2007) zeichnet sich durch ein Maximum an FG–Interaktionen aus. Es wird ein geordnetes Maschenwerk gebildet.

Jedoch können auch die Ergebnisse von Ribbeck und Görlich (Ribbeck and Gorlich 2001) als auch von Frey et al. (Frey and Gorlich 2007) kritisch hinterfragt werden. Zum einen ist das von Frey et al. generierte Modell in einem unphysiologischen Rahmen entstanden (Patel, Belmont et al. 2007), (Frey and Gorlich 2007). Zum anderen ist die adäquate Ausbildung eines Maschenwerkes auch abhängig von der Konzentration der beteiligten FG–Nup`s (Frey and Gorlich 2007), so dass ähnlich wie beim „virtual gate model“ von Rout et al. (Rout, Aitchison et al. 2003) die oben beschriebenen Argumente dagegen sprechen.

Patel et al. haben auf der Basis eines „low affinity assays“ ein „two-gate“ Modell entworfen, welches die Eigenschaften des „virtual gate model“ und des „selective phase model“ kombiniert (Patel, Belmont et al. 2007). Während die eher peripher lokalisierten FxFg-Domänen eher als entropische Barriere fungieren, bilden die GLFG-Domänen ein kohäsives Netzwerk. Jedoch kann auch dieses Modell nur mit Einschränkungen betrachtet werden. Die GLFG-Domänen sind größtenteils nur in Hefezellen lokalisiert (Suntharalingam and Wente 2003) und bei Wegnahme einer der beiden Modellkomponenten konnte keine suffiziente Barriere für den selektiven Transport gebildet werden (Patel, Belmont et al. 2007).

Es sind für die Rolle der FG-Nukleopore eine Vielzahl an möglichen Modellen präsentiert worden. Exemplarisch wurden einige Modelle (Ben-Efraim and Gerace 2001), (Macara 2001) (Patel, Belmont et al. 2007), (Peters 2005) (Ribbeck and Gorlich 2001), (Rout, Aitchison et al. 2003) z. T mit Vor- und Nachteilen dargestellt. Welcher Ansatz zur Lösung der Fragestellung führt,

muss abgewartet werden. Gesichert ist jedoch die Rolle der FG-Nukleoporine am nukleozytoplasmatischen Transport.

Nachdem der Transportkomplex auf der nukleoplasmatischen Seite der Kernpore angekommen ist, erfolgt die Dissoziation. Die Bindung von RanGTP an Importin β führt zu einer Konformationsänderung und zu einer Lösung von dem Importin α /Substrat (Lee, Matsuura et al. 2005). Die nun frei gewordene IBB konkurriert mit der NLS um die Bindungsstelle von Importin α und führt durch diese Autoinhibition zur Freisetzung des Transportsubstrates (Kobe 1999). Bei diesem Prozess sind zwei Nukleoporine von entscheidender Bedeutung: Nup1 und Nup2 (Hefe) bzw. Nup153 und Nup50 (Vertebrat). Besonders Nup153 als Teil der filamentösen Korbstruktur bindet den Transportkomplex mit hoher Affinität. Dadurch akkumulieren die Komplexe an der nukleären Seite und RanGTP kann mit höherer Wahrscheinlichkeit an Importin β binden. Die Dissoziation wird um das 447fache beschleunigt (Gilchrist, Mykytka et al. 2002).

Nach der Freisetzung des Transportsubstrates müssen die Rezeptoren wieder zum Zytosol gelangen. Importin β wird mit RanGTP gebunden exportiert (Chi, Adam et al. 1997). Da aber dies eine sehr feste Verbindung ist, muss RanGTP wieder in die Diphosphat Form überführt werden. Zu diesem Zweck befinden sich auf zytosolischer Seite RanGAP oder die sumoylierte Form von RanGAP. Diese steigert die GTPase um das 10.000fache (Bischoff, Klebe et al. 1994) in Kombination mit dem Ran Bindeprotein RanBP1 sogar um den Faktor 100.000 (Bischoff, Krebber et al. 1995). Als RanGDP löst sich die Bindung von Importin β und gibt das Karyopherin frei. Dieses Prinzip gilt auch für den Export von Substraten mit einem NES. Hier bildet sich ein Komplex aus Exportin 1 (Crm1) und RanGTP. RanBP3 bindet direkt an Exportin 1 und erhöht so die Affinität für Ran und das Substrat zusätzlich (Lindsay, Holaska et al. 2001). Das im Zytosol frei gewordene RanGDP wird durch den Transportfaktor NTF2 in den Nukleus transportiert, wo der Austauschfaktor RanGEF wieder RanGTP generiert (Bischoff and Ponstingl 1991).

Importin α wird mit CAS und RanGTP wieder in das Zytosol transportiert, wo wiederum RanGAP eine Dissoziation bewirkt. Die IBB blockiert die NLS-

Bindungsstellen und ist Voraussetzung für einen reibungslosen Transport (Matsuura and Stewart 2004). Die folgende Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des klassischen nukleären Imports.

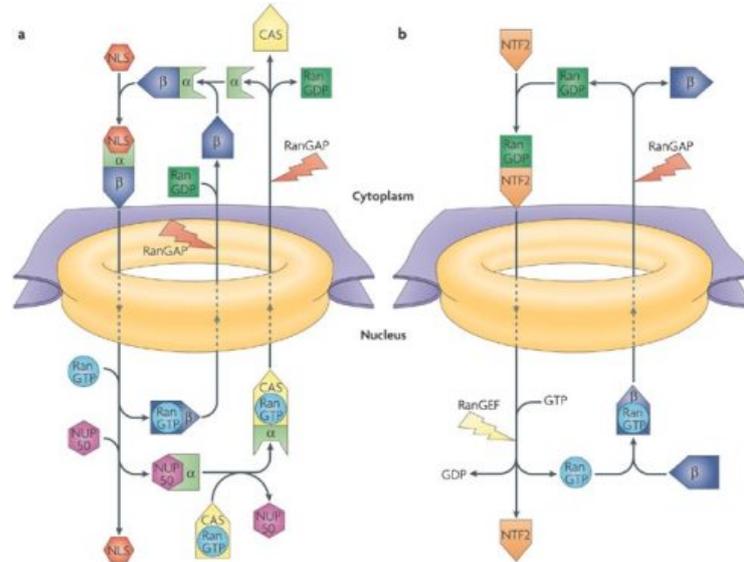


Abbildung 12: aus (Stewart 2007): schematische Darstellung des klassischen nukleären Imports. **a:** Beladung eines NLS-Proteins mit Importin β und α . Anschließend RanGTP vermittelte Dissoziation im Nucleus. Nucleoporine, wie Nup50 (Nup2 in der Hefe) verstärken diesen Vorgang. Anschließend rezipitulieren die beiden Transportfaktoren wie oben beschrieben wieder ins Zytosol. RanGAP führt dort wieder zu einer Freisetzung. **b:** parallel ablaufender RanGTP Zyklus. Blitze zeigen sowohl in a als auch in b die energieabhängigen Prozesse.

Neben dem hier vorgestellten Ran-abhängigen Transport existieren auch Ran-unabhängige Transportwege. Hierzu sei auf die Übersichtsarbeiten von Pemberton und Paschal sowie auf Sorokin et al. verwiesen (Pemberton and Paschal 2005), (Sorokin, Kim et al. 2007).

Der Transport von Makromolekülen bedarf eines kontrollierten Systems, welches den zielgerichteten Ex- und Import gewährleistet. Aus in vitro Transportstudien und mit Hilfe der „molecule fluorescence microscopy“ konnte gezeigt werden, dass ein NPC eine Kapazität von ~1000 Molekülen/sec aufweisen kann und es zu einem Durchfluss von mind. 10 Molekülen gleichzeitig kommt (Ribbeck and Gorlich 2001), (Yang, Gelles et al. 2004). Wie aber bereits oben beschrieben, ist nicht nur ein NPC allein für den korrekten Ablauf eines Transportes verantwortlich. Sowohl das Transportsubstrat, als auch der Transporter können verständlicherweise den Transportprozess beeinflussen. Es stellt sich die Frage, welche Regulationsmechanismen den reibungslosen Ablauf sicherstellen.

In ihrer Übersichtsarbeit haben Terry et al. die verschiedenen Mechanismen hierarchisch gegliedert (Terry, Shows et al. 2007).

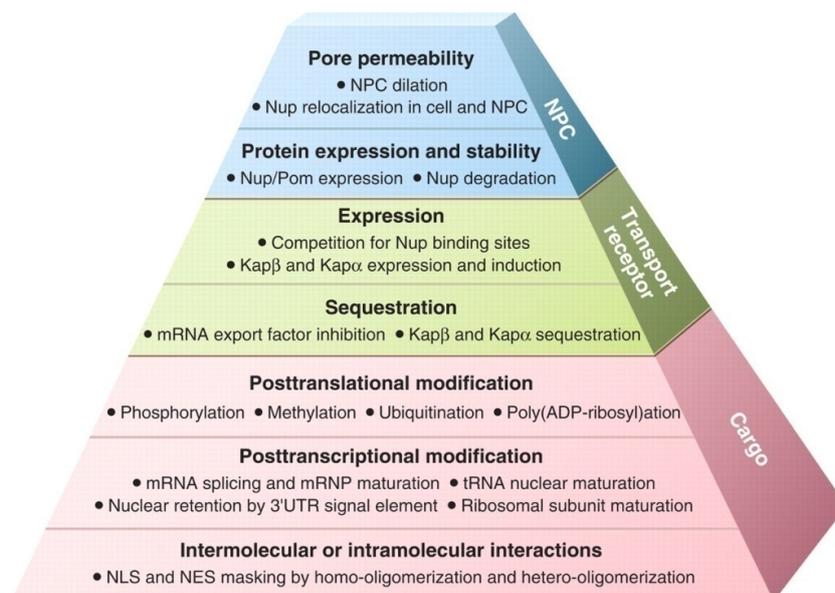


Abbildung 13: aus (Terry, Shows et al. 2007): Regulation des nukleozytoplasmatischen Transports in Bezug auf das Transportsubstrat (rosa), den Transportrezeptor (grün) und der Kernpore (blau). Auf der rechten Seite findet sich die hierarchische Gliederung mit den jeweils zugehörigen Mechanismen.

Die weitreichendsten Folgen zeigen sich bei Veränderungen an den NPCs selbst, da hier verständlicherweise die gesamten Transportvorgänge in Mitleidenschaft gezogen werden. Aber auch auf Höhe des Substrates sind

imminente Folgen für die Zelle zu verzeichnen. Exemplarisch soll hier die Rolle der Kernporen bei der Transportregulation dargestellt werden.

Dies wurde bereits im Jahre 1985 von Blobel im Rahmen der „gene gating“ Hypothese postuliert (Blobel 1985). Der NPC nimmt in der Tat in der Hierarchie der Transportregulation den obersten Platz ein. Als „Torwächter des Nukleus“ (Wente 2000) haben Konformationsänderungen mit die weitreichendsten Folgen. Mit der Injektion von Glucokortikoiden in *Xenopus* Eier konnte eine massive Dilatation der NPCs erreicht werden (Shahin, Albermann et al. 2005). Diese „Rieseporen“ mit einem Durchmesser von bis zu 300nm (Kastrup, Oberleithner et al. 2006) waren dem selektiven Transport entzogen und nunmehr auch dem passiven Einstrom von Makromolekülen zugänglich. Dies ist ein Beispiel, wenn NPCs ihre Regulations- und Filterfunktion nicht wahrnehmen können. Unter geordneten Bedingungen werden durch den ansonsten 10nm großen Kanal (Fried and Kutay 2003) Transportkomplexe bis zu 39nm Durchmesser durchgeschleust, vorausgesetzt die oben beschriebenen Startkonditionen wurden erfüllt (Pante and Kann 2002). Mit zunehmender Zellalterung verlieren jedoch auch NPCs ihre Fähigkeit große Makromoleküle zu transportieren und beeinflussen auch in dieser Weise die Transportregulation (Feldherr and Akin 1991).

NPCs zeigen ähnlich wie Karyopherine (Kohler, Speck et al. 1999), (Kohler, Anseau et al. 1997) gewebespezifische Unterschiede. So konnte die Splicevariante NupBS-63 von Nup358 nur in den Keimzellen des Hodens nachgewiesen werden (Cai, Gao et al. 2002). Tran und Wente bezeichnen in ihrer Übersichtsarbeit Nup358 als „Grand Central Station“, was die Bedeutung dieses Nukleoporin als „Umschlagplatz“ für die Entladung der Transportkomplexe und Recycling der Transportrezeptoren verdeutlicht (Tran and Wente 2006). Ein Fehlen von Nup154 (ein Homolog von Nup155) in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zeigt eine signifikante Störung der Gametendifferenzierung und somit auch die funktionelle Bedeutung einzelner Nukleoporine (Gigliotti, Callaini et al. 1998). Auch Viren nutzen via Modifikation einzelner Nup`s dies zu ihrem Vorteil (Satterly, Tsai et al. 2007). Influenzaviren inhibieren selektiv mRNA-Exportfaktoren, von welchen sie nicht selbst abhängig

sind und regulieren gleichzeitig Nup98 herunter. Dies steht in direktem Gegensatz zu Interferon γ , welches im Zuge der Immunantwort dieses Nup hochreguliert (Enninga, Levy et al. 2002).

Regulationsmechanismen des NCT, sei es Modifikation am Transportsubstrat, dem Transportrezeptor oder dem NPC selbst können zu verschiedensten Veränderungen der Zellregulation, im schlimmsten Fall zur Neoplasie führen.

1.4 DEK und CAN

Das Nukleoporin214 ist auf der nukleozytoplasmatischen Seite einer Kernpore lokalisiert und ein Teil des filamentösen Systems (Alber, Dokudovskaya et al. 2007). Es enthält sowohl FG- als auch FxFG-repeats. Die N-terminale Domäne unterliegt einer β -Propeller-Struktur, gefolgt von einer an Serin- und Prolinreichen Sequenz und zwei Abschnitten einer Doppelwendelstruktur. Die unstrukturierte Domäne mit ~ 800 AS-Residuen befindet sich am C-terminalen Ende (Weirich, Erzberger et al. 2004), (Napetschnig, Blobel et al. 2007). Über das N-terminale Ende ist Nup214 auf der zytoplasmatischen Seite eines NPC nahe der Ringstruktur verankert. Dagegen ist das C-terminale Ende flexibel und kann je nach Transportrichtung auf beiden Seiten der Kernpore lokalisiert werden (Paulillo, Phillips et al. 2005). Die Spannweite der unstrukturierten FG-Domänen beträgt ~ 275 nm (Strelkov, Herrmann et al. 2002). Die Expression dieses Nukleoporins ist, wie oben beschrieben von spezifischen Geweben abhängig. Besonders in proliferationsaktiven Gewebearten wie den Keimzellen, dem Thymus oder den hämatopoetischen Zellen ist eine überdurchschnittliche Expression dieses Proteins zu verzeichnen (Su, Wiltshire et al. 2004).

Zu der Namensgebung im Jahre 1994 kam es über Umwege zu der heute gebräuchlichen Nomenklatur (Kraemer, Wozniak et al. 1994).

Erstmalig wurde dieses Nukleoporin als potentielles Onkogen im Rahmen einer akuten myeloischen Leukämie beschrieben. Eine chromosomale Translokation (6;9) (p23;q34) verband die Gene von DEK (siehe unten) und CAN. Letzteres wurde aufgrund der Nähe zu dem c-Abl Gen „Cain“ (CAN) genannt (von Lindern, Fornerod et al. 1992). Eine weitere beschriebene inverse Translokation (9;9) (q32;q34) führte zu einer Fusion von SET und CAN Genen (von Lindern, van Baal et al. 1992). Kraemer et al. konnten anhand identischer Peptidsequenzen aus ihrer Arbeit zeigen, dass CAN mit deren zytoplasmatisch lokalisierten Nukleoporinen identisch ist. Auf Grund des Molekulargewichts von 214kDa wurde Nup214 als neuer Terminus vorgeschlagen (Kraemer, Wozniak et al. 1994).

Als Subkomplex mit Nup88 (Fornerod, van Deursen et al. 1997) wird ihm eine Rolle im nukleären Transport zugewiesen. Es fungiert als Bindungsstelle für Exportin 1 (Crm1) (siehe oben) und rekrutiert durch die N-terminale Domäne die RNA Helicase Dbp5, welche als Co-Faktor für den mRNA Export beschrieben wurde (Weirich, Erzberger et al. 2004). Veränderungen an der Proteinkonformation führten zu einer gestörten Bindung von Dbp5 und damit zum Erliegen des mRNA Exports. Seine Rolle in der Embryogenese konnten van Deursen et al. belegen. Eine Depletion von Nup214 war für Mäuseembryonen letal und führte zu einem Absterben in utero bereits nach wenigen Tagen (van Deursen, Boer et al. 1996). Es kam zu einem Arrest in der G2-Phase des Zellzyklus. Ebenso sind spezifische Substrate von der Anwesenheit von Nup214 bzw. des Subkomplexes mit Nup88 abhängig. Eine Depletion von Nup214 führt zu einem signifikanten Exportin-vermittelten Mindertransport von NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) (Hutten and Kehlenbach 2006), welcher im Rahmen der Immunantwort eine wichtige Rolle spielt (Crabtree and Olson 2002). Der Nukleoporin Subkomplex ist ebenso ausschlaggebend für den Exportin-vermittelten Transport von 60s Ribosomenpartikeln (Bernad, Engelsma et al. 2006).

Neben „physiologischen“ Transportsubstraten nützen Viren ebenfalls die Interaktion mit diesem Nukleoporin. Das HI-Virus 1 nutzt Exportin als Rezeptor für den Transport seines Regulators Rev. Eine überexprimierte Variante einer defekten und verkürzten Variante von Nup214 führte zur erfolgreichen Retention dieses Virusregulators (Bogerd, Echarri et al. 1998).

Diese Beispiele weisen Nup214 eine eher Export orientierte Rolle zu. Dafür spricht auch, dass die zytoplasmatischen Fibrillen für den nukleären Import entbehrlich sind (Walther, Pickersgill et al. 2002). Jedoch spielt Nup214 auch eine wichtige Rolle im Import. Der Vitamin-D-Rezeptor ist ein Liganden abhängiger Transkriptionsfaktor, welcher in den Nukleus transportiert werden muss. Nup214 kommt hier eine Modulationsrolle zu. Eine Überexpression des C-terminalen Endes von Nup214 führt zu einer reduzierten Aktivierung des Rezeptors, während eine Interaktion mit dem gesamten Nukleoporin mit der DNA-bindenden Domäne des Rezeptors zu einer Aktivierung desselben führt

(Miyachi, Sakaguchi et al. 2009). Daneben nützen Herpesviren Nup214 als Rezeptor für eine Translokation in den Nukleus. Eine Downregulation des Nukleoporins führt zu einer verminderten Translokation des Viruskapsids in den Nukleus (Pasdeloup, Blondel et al. 2009).

Der eindeutige Platz von Nup214 im Gefüge des NCT bleibt weiterhin kontrovers. Einerseits ist es als asymmetrisches Nukleoporin nur bedingt für den Transportprozess von Nöten (Strawn, Shen et al. 2004). Ebenso sind die zytoplasmatischen Fibrillen für den Import entbehrlich (Walther, Pickersgill et al. 2002). Jedoch wird in letzter Zeit zunehmend die Rolle als Rezeptor und Modulator für den Import deutlich.

In analoger Weise zu CAN wurde DEK im Rahmen der Chromosomentranslokation (6;9) (p23;q34) bei einem Patienten mit akuter myeloischer Leukämie beschrieben. Die Initialen des Patienten waren namensgebend (von Lindern, Poustka et al. 1990), (von Lindern, Fornerod et al. 1992). Unabhängig von der Erstbeschreibung mit einem pathologischen Hintergrund haben Alexiadis et al. DEK in dem SV40 Virus beschrieben, welches Konformationsänderungen in der DNA der Minichromosomen hervorgerufen hat (Alexiadis, Waldmann et al. 2000). Es handelt sich um ein nuklear lokalisiertes Protein mit der Masse von 43kDa, welches überwiegend an Chromatin gebunden ist und in Vielzellern gefunden wird, jedoch nicht in der Hefe (Übersichtsarbeit von (Waldmann, Scholten et al. 2004)). Auch während des Zellzyklus bleibt es an Chromatin gebunden und ist damit Bestandteil mitotischer Chromosomen (Kappes, Burger et al. 2001). Es variiert in der Länge der Aminosäuren innerhalb verschiedener Spezies. Das menschliche DEK Protein besitzt 375 AS.

Allen ist eine spezifische Region gemeinsam: die SAP-Domäne ist ein DNA-bindendes Motiv und tritt auch in anderen Chromatin-bindenden Proteinen auf, aus denen sich ihr Akronym zusammensetzt: **SAF**-A und -B, ein Faktor für die Anheftung an Zellmatrix oder das Kerngerüst. **Acinus**, welches Caspasen als Ziel für apoptotisches Chromatin dient. **PIAS**, welcher die Transkription unterdrückt. Darüber hinaus tritt die SAP Box in Chromatinproteinen auf, welche

in DNA-Reparaturen involviert sind, z. B die poly (ADP-Ribose) Polymerase (Aravind and Koonin 2000).

Die Anzahl an DEK Proteinen variiert je nach Zellart. In proliferationsaktiven Zellen, z. B Lymphozyten, finden sich 4-6Mio. Kopien/Nukleus (Kappes, Burger et al. 2001), während in entdifferenzierten Zellen die Konzentration sich bei 1Mio. Kopien/Nukleus bewegt.

Je nach physiologischer Situation der Zelle ändert sich auch die Konzentration von DEK und erreicht in maligne transformierten Zellen mit die höchsten (Savli, Aalto et al. 2002). Jedoch ändert sich während des Zellzyklus nicht die Konzentration von DEK sondern der Grad der Phosphorylierung und damit der Grad der Aktivität. Eine hohe Proliferationsaktivität korreliert mit einer hohen Expression von DEK (Ageberg, Gullberg et al. 2006).

Die Aufgaben von DEK sind vielfältig. Es interagiert während der DNA-Replikation mit Chromatin und ändert die räumliche Struktur von nukleosomaler DNA. Auf diese Art wird die Verfügbarkeit von Chromatin für die Komponenten der Replikation vermindert (Alexiadis, Waldmann et al. 2000). Während der Transkription verstärkt DEK die Erkennung der korrekten Lokalisation für Splicing Faktoren und wird für das Entfernen der Introns benötigt (Soares, Zanier et al. 2006). Es kann in beiden Fällen sowohl als Co-Aktivator für Transkriptionsfaktoren (Campillos, Garcia et al. 2003) oder als Suppressor agieren, indem beispielweise die Aktivität von NF- κ B unterdrückt oder die TNF α induzierte Aktivierung bestimmter Gene blockiert wird (Sammons, Wan et al. 2006). Kim et al. fanden in ihrer Arbeit an „knock-down“ DEK Zellen insgesamt 58 Proteine, welche mit DEK interagieren (41 mit Hoch- und 17 mit Niederregulierung) (Kim, Chae et al. 2009).

Neuere Arbeiten weisen DEK nunmehr auch eine Rolle in der DNA Reparatur und dem Vorgang der Apoptose zu. In den 58 beschriebenen Proteinen, welche mit DEK interagieren, gehören 16% dem apoptotischen Regelkreis an (Kim, Chae et al. 2009). Zellen, welche dem Rezeptor-vermittelten Zelltod zugeführt werden, weisen einen hohen Pool an DEK auf, welcher nach Translation in hohem Maß phosphoryliert und poly(ADP)ribosyliert ist. Es ist nun nicht mehr

an Chromatin gebunden und wird nach extrazellulär befördert (Kappes, Fahrer et al. 2008).

Seine anti-apoptotische Wirkung konnten Wise-Draper et al. nachweisen. Eine Überexpression von DEK führte zu einer signifikanten Verlängerung der Lebensspanne von humanen Keratinozyten. Ebenso konnte bei maligne transformierten Zellen eine vermehrte Apoptoseresistenz nachgewiesen werden. Dagegen wurde bei „knock-down“ DEK Zellen eine vermehrte Aktivität und Stabilität des Tumorsuppressor p53 beschrieben, welcher die Apoptosesignalkaskade induzierte (Wise-Draper, Allen et al. 2006).

Seine apoptotische Wirkung induziert DEK beispielsweise über den Cytochrom C vermittelten Weg durch die Caspasen-9 und -3 (Lee, Kim et al. 2008). Die Acetylierung von Histonen spielt eine wichtige Rolle für den korrekten Ablauf von verschiedenen Zellabläufen und korreliert mit dem Level der Transkriptionsaktivität (Strahl and Allis 2000). Eine Hyperacetylierung durch die Histonacetyltransferase (HAT) wird bei aktiven Genen gefunden und umgekehrt (Clarke, O'Neill et al. 1993). Eine Überexpression von DEK führt zu einer Inhibition von HAT für das anti-apoptotische Gen bcl-2 (Lee, Kim et al. 2008). Bcl-2 (Cory, Huang et al. 2003) verhindert eine Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und damit den Caspase-vermittelten Zelltod (Dejean, Martinez-Caballero et al. 2006).

Störungen dieses empfindlichen Gleichgewichts münden nicht selten in eine maligne Entartung. Neben akuten myeloischen Leukämien (von Lindern, Fornerod et al. 1992) wurde DEK auch beim malignen Melanom, dem hepatozellulärem Karzinom, dem Retinoblastom und Blasenkarzinomen als Onkogen beschrieben (Carro, Spiga et al. 2006).

1.5 Die akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine hämatologische Neoplasie, bei der es zu einer Akkumulation von unreifen Vorläuferzellen mit einer Blockierung der Entdifferenzierung im blutbildenden Knochenmark kommt. Andere Zellreihen werden verdrängt, was sich als Anämie, Thrombozytopenie und einer Immunsuppression manifestieren. In der Folge zeigt das klinische Erscheinungsbild eine rasche Progredienz, welches unbehandelt einen letalen Ausgang nimmt. Dennoch kann bei frühzeitiger Therapieeinleitung Aussicht auf eine Heilung bestehen. Die Inzidenz der Erkrankung (3,7 Fälle/100.000 Personen) stagniert in den letzten Jahren und zeigt einen Erkrankungsgipfel in der frühen Kindheit (zwischen 1. und 4. Lebensjahr). Sie ist für ca. 15-20% aller Leukämien in der Kindheit verantwortlich und damit seltener als die akute lymphatische Leukämie (Aquino 2002). Trotz der Tatsache, dass akute Leukämien nur <3% aller Malignome ausmachen, sind diese dennoch eine der führenden Malignom assoziierten Todesursachen für Kinder und Personen unter 39 Jahren (Wingo, Cardinez et al. 2003). Der zweite Erkrankungsgipfel liegt im Median um das 65 Lebensjahr, Erkrankungen vor dem 40 Lebensjahr sind eher selten. Es zeigt sich eine stetige Inzidenzzunahme bis zum 85. Lebensjahr (Forman, Stockton et al. 2003). Dies ist zum Teil der Transformation eines myelodysplastischen Syndroms (MDS) in eine AML, zum Teil der zunehmenden Exposition verschiedener Noxen zuzuschreiben. Männer sind insgesamt geringfügig häufiger betroffen als Frauen (Black, Bray et al. 1997).

Die Ursachen zur Entwicklung einer AML sind vielfältig und auf endogene und exogene Faktoren zurückzuführen (Übersichtsarbeit (Deschler and Lubbert 2006)).

Bei Erkrankungen im Kindesalter sind genetische Defekte führend. Für das Down-Syndrom wurde ein 10-20fach erhöhtes Risiko beschrieben. Die Neurofibromatose, das Li-Fraumeni-Syndrom, die Fanconi-Anämie und das Klinefelter-Syndrom zählen ebenfalls zu den Ursachen. Ebenso konnte eine Verbindung in der Entstehung von AML und exogenen Noxen beobachtet

werden. Sowohl ionisierende Strahlung, Chemikalien, Zigarettenrauch, Pestizide als auch Chemotherapeutika sind beschrieben.

Im Zuge der Erfolge verschiedener Chemotherapieregime bei der Behandlung anderer maligner Entitäten wurde die Entstehung sekundärer Leukämien beobachtet. Diese entstehen meist 5-10 Jahre nach einer intensiven Chemotherapie. Hierbei kommt es zu einer Erhöhung des Risikos um den Faktor 100 (Pedersen-Bjergaard, Philip et al. 1993). Zytogenetische und genetische Alterationen sind meist ursächlich (Gojo and Karp 2001). Die virale Beteiligung in der Entstehung maligner Prozesse ist in einer Reihe von Malignomen nachgewiesen. Darunter sind auch im tierexperimentellen Ansatz Formen akuter Leukämien. Eine sichere Beteiligung an der Entstehung einer AML konnte bisher noch nicht festgestellt werden. Einzig eine Assoziation mit dem Parvovirus B19 wird diskutiert (Kerr, Barah et al. 2003).

In 50-80% der Fälle können bei der AML chromosomale Translokationen beobachtet werden (Heim and Mitelman 1992). Diese Inzidenz steigt mit zunehmendem Alter (Rossi, Pelizzari et al. 2000). Die Entdeckung der Philadelphia-Translokation $t(9;22)(q34;q11)$ bei chronisch myeloischen Leukämien ebnete den Weg nach weiteren chromosomalen Translokationen zu suchen, welche auch den Formenkreis der akuten myeloischen Leukämien einschließen. Meist ist diese Leukämieform mit verschiedenen chromosomalen Translokationen assoziiert, aus denen neue Genprodukte entstehen, welche als Fusionsproteine bezeichnet werden. Diese sind in gesunden Zellen nicht zu finden (Look 1997). Sie kodieren für Transkriptionsfaktoren oder Proteinkinasen, welche eine Rolle in der Zelldifferenzierung, Proliferation oder Apoptose spielen (Rabbitts 1994). Zu diesen ungünstigen Formen zählt auch die $t(6;9)$ Translokation mit dem Fusionsprotein DEK-CAN (von Lindern, Fornerod et al. 1992). Diese entsteht aus einer Fusion mit dem Nup214 (Kraemer, Wozniak et al. 1994) und dem DEK Protein. Daneben sind noch weitere Fusionsproteine mit Nup214 bekannt. Neben dem Protein Set wurde in jüngster Zeit eine weitere Fusion mit Abl beschreiben (Graux, Cools et al. 2004). Die nachfolgende Grafik zeigt die Organisation der Nukleoporine und der Fusionsproteine nach den entsprechenden chromosomalen Translokationen.

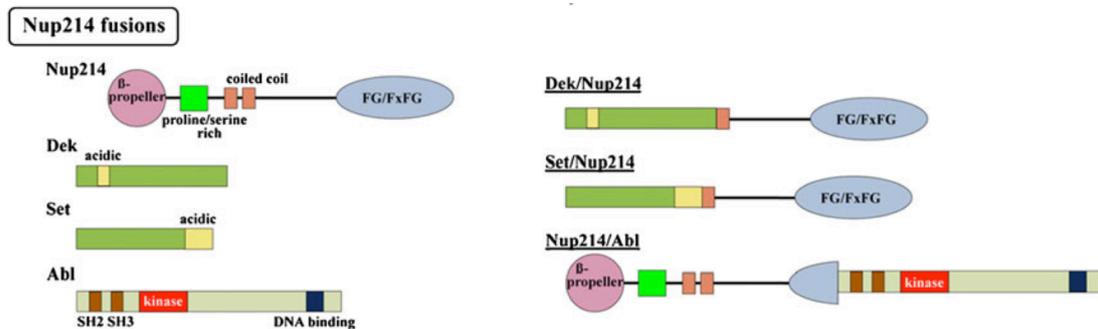


Abbildung 14 aus (Funasaka and Wong 2011): Schematische Darstellung der Generierung der Fusionsproteine (rechte Spalte) von Nup214 (links oben) mit den Proteinen Dek, Set und Abl.

Aktuell sind etwa 749 solcher Translokationen im Formenkreis der AML identifiziert worden (Martens and Stunnenberg 2001). Ebenso ist die Tatsache interessant, dass die verschiedenen Fusionsproteine und chromosomalen Translokationen mit unterschiedlichen Prognosen für den Patienten assoziiert sind. Während die Promyelozytenleukämie auf die Behandlung mit Retinolsäure anspricht und somit eine vergleichsweise gute Prognose besitzt, weisen andere Formen ein eher ungünstiges Outcome für den Patienten auf (O'Donnell, Abboud et al. 2011).

Die nachfolgende Tabelle zeigt die häufigsten AML assoziierten onkogenen Fusionsproteine.

Translokation	Prognose	FAB	Onkogenes Fusionsprotein	Häufigkeit
t(8;21)	gut	M2	AML1-ETO	10% aller AML
t(15;17)	gut	M3	PML-RARa	10% aller AML
inv(16)	gut	M4	CBFb-MYH11	5% aller AML
der(11q23)	Variabel	M4/5	MLL-fusions	4% aller AML
t(9;22)	schlecht	M1/2	BCR-ABL1	2% aller AML
t(6;9)	schlecht	M2/4	DEK-CAN	<1% aller AML
t(1;22)	intermediär	M7	OTT-MAL	<1% aller AML
t(8;16)	schlecht	M4/5	MOZ-CBP	<1% aller AML
t(7;11)	intermediär	M2/M4	NUP98-HOXA9	<1% aller AML
t(12;22)	variabel	M4/M7	MN1-TEL	<1% aller AML

Tabelle 1: modifiziert aus (Martens and Stunnenberg): tabellarische Aufgliederung der häufigsten chromosomalen Translokationen

Die Analyse der chromosomalen Translokationen bietet auch diagnostische Möglichkeiten und wurde im Jahre 2008 Teil der neuen Klassifikation der WHO (world health organisation (Arber DA 2008)).

1.6 Fragestellung

Die Tatsache, dass Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie und der chromosomalen Translokation t(6;9) eine schlechtere Prognose aufweisen, konnte bisher nicht ausreichend beantwortet werden. Während das Durchschnittsalter bei den akuten myeloischen Leukämien im Median das 65. Lebensjahr beträgt, manifestiert sich bei der Translokation t(6;9) die Erkrankung bereits zwischen dem 25. und 30. Lebensjahr. Die Patienten haben in der Regel eine höhere Zahl an Leukozyten, eine höhere Anzahl an Blasten und eine signifikant geringere Rate an kompletten Remissionen. Dies ist umso erstaunlicher, da das Genprodukt im Gegensatz zu anderen Fusionsproteinen nicht in der Lage ist die Differenzierung von Vorläuferstammzellen zu verhindern. Daher ist die Klärung der Pathogenese dieses Genproduktes mit seinen Funktionen von Bedeutung. Ebenso ist das Verteilungsmuster des in die Translokation involvierten Nup214 als wesentlicher Bestandteil des nukleozytoplasmatischen Transportes und der damit verbundenen Transportregulation noch nicht beschrieben.

Ziel dieser Doktorarbeit war die Frage, welches Verteilungsmuster Nup214 als Fusionsprotein mit einer veränderten NLS in Leukämiezellen der chromosomalen Translokation t(6;9) inne hat, zu beantworten. Dazu sollten aus den von Kraemer generierten Fusionsproteinfragmente DEK, CAN Mitte und CAN 80/81 der chromosomalen Translokation t(6;9) jeweils spezifische Antikörper hergestellt werden, mit welchen in einem weiteren Schritt mittels Elektronenmikroskopie das Verteilungsmuster dieses onkogenen Fusionsproteins ermittelt werden sollte. Hierfür sollten die in *E. coli* transfizierten Fusionsproteinfragmente exprimiert und aufgereinigt werden. In einem Vorbereitungsschritt sollte eine korrekte Expressierung der Fusionsproteinfragmente überprüft werden. Nach Aufreinigung sollten die Fragmente fraktioniert und mittels Proteintransfer asserviert werden. Somit sollten durch Affinitätsreinigung spezifische Antikörper gewonnen werden, um in Zellkulturen die Proteine gemäß ihrem Verteilungsmuster mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie sichtbar zu machen. In einem weiteren Schritt sollte

der generierte Antikörper Anti-CAN 80/81 / CAN 80/81 mit Hilfe der Immunelektronenmikroskopie die Lokalisation der Fusionsproteinfragmente darstellen.

2. Material und Methoden

2.1 Verzeichnis des Materials und der Geräte

Antikörper: **Santa Cruz Biotechnology, Inc.** Peroxidase-conjugated Affini Pure Goat Anti-Rabbit IgG POX 1: 4000

Bakterien Linie: **Novagen** E.Coli BL23(DE3)

Zellkultur: **ATCC** (CCL 2), Rockville, Maryland, USA **HeLa** DMSZ Nr. ACC 57

Bezugsquellen: (sofern nicht gesondert aufgeführt wurden alle Chemikalien von der Firma Roth, Karlsruhe bezogen)

Agfa: Agfa Cronex 5

Amersham Biosciences, Freiburg: ECL™ Western Blotting Detection Regents, Hybond-c extra Membran

Applichem, Darmstadt : EDTA, Imidazol, Ponceau S, Saccharose, Tris ultrapure

Biochrom, Berlin: PBS, Penicillin/Streptomycin Stammlösung, Biofreeze Einfriermedium

Bio-Rad, München: Bio-Rad Protein Assay, SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range

Gibco, Eggenstein: Dulbecco's Modified Eagle Medium, L-Glutamin, Tryptanblau, Trypsin/EDTA-Lösung

Merck, Darmstadt: NaCl, KCl, Isopropanol

Molkerei Feldatal: Magermilchpulver

Beiersdorf AG, Hamburg: Nivea Klarsichtnagellack

Roth, Karlsruhe: Essigsäure, Ethanol, Glycin, Glycerin, DTT (Dithioreitol), Rotiphorese A, Rotiphorese B, SDS (Natriumdodecylsulfat), TEMED, Toluol, Tween 20,

Sigma, München: Ampicillin, APS (Ammoniumpersulfat), BSA (Bovine serum albumine), DMP 30, Epon, IPTG (Isopropyl β -D-thiogalactosid), n-Propyl-Gallat,

PMSF

Serva, Heidelberg: Coomassie Blau G-250

Geräte:

Beckmann, München: Avanti J-25, Ultrazentrifuge L5-65 B

Bender & Hobein, Zürich, Schweiz: Vortex Genie 2

Bio-Rad, München: Mini Protean II, Miniblotkammer

Eppendorf, Hamburg: Centrifuge 5415C

Liebisch, Bielefeld: Heizblock 2099

Pharmacia Biotech, Freiburg: Ultrospec 1000 Photometer

Sartorius, Göttingen: Analysenwaage Typ 2604

Zeiss, Jena: Zeiss Axiovert 100 M Mikroskop mit einem LSM510 Laser

Verbrauchsmaterial: (sofern nicht gesondert aufgeführt wurden alle Verbrauchsmaterialien von der Firma Hartenstein bezogen)

Deck Gläser, rund (Cover slips)

Eppendorf UVette®

Kryoröhrchen, steril

Kulturröhrchen 12ml

Petrischale

Pipettenspitzen für Mikroliterpipetten blau und gelb

Reaktionsgefäße Original Eppendorf ®

Verschlussfolie Parafilm®

Greiner Bio One: CELLSTAR™ Zellkultur Flaschen 75 cm², CELLSTAR® 24 Well Zellkultur Multiwell Platten

BD Biosences: BD Falcon™ Tube 15 ml, 50ml

2.2 Methoden

2.2.1 Präparative Induktion der Fusionsproteine

Die mit den Fusionsproteinen versehenen E. coli Zelllinien wurden bei -80°C gelagert. Zur Gewinnung und Amplifizierung wurden diese zunächst auf LB-Ampicillinagarplatten angezüchtet und anschließend je eine Kolonie mit den jeweiligen Fusionsproteinen mit sterilisierten Zahnstochern gepickt, in 2ml LB-Ampicillinnährmedien überführt und im Brutschrank bei 37° und 5% CO₂ über Nacht bebrütet. Am nächsten Tag wurde die Suspension kurz abzentrifugiert, in 2ml frisches LB-Ampicillin überführt und anschließend in 250 ml LB-Ampicillin überführt und im Schüttler bei 37°C inkubiert. Die ausreichende Vermehrung wurde mittels Bestimmung der optischen Dichte erreicht, welche ein Optimum bei OD_{600nm} zwischen 0,6 und 1,0 als Ziel auswies.

Die Induktion für die Amplifizierung des jeweiligen Fusionsproteins wurde durch Zugabe von 250µl IPTG (1M gewünschte Endkonzentration 1mM) erreicht. Die Hemmung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase der Bakterien wurde durch Zugabe von Rifampicin 250µg/ml erreicht. Ebenso wurde eine Negativkontrolle ohne Induktion angelegt. Anschließend erfolgte die erneute Bebrütung bei 37°C für 3h. Die Bakterienkulturen wurden anschließend in 50ml-Falcontubes verteilt und für 10min bei 6000rpm und 4°C, Rotor JA 12 zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet zur Reinigung der Fusionsproteine weiterverarbeitet.

LB Medium (Bertani 1951):

10g Bacto- Trypton

5g Bacto-Yeast (Hefe)-Extrakt

10g NaCl, auf 1000 ml H₂O auffüllen,

pH mit etwa 200 µl 5 NaOH auf 7.0 einstellen

Medium autoklavieren, 20 min 120°C

Ampicillin Stammlösung:

100 mg Ampicillin/ ml, Verdünnung 1:1000 = 100µg/ml

LB- Ampicillin Agarplatten:

1l LB-Medium mit 15g Agar vermischen und anschließend autoklavieren.

Erhitzung und Zugabe von Ampicillin (1:1000 Verdünnung) und Guss in sterile Petrischalen und 24h bei RT abkühlen lassen.

2.2.2 Reinigung der Fusionsproteine

Bakterien aufschließen:

Das Pellet von 250ml Bakterienkultur wurde in 25ml der Lösung 1 aufgenommen. Zum Aufschließen der Bakterien wurden diese mit der Zugabe von 250µl Triton® X-100, 500µl PSMF (100mM) und 500µl Lysozym vorbehandelt und anschließend für 15min im 30°C warmen Wasserbad inkubiert und auf Eis gestellt. Die Lyse der Bakterien wurde durch Ultraschallbehandlung durchgeführt. Das Bakterienlysate wurde anschließend mit dem JA12-Rotor, 15min bei 10.000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und auf Eis aufbewahrt. Das Pellet wurde in 25ml Bindepuffer 1x aufgelöst und erneut mit Ultraschall behandelt. Pellet und Überstand (je 20µl) wurden auf ein SDS-Gel, neben induzierten und nicht induzierten Bakterien (100µl) aufgetragen, um zu detektieren, ob sich das Fusionsprotein im Überstand = Zytoplasma oder im Bakterienpellet = unlösliche inclusion bodies befindet.

Möglichkeit 1: Nachweis des Fusionsproteins in inclusion bodies. Hier folgt eine erneute Zentrifugation unter den o.g. Konditionen, wobei das Pellet jetzt in 10ml Bindepuffer mit 6M Harnstoff resuspendiert wurde.

Möglichkeit 2: Fusionsprotein im Zytoplasma. Hier wurde auf die erneute Zentrifugation verzichtet und nur 6M Harnstoff zugefügt.

Lösung 1

50mM Tris-HCl, pH 8,0, 2mM EDTA

(Stammlösungen hierzu: TRIS 1M, pH 8,0: 60,5g Tris auf 500ml H₂O,

EDTA/HCl 0,5M pH 8,0, 73g EDTA auf 500ml H₂O

Bindepuffer (8 fach konzentriert):	40mM Imidazol	0,54g
200ml	4 M NaCl	46,8g
	160mM TRIS pH 7,9	3,9g
	ad 200 ml H ₂ O	Lösung auf pH 8,0 einstellen

2.2.3 Polyacrylamidgelelectrophorese mit SDS (SDS-Page)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte unter den von Laemmli beschriebenen Bedingungen (Laemmli 1970). Die Proben wurden 1:3 mit Probenpuffer verdünnt 5min bei 80°C aufgeköcht. Die Trenngele enthielten zwischen 10% und 15% Polyacrylamid. Die Proben wurden im Sammelgel bei 80V, im Trenngel bei 200V aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele mit 0,1% Coomassie brill. blue (w/v), 45% Isopropanol (v/v), 9% Eisessig (v/v) 2h bei Raumtemperatur gefärbt. Zur Entfärbung wurden die Gele in 5% Eisessig (v/v), 7,5% Isopropanol (v/v) geschwenkt (Fairbanks, Steck et al. 1971).

Probenpuffer (3x):

125mM Tris HCL pH 6,8

10%Glycerin (/v/v)

2%SDS (v/v)

0,001%Bromphenolblau (v/v)

0,5%Dithiotreitol (w/v)

Gelelektrophoresepuffer (5x):

SDS 5g, Glycin 72g, TRIS 15g, ad 1l Aqua dest.

Gel-Stammlösungen:

Trenngel	10%	15%:	Sammelgel 5%:
Trenngelpuffer (5X)	20ml	20ml	20ml
Sammelgelpuffer(5X)			
Acrylamid 30% (w/v)	33ml	49ml	16ml
Bisacrylamid 2% (w/v)	15ml	22,5ml	7,5ml
Glycerin	8,5g	8,5 g	
Aqua dest.	ad 100ml	ad 100 ml	ad 100ml

Trenngelpuffer (5X):

(5X):

TRIS 22,7 g

SDS 0,5 g

ad. A.dest 100 ml

pH 8,8

Sammelgelpuffer

TRIS 7,6 g

SDS 0,5 g

ad A. dest 100 ml

pH 6,8

Für ein Gel wurden anschließend jeweils die folgenden Mengen verwendet:

	Trenngel	Sammelgel
Stammlösung	4 ml	1,5 ml
TEMED	4 µl	1,5 µl
APS (10%)	12 µl	7,8 µl

2.2.4 Affinitätschromatographie mittels Ni²⁺-NTA Agarose Säule (hier Beschreibung mit batch Verfahren)

Die Trennung in einzelne Fraktionen des gesuchten Fusionsproteins erfolgte nach der von Porath et al. entwickelten Methode (Porath, Carlsson et al. 1975). 1,5ml Ni²⁺-NTA Agarose wurden in ein 15 ml Falcontube übertragen und mit 13,5 ml Bindepuffer 1* (ohne Harnstoff) 10 min äquilibriert. Danach wurde bei niedriger Drehzahl (1000g) der Überstand unter Belassung eines marginalen Restes abpipettiert und das Pellet mit dem gewünschten Fusionsprotein hinzugegeben. Das Falcon Tube wurde mit Parafilm verschlossen und mit leichter Rotation für 2 h im Kühlraum inkubiert.

Ein leeres Säulchen wurde an einem Stativ befestigt und unten mit einer Klemme verschlossen. Das Gemisch aus Nickelagarose und Fusionsproteinen wurde nun in das Säulchen gegossen. Der Durchfluss wurde gesammelt und eingefroren. Dabei wurde strengstens darauf geachtet, dass während des gesamten Verfahrens die Säule niemals trocken läuft.

In drei Arbeitsschritten wurde das Säulenmaterial zuerst mit 4 ml Bindepuffer mit Harnstoff, dann mit 5 ml Waschpuffer mit Harnstoff gewaschen und schließlich mit 6 ml Elutionspuffer eluiert. Die gewonnen Proben wurden dabei fraktioniert gewonnen und in Eppendorf Cup`s überführt, beschriftet und eingefroren.

Um zu detektieren, in welcher Fraktion das Fusionsprotein am besten angereichert wurde, wurden jeweils 10 µl/ Fraktionen auf ein SDS-Gel auftragen und elektrophoretisch getrennt.

Bindepuffer (8 fach konz):	40mM Imidazol	0,54g
(200 ml)	4 M NaCl	46,8g
	160mM TRIS pH 7,9	3,9g
ad 200 ml H ₂ O	Lösung auf pH 8,0 einstellen	
Waschpuffer (8fach konz):	160mM Imidazol	1,09g
(100 ml)	4 M NaCl	23,4g
	160mM TRIS	1,9g
ad 100 ml H ₂ O,	Lösung auf pH 7,9 einstellen	
Elutionspuffer (4fach konz):	4M Imidazol	27,24g
(100 ml)	2M NaCl	11,7g
	80mM TRIS	0,95g
ad 100 ml,	Lösung auf pH 8,0 einstellen	

Alle Lösungen müssen entsprechend entweder 1:8 oder 1:4 verdünnt werden, zusätzlich muss der Harnstoff noch hinzugefügt werden (MW etwa 60 g).

2.2.5 Immunoblot Inkubation und Entwicklung

Nach der Auftrennung durch SDS-PAGE wurden die Proteine nach der „Western Blot Methode“ elektrophoretisch bei 55V und etwa 17mA für 3h auf Nitrocellulosepapier übertragen (Burnette 1981), (Towbin, Staehelin et al. 1979). Zur Kontrolle der Elektrophorese und des Transfers wurden die Membranen kurz mit H₂O gespült und anschließend mit Ponceau S Lösung 1min gefärbt (Salinovich and Montelaro 1986). Die Ponceau S gefärbten Membranen lassen sich bei höherer Ionenstärke, in PBS (phosphatgepufferte Salzlösung, pH 7,4) darstellen und durch anschließendes Spülen mit H₂O anschließend wieder entfärben, ohne die nachfolgenden Arbeitsschritte zu beeinflussen.

Transblotpuffer 1x

25mM Tris

192mM Glycin

20%Methanol (v/v)

Ponceau S Lösung

0,5%Ponceau S (w/v)

3%Trichloessigsäure (v/v)

Zur Absättigung der freien Proteinbindungsstellen wurden die Membranen in Magermilchlösung (5%Magermilch (w/v) in 0,1%Tween-PBS) 1h bei RT geschwenkt. Der Primärantikörper wurde, wenn nicht anders beschrieben, in einer Verdünnung von 1:200 in 5%Magermilchlösung bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Membranen wurden darauf 3 mal 10min in 0,1% Tween-PBS bei RT gewaschen und dann mit dem entsprechenden Sekundärantikörper garb (goat anti-rabbit) POX 1: 4000, in Magermilchlösung für 1h bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen für 10min mit 0,1% Tween-PBS wurden die gebundenen Antikörper durch die ECL-Technik (enhanced chemiluminescence technique) sichtbar gemacht und auf einem Röntgenfilm entwickelt.

2.2.6 Affinitätsreinigung der Immunsereen

Zur Affinitätsreinigung der Antikörper wurden die Fusionsproteine gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulosepapier transferiert und wie bereits beschrieben mit Ponceau S gefärbt. Die entsprechende Proteinbande wurde exzidiert und zerkleinert. Darauf wurden die Nitrocellulosestückchen für etwa 1h mit 5%Magermilchpulver in PBS geschüttelt und für 24h mit dem, aus einem Kaninchen hergestellten Immunsereum, welches zwischen 1:2 bis 1:20 mit der Magermilchlösung verdünnt worden war, inkubiert. Dann wurden die Nitrocellulosestückchen dreimal für je 10min mit PBS gespült. Die Ablösung der an Nitrocellulose gebundenen Antikörper erfolgte im Wasserbad bei 56 °C für 30min. Hierbei wurden die Nitrocellulosestücke mit Tween-PBS benetzt, im Wasserbad inkubiert und der Tween PBS Überstand mit den abgelösten Antikörpern abpipettiert. Der Überstand wurde in Eppendorf Cups überführt und mit NaN_3 (1:100, bei 10%iger Lsg.) und BSA 1mg/ml, angereichert und bei – 20°C gelagert. Die Ablösung wurde mit denselben Nitrocellulosestückchen mehrfach wiederholt.

PBS (5fach konz.)

400,3g NaCl

10,0g KCl

85,3g Na_2HPO_4

10,0g KH_2PO_4

auf 10l H_2O → 1:5 Verdünnung

Tween PBS

0,1% (1g Tween auf 1l PBS)

Magermilchlösung

5g Magermilch auf 100ml 0,1% Tween PBS

Ponceau S Lösung

Für 1l (0,5% Ponceau S, 3% TCA)

5g Ponceau S (Sigma)

30g Trichloressigsäure

ad 1l H₂O

2.2.7 Zellkulturen

Alle im Folgenden beschriebenen Arbeiten mit Zellkulturen erfolgten an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S1 unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank mit autoklavierten oder heißluftsterilisierten Materialien bzw. Geräten oder sterilfiltrierten Lösungen (Porendurchmesser der Filter 0,2µm). Alle mit humanem oder transfiziertem Zellmaterial in Kontakt getretenen Materialien oder Geräte wurden anschließend mit 90%igem Alkohol desinfiziert oder durch Autoklavieren sterilisiert.

Die Zellen wurden in einem CO₂-Begasungsbrutschrank im offenen System bei 37°C mit 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert.

Als Zellkulturen dienten HeLa Zellen, bei denen es sich um epitheloide Zervixkarzinomzellen handelt (Scherer, Syverton et al. 1953). Diese wurden freundlicherweise vom immunologischen Labor der Medizinischen Klinik und Poliklinik II der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt.

Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff bei -160°C kryokonserviert. Die Kryoröhrchen wurden aus dem flüssigen Stickstoff direkt in ein Wasserbad gegeben und bei 37°C vollständig aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in 10ml warmen Kulturmedium langsam aufgenommen und 5min bei 200 x g sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet mit dem entsprechenden Kulturmedium resuspendiert und in Kulturschalen ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit frischem Nährmedium versorgt.

Das Zellkulturmedium setzt sich, wie folgt zusammen:

90% DMEM in high glucose (500ml)

10% FCS (50ml)

1mM Glutamin (2,5ml einer 200mM Lösung)

Penicillin/Streptomycin (5ml einer 100000U Stammlösung)

Für die Bestimmung der Zellzahl/ml wurden die Zellen von der Kulturschale abgelöst, in Kulturmedium gewaschen und bei 200 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1ml HBSS aufgenommen und 10µl dieser Zellsuspension mit 10µl Trypanblau (Trypanblau 1% in 1:5 in NaCl verdünnt) auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben.

Für jede Bestimmung wurden die Zellzahlen von jeweils 16 Kleinquadraten summiert, um die Zellzahl über einem Großquadrat zu erhalten. Alle Zellzahlbestimmungen wurden als Duplikate angelegt und die Mittelwerte (Mw) errechnet. Aus der Zellzahl und dem Verdünnungsverhältnis wurde dann die Zellzahl pro ml Suspension wie folgt ermittelt:

$$\text{Zellzahl/ml} = \varnothing \text{ der Zellzahl aus 2 Großquadraten} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerkonstante } (10^4)$$

Die HeLa Zellen wurden in einer Konzentration von 1-2 x 10⁶ Zellen/80cm² ausgesät. Das Kulturmedium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Alle Medien und Lösungen, soweit nach Herstellerangabe möglich, wurden vor Verwendung auf 37°C im Wasserbad vorgewärmt.

Das Splitten der Zellkulturen wurde bei einer Dichte von 5-15 x 10⁶ Zellen/175 cm² durchgeführt. Das Nährmedium wurde abpipetiert und 1ml fertig gemischtes EDTA/Trypsin Trypsin (1:250)/EDTA (0,25%/0,02%) für ca. 1 Minute schwenkend in der Zellkulturflasche verteilt. Danach umgehende Zugabe von 4ml Nährlösung und Verteilung auf 5 neue Zellkulturflaschen,

welche erneut mit Nährmedium auf 5ml/Flasche aufgefüllt wurde und erneute Überführung in den Brutschrank.

Überzählige HeLa Zellen wurden zur Lagerung wieder kryokonserviert. Zur Kryokonservierung wurden die Zellen wie oben beschrieben vom Boden der Kulturschale abgelöst. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 500 x g wurde der Überstand dekantiert, das Zellpellet mit Einfriermedium zur Kryokonservierung resuspendiert und in 1ml Aliquoten in Kryoröhrchen überführt ($2-3 \times 10^5$ Zellen pro Kryoröhrchen). Die Kryoröhrchen wurden in einer dickwandigen Styroporbox auf -80°C heruntergekühlt, um Schäden durch Kristallisationsprozesse beim Einfrieren zu vermeiden. Nach 24-48 Stunden wurden die Kryoröhrchen zur Langzeitaufbewahrung in Flüssigstickstoff (-160°C) umgelagert.

2.2.8 Immunhistochemie – Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz wurde nach Coons durchgeführt (Coons 1961). Kultivierte HeLa Zellen wurden wie oben beschrieben in einer 24-Wellplatte auf sterilen cover slips mit 1ml Zellsuspension und 1ml Nährmedium für 2 Tage lang in einem Brutschrank angezchtet. Nach Absaugen des Zellkulturmediums wurde umgehend jede Vertiefung mit einer PBS (1:10 verdünnt) gespült. Nach Absaugen des PBS (1:10 verdünnt) erfolgte die Zellfixierung mit 1ml eiskaltem Methanol je Vertiefung für insgesamt 10 Minuten. Danach erfolgte die Entfernung des Methanol und eine erneute Spülung mit PBS (1:10 verdünnt) und anschließend die Entfernung desselben.

In jede Vertiefung wurden nun 200 μl der affinitätsgereinigten Antikörperlösung appliziert und über Nacht im Kühlraum inkubiert.

Die Antikörperlösung wurde recycelt und die Wells 3 x 10 min mit Tween PBS gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit 30 μl des Sekundärantikörpers (Cys3 1:500 goat-anti rabbit) für 1h. Erneuter Spülvorgang mit Tween PBS (3 x 5min).

Auf einem Objektträger wurden 2µl n-Propyl-Gallat aufgebracht und die abgetrockneten cover slips mit den HeLa Zellen nach unten aufgelegt und mit Nagellack abgedichtet. Die Darstellung der Immunfluoreszenzen erfolgte unter dem Zeiss Axiovert 100M Mikroskop mit anschließender digitaler Speicherung.

n-Propylgallate

1,5% n-Propylgallat

60% Glycerol in H₂O oder PBS

für 10ml:

0,15g n-Propylgallat

6g Glycerin

ad 10ml PBS, portionieren, einfrieren bei –20°C

3. Ergebnisse

3.1 Amplifizierung der transfizierten E.coli

Die mit den Fusionsproteinen transfizierten E. coli Bakterienstämme wurden bei -80°C gelagert. Zur Gewinnung und Amplifizierung wurden mit Hilfe von sterilisierten Zahnstochern je eine Kolonie mit dem jeweiligen Fusionsprotein gepickt, in 2ml LB-Ampicillin Nährmedium überführt und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ über Nacht bebrütet. Am nächsten Tag wurde die Suspension kurz abzentrifugiert, in 2ml frisches LB-Ampicillin überführt und anschließend in 250ml LB-Ampicillin überführt und im Schüttler bei 37°C inkubiert. Die ausreichende Vermehrung wurde mittels der Bestimmung der optischen Dichte erreicht, welche ein Optimum bei OD_{600nm} zwischen 0,6 und 1,0 als Ziel auswies.

Zeit in min	30min	60 min	90min	120min	150min	210min
CAN Mitte	0,078	0,182	0,250	0,59	1,01	
CAN 80/81	0,063	0,162	0,238	0,62	0,981	
DEK	0,092	-	0,163	0,365	0,435	0,705

Tabelle 2: Gemessene optische Dichte der mit den jeweiligen Fusionsproteinen transfizierten E. coli für die präparative Induktion. Zur Bestimmung der ausreichenden Vermehrung wird eine OD von 0,6-1,0 angestrebt. Hier besitzen die Bakterien noch ausreichend Teilungspotential für die anschließende Induktion. Die obere Spalte zeigt die Zeit in Minuten an. Die nachfolgenden Spalten der mit dem jeweiligen Fusionsprotein transfizierte E. coli Stamm und der ermittelten OD.

3.2 Induktionsprobe der Fusionsproteinfragmente

3.2.1 Induktionsprobe für CAN Mitte

Die Induktion für die Amplifizierung des jeweiligen Fusionsproteins wurde durch Zugabe von 250µl IPTG (1M gewünschte Endkonzentration 1mM) erreicht. Die Hemmung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase der Bakterien wurde durch Zugabe von Rifampicin 250µg/ml erzielt. Ebenso wurde eine Negativkontrolle ohne Induktion angelegt. Nach Aufschließung der Bakterien und Zentrifugation zur Separation von Bakterienpellet und Überstand wurden beide Fraktionen auf ein SDS-Gel neben induzierten (20µl) und nicht induzierten Fraktionen (100µl) auftragen, um zu detektieren, ob sich das Fusionsprotein vorwiegend im Überstand = Zytoplasma oder im Bakterienpellet = unlösliche „inclusion bodies“ befindet.

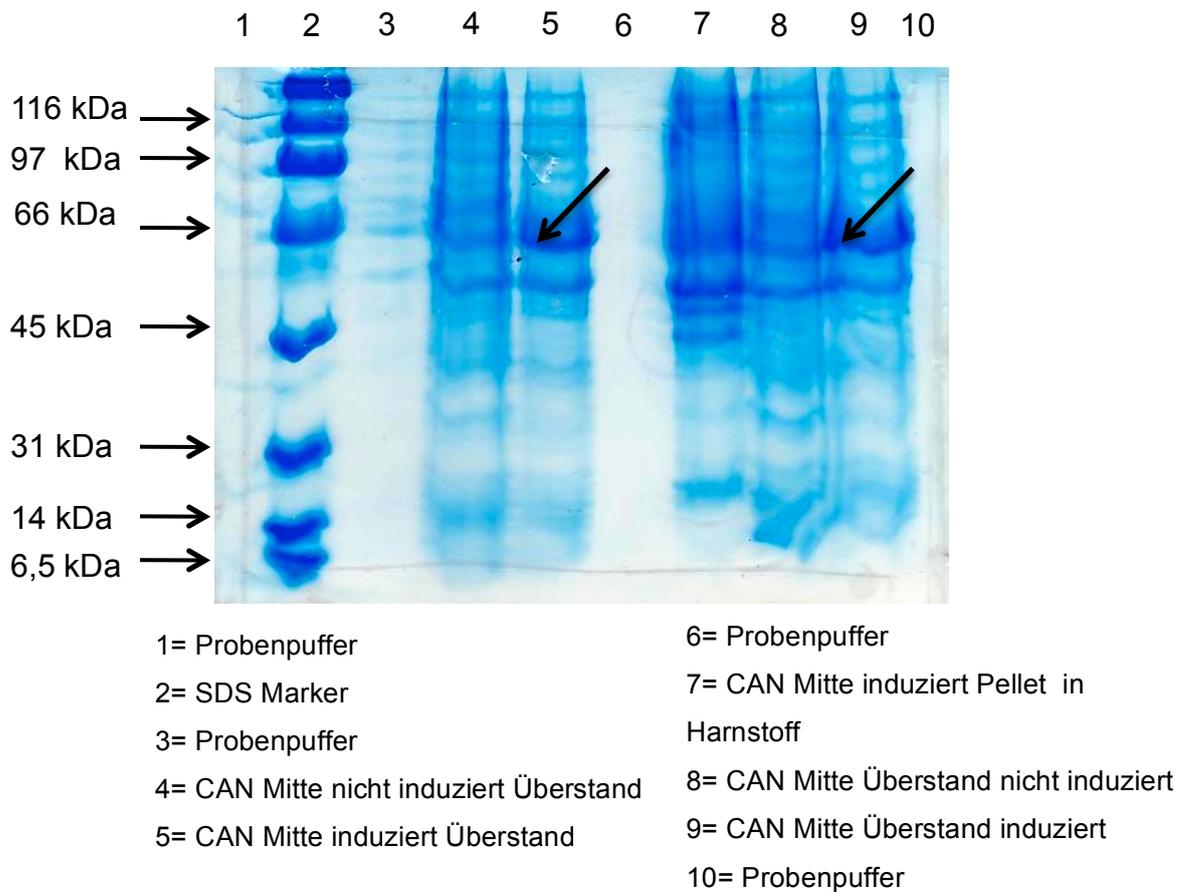


Abbildung 15: Induktionsprobe des CAN Mitte Fusionsproteins. Die einzelnen Fraktionen wurden auf ein 12,5% SDS Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Linksbündig der Molekulargewichtstandard in kDa. In der Kopfzeile durchnummerierte Zahlen 1-10 werden unten erläutert. Trotz der Tatsache, dass die nicht induzierte Probe in 4 eine 5x höhere Konzentration als induzierte Probe in 5 aufweist, ist eine intensivere Anreicherung des Fusionsproteins auf Höhe der 66kDa Bande (Pfeilmarkierung) zu verzeichnen. Ebenfalls lässt sich das Fusionsprotein in 7 auch im Pellet nachweisen.

3.2.2 Induktionsprobe für DEK und CAN 80/81

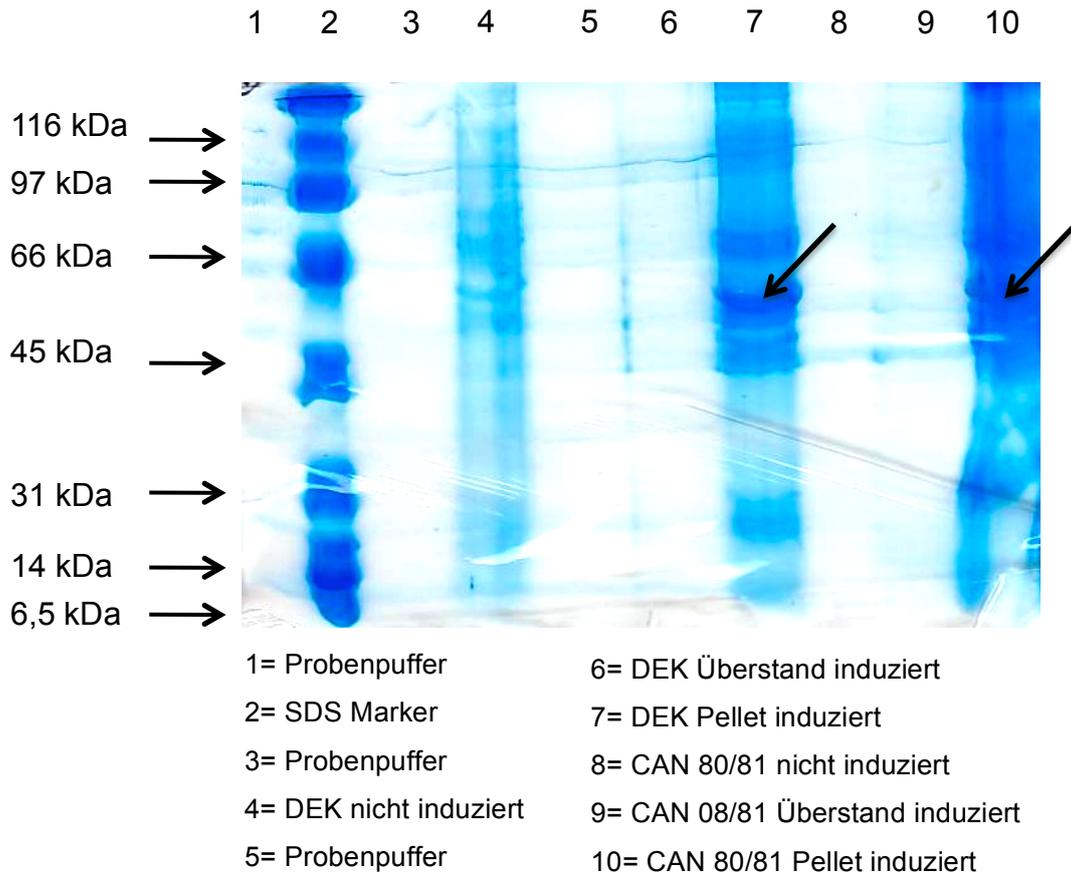


Abbildung 16: Induktionsprobe des DEK und des CAN 80/81 Fusionsproteins. Die einzelnen Fraktionen wurden auf ein 12,5% SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Linksbündig der Molekulargewichtstandard in kDa. In der Kopfzeile durchnummerierte Zahlen 1-10 werden unten erläutert. In der Spalte 4 ist eine nicht induzierte Probe von DEK aufgetragen, das gesuchte Protein wird im Bereich von 66kDa erwartet. Dies ist in Spalte 7 dargestellt (Pfeilmarkierung) und lässt auf ein Vorkommen in unlöslichen „inclusion bodies schließen“, da wie in Spalte 6 dargestellt, nur marginal eine Anfärbung zu verzeichnen ist. Das Fusionsprotein 80/81 wird auf der Höhe der 45kDa Bande erwartet. Die gewünschte Bande in Spalte 10 befindet sich in diesem Gel zwischen der 66kDa und der 45kDa Bande (Pfeilmarkierung). In der nachfolgend dargestellten Affinitätschromatographie von CAN 80/81 ist die eindeutige Positionierung zu sehen. Ebenso wie im DEK Fusionsprotein befindet sich CAN 80/81 im Bakterienpellet und lässt sich durch Induktion suffizient exprimieren.

3.3 Affinitätschromatographie mittels Ni²⁺ Agarosesäule

3.3.1 Affinitätschromatographie für CAN Mitte

Nach der präparativen Induktion der Fusionsproteine erfolgte die Affinitätschromatographie mittels Ni²⁺-NTA Agarosesäule im „Batchverfahren“. In drei Arbeitsschritten wurde das Säulenmaterial zuerst mit Bindepuffer mit Harnstoff, sowie Waschpuffer mit Harnstoff gewaschen und schließlich mit Elutionspuffer eluiert. Die Proben wurden dabei fraktioniert gewonnen. Um zu detektieren, in welcher Fraktion das Fusionsprotein am besten angereichert ist, wurden jeweils 10µl/Fraktion auf ein SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt.

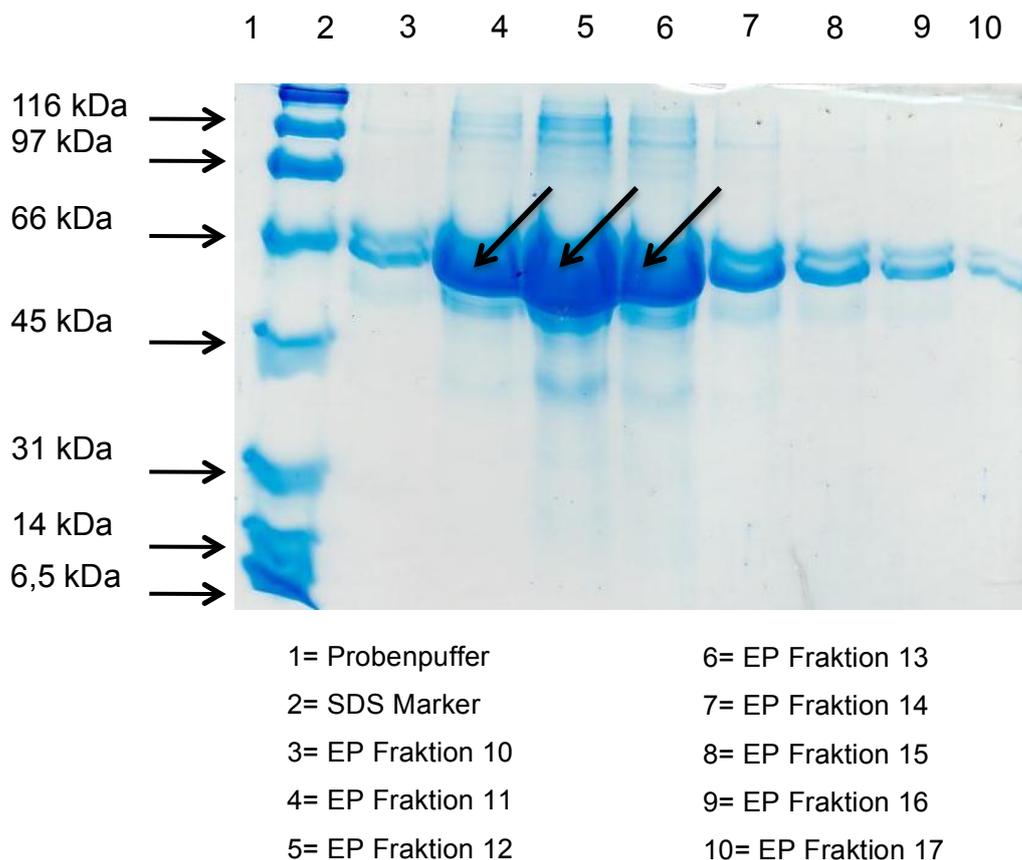


Abbildung 17: Affinitätschromatographie des CAN Mitte Fusionsproteins. Die einzelnen Fraktionen wurden auf ein 12,5% SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Linksbündig der Molekulargewichtstandard in kDa. In der Kopfzeile sind die verschiedenen Fraktionen des Gels durchnummeriert, welche unten erläutert werden (EP= Elutionspuffer). In den Fraktionen 4-6 findet sich auf Höhe der 66kDa Bande (Pfeilmarkierung) die größte Anreicherung des Fusionsproteins CAN Mitte

3.3.2 Affinitätschromatographie für CAN 80/81

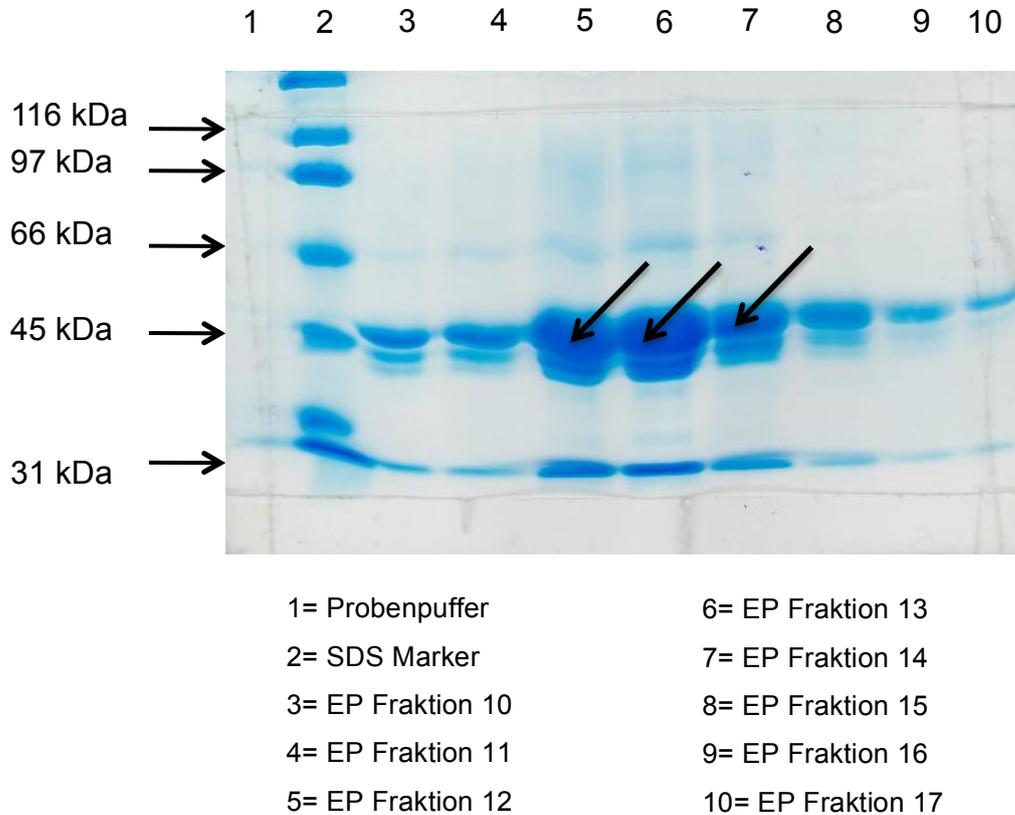


Abbildung 18: Affinitätschromatographie des CAN 80/81 Fusionsproteins. Die einzelnen Fraktionen wurden auf ein 12,5% SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Linksbündig der Molekulargewichtstandard in kDa. In der Kopfzeile sind die verschiedenen Fraktionen des Gels durchnummeriert, welche unten erläutert werden (EP= Elutionspuffer). In den Fraktionen 5-7 findet sich auf Höhe der 45kDa Bande die größte Anreicherung des Fusionsproteins CAN 80/81 (Pfeilmarkierung).

3.3.3 Affinitätschromatographie für DEK

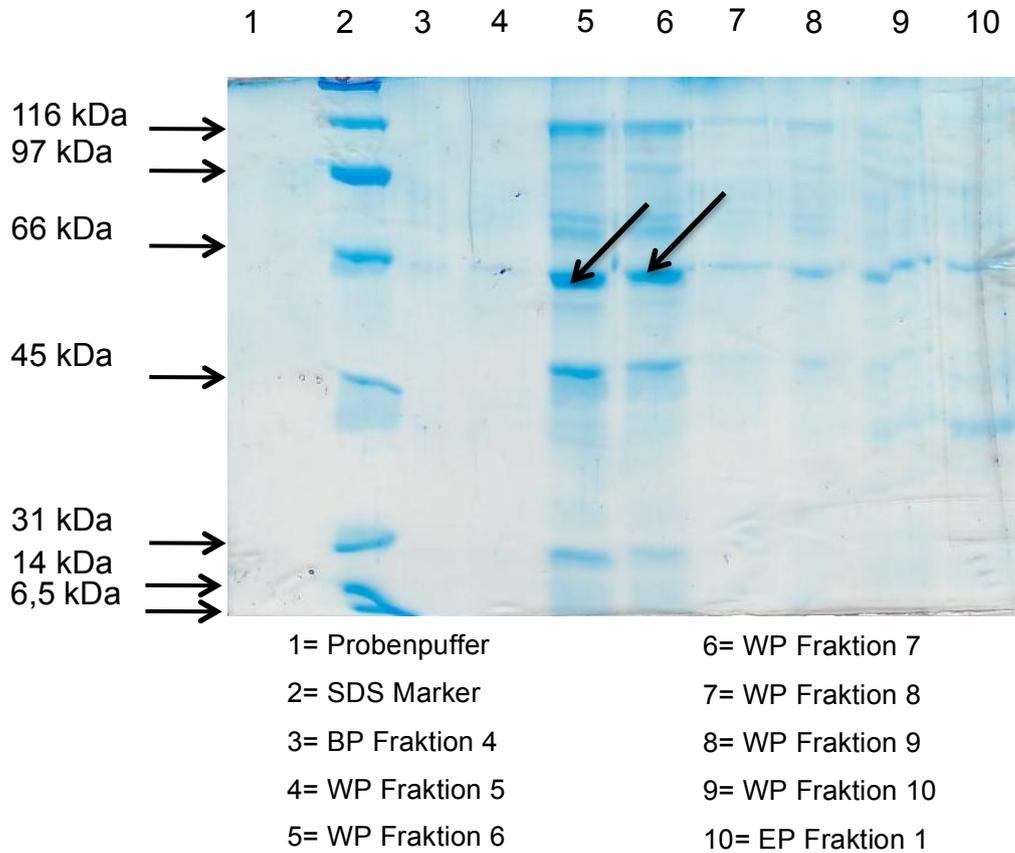


Abbildung 19: Affinitätschromatographie des DEK Fusionsproteins. Die einzelnen Fraktionen wurden auf ein 12,5% SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Linksbündig der Molekulargewichtstandard in kDa. In der Kopfzeile sind die verschiedenen Fraktionen des Gels durchnummeriert, welche unten erläutert werden (BP=Bindepuffer; WP=Waschpuffer; EP=Elutionspuffer). In den Fraktionen WP 5 und 6 findet sich auf Höhe der 66kDa Bande die größte Anreicherung des Fusionsproteins DEK (Pfeilmarkierung).

3.4. Immunoblot

3.4.1 Anti CAN Mitte

Nach der Auftrennung durch SDS-Page wurden die Proteine nach der „Western Blot Methode“ auf Nitrocellulosepapier übertragen. Zur Kontrolle der Elektrophorese und des Transfers wurden mit Ponceau S gefärbt. Zur Absättigung der freien Proteinbindungsstellen wurden die Membranen initial mit Magermilchlösung abgesättigt, anschließend mit dem, in der Affinitätsreinigung generierten Primärantikörper inkubiert und schließlich mit dem Sekundärantikörper garb (goat anti-rabbit) POX 1: 4000 inkubiert. Durch die ECL-Technik wurden die gebundenen Antikörper sichtbar gemacht und auf einem Röntgenfilm entwickelt.

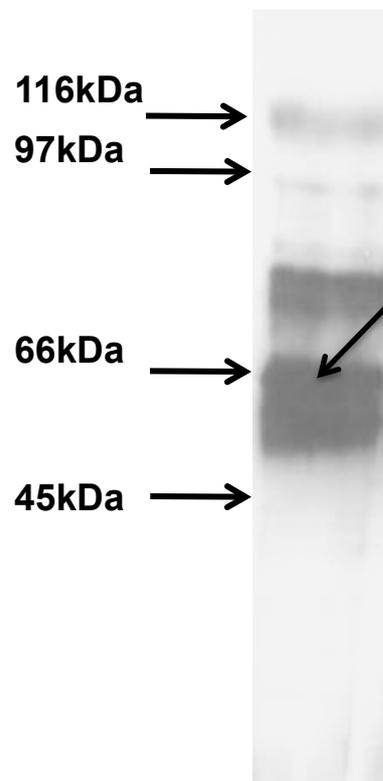


Abbildung 20: Immunoblot mit CAN Mitte/AntiCAN Mitte Die Fusionsproteine Fraktion 12 EP wurden über ein 12,5% SDS-Gel auf Nitrocellulosemembran geblottet, mit dem korrespondierenden affinitätsgereinigten Antikörper inkubiert und mit dem Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Linksbündig sind die Molekulargewicht in kDa zu sehen. Dargestellt ist der Immunoblot mit CAN Mitte/Anti-CAN Mitte. Die Belichtungszeit betrug ca. 2 sec. Es lässt sich auf Höhe von 66kDa das gesuchte Fusionsprotein erkennen (Pfeilmarkierung), mit wie in Abb. (17) gezeigter Doppelbande. Auf Grund der besseren Darstellung wurde der Ausschnitt in schwarz/weiß überführt.

3.4.2 Anti CAN 80/81

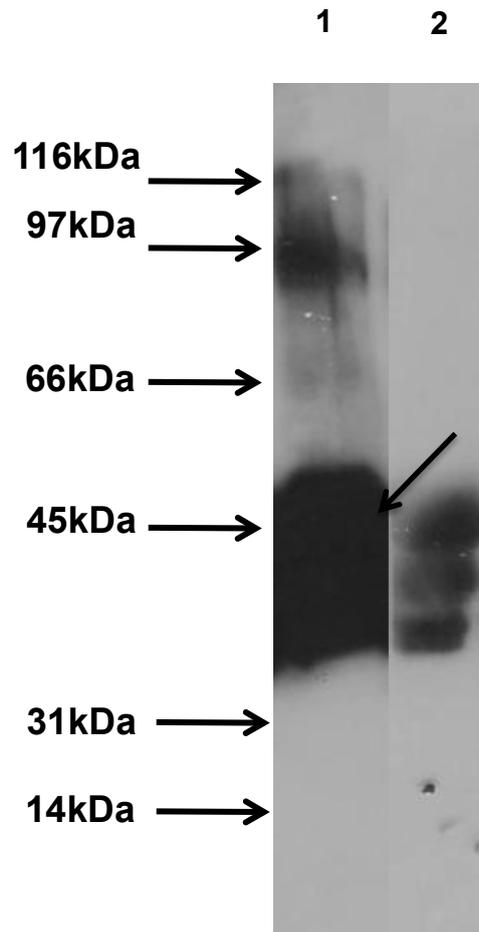


Abbildung 21: Immunoblot mit CAN 80/81/Anti-CAN 80/81 Die Fusionsproteine Fraktion 12 EP wurden über ein 12,5% SDS-Gel auf Nitrocellulosemembran geblottet, mit dem korrespondierenden affinitätsgereinigten Antikörper inkubiert und mit dem Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Linksbündig sind die Molekulargewichte in kDa zu sehen. **1:** Immunoblot mit CAN 80/81/Anti-CAN 80/81. Die Belichtungszeit betrug ca. 2sec. Es lässt sich auf Höhe von 45kDa das gesuchte Fusionsprotein erkennen (Pfeilmarkierung). **2:** Immunoblot mit CAN 80/81/Anti-CAN 80/81. Die Belichtungszeit betrug ca. 0,5sec. Bei kürzerer Belichtungszeit wird eine dreifache Bande sichtbar, wie sie auch in Abb.18 zu sehen ist. Auf Grund der besseren Darstellung wurde der Ausschnitt in schwarz/weiß Optik überführt.

3.5. Immunfluoreszenz

Kultivierte HeLa Zellen wurden wie in 2.2.7 beschrieben, angezchtet, präpariert und mit der affinitätsgereinigten Antikörperlösung inkubiert.

Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Cys3 1:500 goat-anti rabbit) und die Darstellung mit dem Immunfluoreszenzmikroskop.

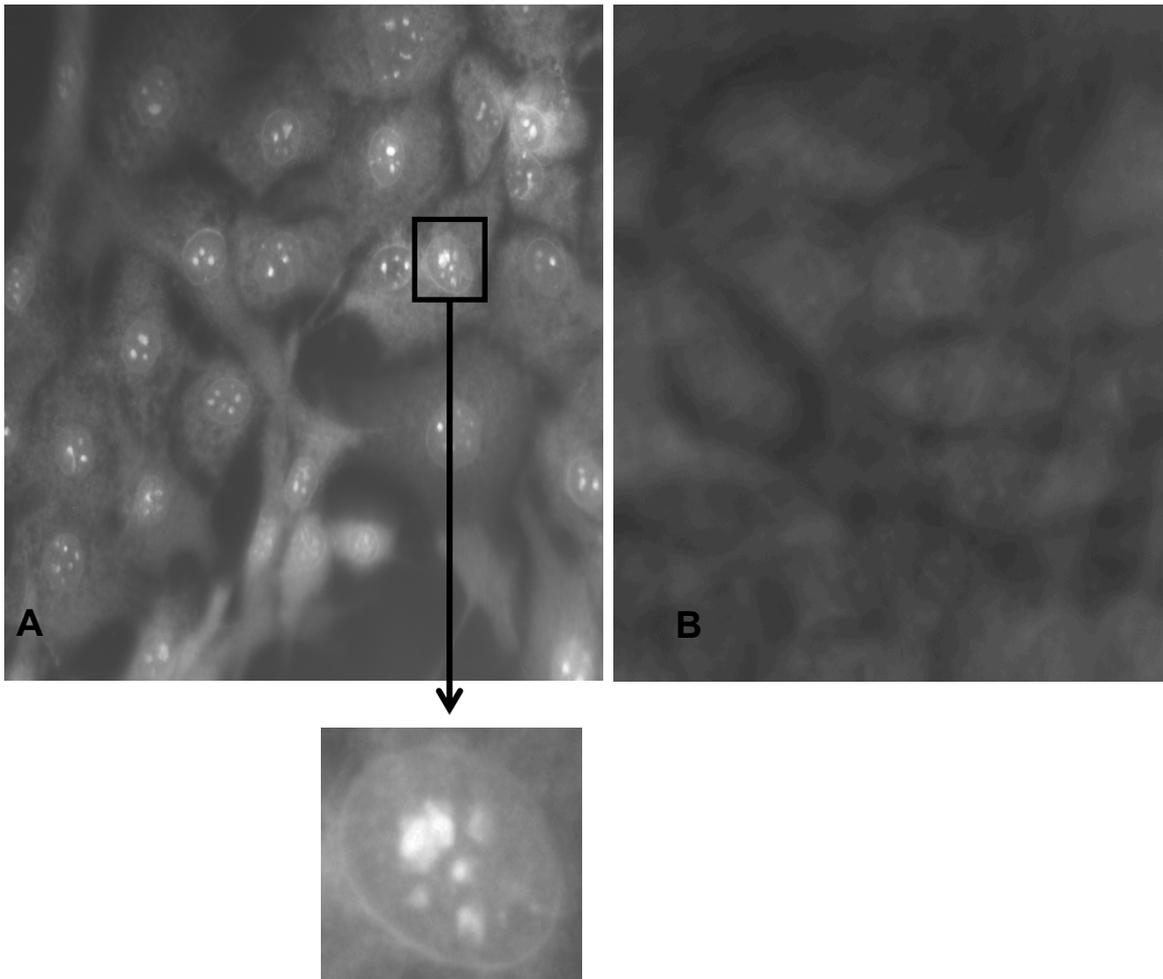


Abbildung 22: Immunfluoreszenzmikroskopie DEK **A:** Immunfluoreszenz kultivierter HeLa Zellen, welche mit nach Inkubation mit dem affinitätsgereinigten Antikörper mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurden. Es zeigt sich ein Färbemuster, welches die Korrelation des DEK Proteins zum Nukleus erkennen lässt. Exemplarisch ist ein Nukleus vergrößert dargestellt. **B:** Negativkontrolle kultivierter HeLa Zellen, welche keine Inkubation mit dem Primärantikörper erfahren haben.

3.6 Immunogold Lokalisation CAN/Nup214*

**Diese Ergebnisse wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Fahrenkrog M.E. Müller Institut für Strukturbiologie, Biozentrum, Universität Basel erstellt. Zur Durchsicht der verwendeten Materialien und Methoden siehe (Fahrenkrog 2011).*

Zur exakten Lokalisation des Nup214/CAN Proteins und des DEK/CAN Fusionsproteins innerhalb der 3D Architektur eines NPC in Zellen von t(6;9) positiver AML wurde der in 3.4.2 beschriebene Antikörper für die Immunelektronenmikroskopie verwendet. Es wurden Blasten von 5 Patienten mit t(6;9) Translokation (Tabelle3) verwendet, welche mit dem Antikörper inkubiert und mit 8nm Goldpartikeln konjugiert wurden.

Initialen	Alter	Sex	FAB	Überleben	Zytogenetik
AN	34	m	M2	10 Monate	46,XY,t(6;9)(p23;q34) [17]
TM	20	m	M5a	8 Monate	46,XY,t(6;9)(p23;q34) [12] / pB: 46,XY,t(6;9)(p23;q34) [4]
BA	18	w	M2	8 Monate	46,XX,t(6;9)(p23;q34) [24]
NA	25	m	M2	4 Monate	46,XY,t(6;9)(p23;q34) [18] / 46,XY [1]
ME	78	m	M0	Keine Daten	46,XY,t(6;9)(p23;q34) [18] / 46,XY [1]

Tabelle 3: Patientendaten der verwendeten Proben. Bei allen konnte eine t(6;9) Translokation nachgewiesen werden. Vier der Patienten waren jung und wiesen ein Durchschnittsalter von 24,25 Jahren auf. Das durchschnittliche Überleben betrug 7,5 Monate. Ein Patient war 78 Jahre, dessen „Follow up“ jedoch nicht dokumentiert wurde. (FAB: French-American-British Klassifikation)

Als Kontrolle dienten die FH1-1 Zelllinie, eine Leukämiezelllinie mit der t(6;9) Translokation und eine HL-60 Zelllinie, bei welcher es sich um myeloide Blasten ohne die entsprechende Translokation handelt. Die Verteilung der Goldpartikel zeigte sich in den Patientenproben und der FH1-1 Zelllinie in Bezug auf den NPC sowohl auf zytoplasmatischer, als auch nukleoplasmatischer Seite (Abbildung 23). Dagegen wurde in der HL-60 Zellreihe der Marker exklusiv auf

der zytoplasmatischen Seite lokalisiert (Abbildung 24). Die ermittelten Marker wurden quantifiziert und die Abstände in Bezug auf die Äquatoralebene und die octogonale Speichensymmetrie vermessen (Tabelle 4), umso das Verteilungsmuster der Fusionsproteine zu bestimmen (Abbildung 25).

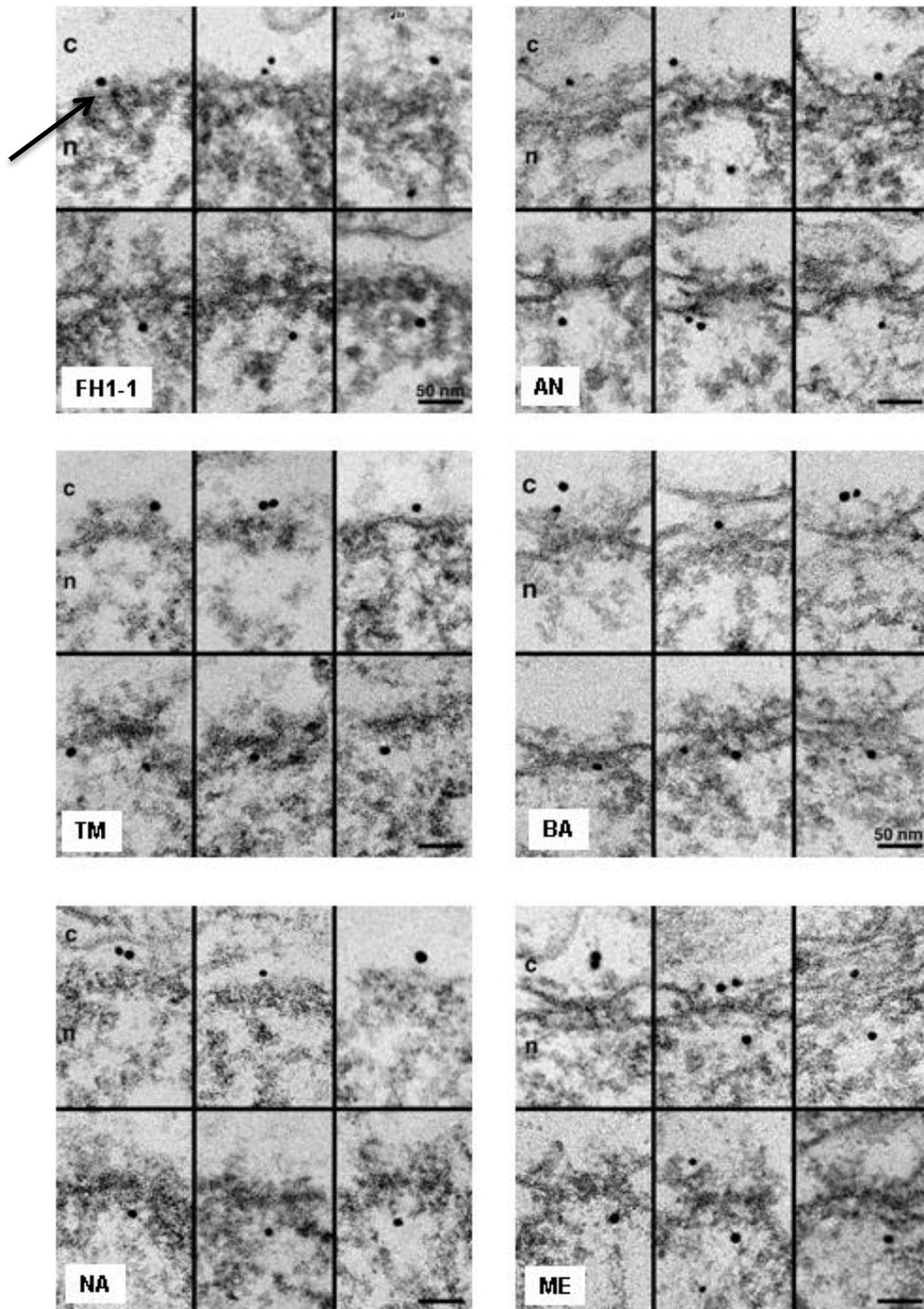


Abbildung 23: Lokalisation von Nup214/CAN in peripheren Blastenzellen bei AML Patienten. Triton X-100 permeabilisierte Zellen wurden mit dem Anti-Nup214/CAN Antikörper inkubiert und an 8nm Goldpartikel konjugiert. Dargestellt sind ausgewählte immunoelektronenmikroskopische Abbildungen mit dem Verteilungsmuster der Partikel (Pfeilmarkierung) (c, Zytoplasma; n, Nukleus. Skala mit 50 nm; FH1-1 Zelllinie mit t(6;9) Translokation; AN, TM, BA, NA, ME Initialen der Patienten).

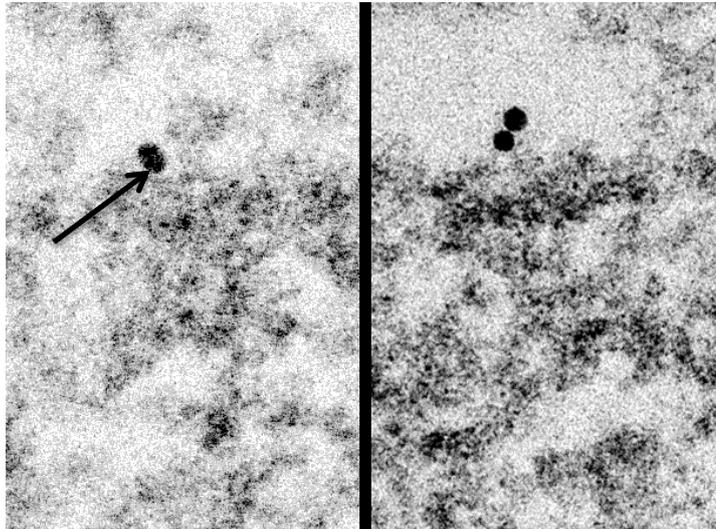
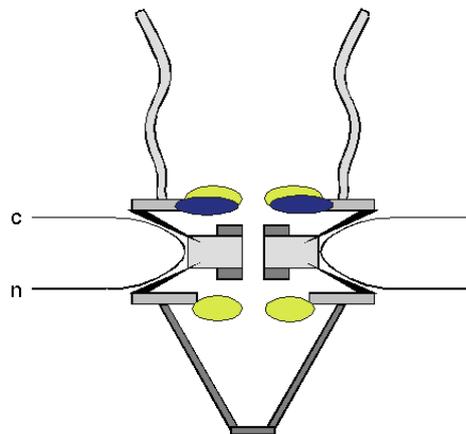


Abbildung 24: Lokalisation von Nup214/CAN in HL 60 Zellen. Es zeigt sich eine exklusiv zytoplasmatische Lokalisation (Pfeilmarkierung).



- Nup214/CAN in chromosomal translocations
- Nup214/CAN in control cells

Abbildung 25 : Schematische Darstellung der Lokalisation von Nup214/CAN in myeloischen und nicht-myeloischen Zellen im Gefüge der 3D Architektur eines NPC durch elliptische "Lokalisationswolken". In Zellen der chromosomalen Translokation (gelb) ist Nup214/CAN sowohl auf zytoplasmatischer Seite (c), als auch auf nukleoplasmatischer Seite (n) lokalisiert, während in der Kontroll-Zellpopulation (blau) eine exklusive zytoplasmatische Lokalisation zu finden ist. Das Zentrum jeder Lokalisationswolke repräsentiert den durchschnittlichen Abstand von der Äquatorialebene und der symmetrischen Anordnung wie in der Einleitung dargestellt. Die Durchmesser der Lokalisationswolken sind durch die Standardabweichung der vertikalen und radialen Abstände definiert.

Patient/Zelllinie	Abstand von der Äquatorialebene [nm]	Abstand von der oktogonalen Symmetrie Achse [nm]
AN	27.0 ± 6.4	14.9 ± 10.9
	-25.1 ± 3.9	18.1 ± 10.9
BA	25.8 ± 7.5	13.1 ± 8.3
	-26.1 ± 7.7	12.3 ± 10.9
ME	28.8 ± 5.9	14.5 ± 9.2
	-25.9 ± 5.7	10.8 ± 5.3
NA	23.1 ± 4.7	12.6 ± 8.6
	-25.4 ± 4.8	9.9 ± 6.3
TM	21.4 ± 4.0	19.1 ± 12.2
	-20.8 ± 3.5	14.4 ± 12.0
FH1-1	19.7 ± 6.5	14.9 ± 11.6
	-32.3 ± 5.8	14.7 ± 7.7
HL60	20.3 ± 3.9	16.3 ± 10.7

Tabelle 4: Lokalisation von Nup/214/CAN in Patienten- und Kontrollzellen. Die oberen Zahlenwerte zeigen die jeweiligen Abstände in Bezug zur zytoplasmatischen Seite, die darunter liegenden den Bezug zur nukleoplasmatischen Seite. In Bezug auf die Äquatorialebene zeigen 80 % der Goldpartikel, welche auf der zytoplasmatischen Seite detektiert wurden einen Abstand zwischen 20 und 40nm und einen durchschnittlichen Abstand von 23.8nm ± 5.9nm. Der durchschnittliche Abstand zur oktogonalen Symmetrieachse beträgt 14.1nm ± 9.8nm. Auf nukleoplasmatischer Seite wurden die Goldpartikel zwischen -20nm und -40nm dargestellt (durchschnittlicher Abstand 14.1nm ± 9.8nm). Der durchschnittliche Abstand zur oktogonalen Symmetrieachse beträgt 14.1nm ± 9.8nm. Vergleiche ebenfalls Abbildung 25.

4. Diskussion

Die Erforschung der Kernpore hat deren zentrale Rolle als Schaltstelle des nukleozytoplasmatischen Transports der Zelle bestätigt. Synonyme wie „Torwächter des Nukleus“ (Wente 2000), „gene gating“ (Blobel 1985), oder „Grand Central Station“ (Tran and Wente 2006) zeigen dies anschaulich. Hier findet der gesamte Austausch von Proteinen, RNA und bei einigen Virusinfektionen auch von DNA zwischen Zyto- und Nukleoplasma statt. Von daher ist es nicht verwunderlich, dass parallel zur Aufklärung der Grundstrukturen der Kernporen und des nukleären Transports einige Erkrankungen bekannt wurden, welche mit diesem koinzidieren. Dabei sind Veränderungen im Bereich der Nukleoporine von Bedeutung, welche erstmalig in der Assoziation mit hämatopoetischen Neoplasien beschrieben wurden (von Lindern, Fornerod et al. 1992). Nup214/CAN ist ein Onkogen, welches in akuten myeloischen Leukämien durch eine chromosomale Translokation t(6;9) ein neues Fusionsprotein hervorbringt. Die Translokation t(6;9) ist mit einer schlechteren Prognose für den Patienten verbunden. Während das Durchschnittsalter bei den akuten myeloischen Leukämien im Median das 65. Lebensjahr beträgt, manifestiert sich bei der Translokation t(6;9) die Erkrankung bereits zwischen dem 25. und 30. Lebensjahr. Die Patienten haben in der Regel eine höhere Zahl an Leukozyten, eine höhere Anzahl an Blasten und eine signifikant geringere Rate an kompletten Remissionen (Chi, Lindgren et al. 2008). Der genaue onkogene Mechanismus ist bislang noch nicht verstanden, insbesondere, welche Auswirkungen das neue Genprodukt auf das Gefüge des Kerntransportes besitzt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die von Kraemer et al. begonnene Arbeit zu Nup214/CAN als Fusionsprotein mit DEK fortgesetzt (Kraemer, Wozniak et al. 1994). Es konnten die sequenzierten und in *E. coli* exprimierten Fusionsproteinanteile DEK, CAN Mitte und CAN 80/81 amplifiziert und mittels der oben beschriebenen Induktionsprobe den von Kraemer ermittelten Molekulargewichten zugeordnet werden. Nach Auftrennung mit Hilfe der

Affinitätschromatographie erfolgte der Proteintransfer mit der Western Blot Technik. Es konnten affinitätsgereinigte Antikörper gewonnen werden, welche an HeLa Zellkulturen die Lokalisation der Fusionsproteine im Bereich des Zellkerns und der Kernhülle gezeigt haben. In einem nachfolgenden Schritt konnte in Kooperation mit dem Biologischen Institut Basel mittels Immuno-Gold-Lokalisation von Nup214/CAN in Leukämiezellen mit einer chromosomalen Translokation t(6;9) erstmalig die Lokalisation des Proteins auf beiden Seiten einer Kernpore gezeigt werden.

Die Resultate dieser Doktorarbeit sind in Ergebnisse eingeflossen, welche am Kongress der „American Society of Hematology“ 2005 präsentiert wurden (Kraemer 2005) und zur Publikation geplant sind (Fahrenkrog et al. 2011 in Bearbeitung).

In HeLa Zellen und Xenopus Oozyten ist Nup214/CAN ein Kernporenprotein, welches auf der zytoplasmatischen Seite der Kernpore lokalisiert ist (Kraemer, Wozniak et al. 1994) (Walther, Pickersgill et al. 2002). Eine Leukämie mit einer t(6;9) Translokation ist durch eine Fusion von Nup214/CAN mit dem DEK Protein gekennzeichnet. Dieses Fusionsprotein konnte in HeLa Zellen überexprimiert dargestellt werden (Boer, Bonten-Surtel et al. 1998). Eine Darstellung der Lokalisation in leukämoiden Blasten wurde bisher noch nicht beschrieben. Mit Hilfe des von mir hergestellten, affinitätsgereinigten Anti-CAN 80/81/CAN Antikörper konnte erstmalig mit Hilfe der Immunelektronenmikroskopie an blastären Zellen von Patienten mit einer t(6;9) Translokation eine Lokalisation des Fusionsproteins auf beiden Seiten einer Kernpore gezeigt werden. Diese Mislokalisierung könnte einen pathogenetischen Mechanismus darstellen, in welchem das Gleichgewicht zwischen Import und Export gestört ist und somit zu einem Überlebensvorteil der Zelle führt.

In der Mehrheit der Fälle kommt es im Rahmen von akuten Leukämien zu einer Bildung von chromosomalen Translokationen, welche eine zentrale Rolle in der Pathogenese darstellen. Daraus resultierende onkogene Fusionsproteine interagieren häufig mit Regulationsmechanismen des Zellwachstums, der

Differenzierung und dem Überleben von hämatopoetischen Zellen (Crans and Sakamoto 2001). Sie stellen zum einen ein diagnostisches Werkzeug, zum anderen einen Ansatz zur Entwicklung neuer therapeutischer Optionen dar. Es stellt sich die Frage, welche Auswirkung die Mislokalisierung von Nup214/CAN auf die Zelle und den Kerntransport besitzt und ob dies als onkogener Mechanismus ausreichend ist, um eine maligne Transformation zu induzieren. Ebenso ist zu eruieren, welche Auswirkungen DEK als Teil des Fusionsproteins auf die maligne Progression besitzt.

Ein störungsfreier Ablauf des Kerntransportes ist für die Zelle von enormer Bedeutung. Die experimentelle Depletion von Nukleoporinen ist hierbei ein Ansatzpunkt um die Auswirkungen auf die Zelle direkt zu untersuchen. So zeigten Doye und Hurt in *Saccharomyces cerevisiae*, dass knapp die Hälfte der Nukleoporine von essentieller Natur sind (Doye and Hurt 1997). Ein „knock out“ von Nup214/CAN ist bereits während der frühen Embryonalentwicklung letal. Die Komponenten des Kerntransportes nehmen somit eine wichtige Rolle im Rahmen der Zelldifferenzierung, der Organogenese und der Gewebedifferenzierung ein (Yasuhara, Oka et al. 2009). Eine Alteration der Komponenten führt zu einem veränderten Transportverhalten von Transkriptionsfaktoren und kann somit Einfluss auf die Onkogenese nehmen. So verhindert die Depletierung von Nup214/CAN die Zellproliferation und den mRNA Export (Forler, Rabut et al. 2004). Nup214 besitzt aber nur einen begrenzten Effekt auf den Importin α /Importin β vermittelten Transport (Walther, Fornerod et al. 2001). Die Beeinträchtigung des Kerntransportes durch die Mislokalisierung von Nup214/CAN zur nukleoplasmatischen Seite der Kernpore könnte auch eine Zellproliferation induzieren oder apoptotische Zellmechanismen modifizieren (Ferrando-May, Cordes et al. 2001).

Welchen Einfluss eine aberrante Lokalisation von Nup214/CAN hat, kann am Beispiel des SET-CAN Fusionsproteins gezeigt werden. Das Fusionsprotein ist ebenfalls im Zellkern lokalisiert. Dadurch kommt es zu einer Interaktion mit Exportin-1 und zu einer Akkumulation desselben. Die Folge ist ein deutlich

reduzierter Export von NES-Proteinen (Saito, Miyaji-Yamaguchi et al. 2004). Im Falle von DEK-Nup214/CAN zeigt sich eine gesteigerte Proteinexpression, welche nur in leukämischen Zellen mit diesem Fusionsprotein nachgewiesen werden konnte. Pathogenetischer Mechanismus ist hierbei eine gesteigerte Translationsaktivität des Proteins EIF4E, welche mit DEK-Nup214/CAN korreliert (Ageberg, Drott et al. 2008). Ob dieser Effekt durch die Mislokalisierung von DEK-Nup214/CAN zustande kommt, wurde bisher noch nicht beschrieben.

Darüberhinaus sind Fusionsproteine für die Entfaltung ihres malignen Potentials an eine bestimmte Lokalisation gebunden. So ist das Genprodukt ABL1-Nup214/CAN, anders als sein „Verwandter“ BCR-ABL1, für die Aktivität und onkogene Wirkung streng im Bereich der Kernpore lokalisiert (De Keersmaecker, Rocnik et al. 2008). Ebenso unterscheidet sich das Fusionsprotein im Vergleich zu der BCR-ABL1 Mutation in seinen katalytischen Eigenschaften (De Keersmaecker, Versele et al. 2008).

Auch in anderen Krankheitsbildern ist eine Mislokalisierung eines Proteins der pathognomonische Effekt. So weisen Phänotypen des autosomal rezessiven Triple-A-Syndroms mit dem klinischen Bild der Achalasie, Alacrimie und ACTH Insensitivität eine Mislokalisierung des Proteins ALADIN auf (Krull, M et al. 2010).

Das auf Chromosom 11p15 codierte Nup98 ist ein mobiles Nukleoporin, welches in den Transport von mRNA involviert ist (Radu, Blobel et al. 1995), (Griffis, Altan et al. 2002). Aktuell sind seit der Erstbeschreibung als Fusionsprotein (Borrow, Shearman et al. 1996) mehr als 20 verschiedene Translokationen beschrieben worden (Pan, Zhu et al. 2008), (Such, Cervera et al. 2011). Die häufigste Translokation findet sich mit der Familie der Homeoboxproteine, welche für verschiedene Transkriptionsfaktoren codiert (Argiropoulos and Humphries 2007), in verschiedenen Clustern (A-C; D nicht physiologisch) vorkommt und im Rahmen der Hämatopoese verstärkt exprimiert wird. Die Fusionsproteine wirken als aberrante Transkriptionsfaktoren. Die Pathomechanismen sind den Nup214/CAN ähnlich. Bei der Nup98-HoXA9-Translokation kommt es beispielsweise zu einer Blockade von hämatopoetischen Stammzellen (Takeda, Goolsby et al. 2006). Daneben

kommt es zu einer veränderten Interaktion von Exportin-1 und Nup214/CAN und zu einer Blockade des Proteinexportes (Takeda, Sarma et al. 2010). Die chromosomalen Translokationen sind nicht allein auf den Formenkreis der akuten myeloischen Leukämien beschränkt. Chronisch myeloische Leukämien, das myelodysplastische Syndrom, lymphoblastische T-Zell-Leukämien und myeloproliferative Syndrome zählen ebenfalls zum Krankheitsspektrum. Das Wissen um die chromosomale Translokation von Nup98 mit HoxA9 haben sich Quere et al. zunutze gemacht. Mit dem Modulator der TGF- β Familie Smad4 konnte im Mausmodell ein positiver Effekt in der Blockade der malignen Transformation erreicht werden (Quere, Karlsson et al. 2011).

Es stellt sich die Frage, ob die Mislokalisierung von DEK-Nup214/CAN für eine maligne Progression ausreichend ist, oder ob dies wie in anderen Fällen ein multifaktorielles Geschehen ist. In ca. 90% einer t(6;9) positiven AML kommt es ebenfalls zu einer Mutation der Tyrosinkinase FLT3 (Thiede, Steudel et al. 2002), welche den Schluss nahe legt, dass diese zusätzliche genetische Alteration zusammen mit DEK-Nup214/CAN die Entwicklung einer Leukämie durch die Beeinflussung der Zellproliferation und/oder Differenzierung begünstigt (Parcells, Ikeda et al. 2006). Somit ist das Verteilungsmuster von DEK-Nup214/CAN eher als Teil einer multifaktoriellen Zusammenspiels verschiedener genetischer Aberrationen anzusehen, um physiologische Abläufe zu beeinträchtigen und somit eine AML zu induzieren (Deguchi and Gilliland 2002).

Bei der Bildung von Fusionsproteinen bleiben die FG-reichen Domänen von Nup214/CAN erhalten und damit möglicherweise auch die oben erwähnten Funktionen im Proteintransport. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass auch die Eigenschaften des zweiten Anteils des Fusionsproteins DEK erhalten bleiben.

Welche Eigenschaften muss das neu entstandene Genprodukt mitbringen, um im Vergleich zu anderen einen Selektionsvorteil zu erhalten? Gesetz dem Fall, dass mit der Entstehung des Fusionsproteins die Eigenschaften beider Proteine in vollem Umfang erhalten bleiben, können sich folgende Überlegungen ergeben:

Wie in der Einleitung erwähnt, besitzt das Protein DEK eine Vielzahl von regulatorischen Eigenschaften und einen großen Einfluss auf den Zellzyklus. Überwiegend an Chromatin gebunden, ist es Bestandteil mitotischer Chromosomen, reguliert die Transkription und wirkt bei der DNA-Reparatur und der Apoptose mit. Seine apoptotische Wirkung wie beispielsweise durch Interaktion mit Caspasen (Lee, Kim et al. 2008) steht im Gegensatz zu dem anti-apoptotischen Potential, welches DEK ebenfalls besitzt. Eine hohe aktive Konzentration des Proteins findet sich sowohl in proliferationsaktiven Zellen, als auch in malignen Zellen (Kappes, Burger et al. 2001), (Savli, Aalto et al. 2002) und führt zu einer verlängerten Lebensspanne (Wise-Draper, Allen et al. 2006). Hierfür ist die Interaktion mit p53, HAT, und den inflammatorischen Proteinen NF- κ B und TNF α mitverantwortlich (Sammons, Wan et al. 2006). Diese Effekte könnten auch für das Fusionsprotein DEK-Nup214/CAN gelten. Bei einer Mislokalisierung des Proteins und einer Zäsur in dessen physiologischen Eigenschaften hat es den Anschein, als sei DEK die Triebfeder in der malignen Progression bei Neoplasien wie dem hepatozellulären Karzinom, dem Retinoblastom, dem Blasenkarzinomen (Carro, Spiga et al. 2006) und eben auch bei akuten Leukämien (von Lindern, Fornerod et al. 1992). Nup214/CAN kommt in diesem Fall nur die Rolle des Trägerproteins zu. Diese Schlussfolgerung kann durch zwei weitere Fakten unterstützt werden. Zum einen ist das Nukleoporin für stoffwechselaktive Prozesse, wie dem nukleären Import entbehrlich (Walther, Pickersgill et al. 2002). Zum anderen führt eine Überexpression von Nup214 zu einem G0 Arrest und Defekten im mRNA Export mit der Folge von Einschränkungen im Zellwachstum und dem Überleben (Boer, Bonten-Surtel et al. 1998). Beide Punkte sind für das Tumorwachstum und einen Selektionsvorteil eher kontraproduktiv und unwahrscheinlich. Es mehren sich Hinweise, dass sich die Eigenschaften von DEK und Nup214/CAN vielmehr potenzieren. Dies könnte bei der nachgewiesenen Mislokalisierung von Nup214/CAN auf beiden Seiten der Kernpore eine Erklärung zur malignen Progression liefern.

Wie in Tabelle 1 beschrieben, ist die Translokation t(6;9) nicht das einzige Genprodukt, welches in Verbindung mit Nup214/CAN im Rahmen von akuten Leukämien beschrieben wurde.

Die Inversion t(9;9)(q34;q34) (von Lindern, Breems et al. 1992) oder die Deletion (9)(q34.11q34.13) (Van Vlierberghe, van Grotel et al. 2008) führt zu einem Fusionsprotein SET-CAN. Dieses wurde im Rahmen einer akuten undifferenzierten Leukämie, einer akuten lymphatischen T-Zell-Leukämie und in einem Fall bei einer akuten myeloischen Leukämie beschrieben (Rosati, La Starza et al. 2007). Dieses Protein gehört zum INHAT Komplex (inhibitor of histone acetylation and transcriptional activation) (Gamble, Erdjument-Bromage et al. 2005) und wirkt dort als Transkriptionsaktivator. Als Fusionsprotein mit Nup214/CAN bindet es an HOXA Promotorregionen, wo es mit Exportin und DOT1L als Transkriptionsaktivator wirkt. Als Fusionsprotein scheint es die Pathogenese bei akuten lymphatischen T-Zell-Leukämien durch eine Hemmung der T-Zell-Differenzierung zu begünstigen (Van Vlierberghe, van Grotel et al. 2008).

Eine dritte mit Nup214/CAN assoziierte chromosomale Translokation wurde im Rahmen einer akuten lymphatischen T-Zell-Leukämie entdeckt. Die episomale Amplifikation des ABL1 Gens im Bereich 9q34 führt zu einem Fusionsprotein mit dem 3'Ende des ABL1 Gens, einem Teil des LAMMC3 Gens und dem Großteil von Nup214/CAN (Graux, Cools et al. 2004). Dieses Produkt der chromosomalen Translokation t(9;22) bei chronisch myeloischen Leukämien wurde Ziel der Therapie mit dem Thyrosinkinaseinhibitor „Imatinib[®]“ und eröffnete neue Behandlungswege in der Onkologie (Gambacorti-Passerini 2008).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die erstmals gezeigte Mislokalisierung von Nup214/CAN-DEK auf beiden Seiten der Kernmembran einen neuen Baustein zur Entschlüsselung der Entstehung von akuten myeloischen Leukämien darstellt. Das Nukleoporin Nup214/CAN spielt eine wichtige Rolle in der malignen Progression und ist auch bei anderen leukämischen Entitäten von

übergeordnetem Interesse. Die Grundlagenforschung an Strukturen der Zelle und von zellulären Abläufen für die Diagnostik und Therapie hämatologischer Erkrankungen wird auch weiterhin ein essentieller Bestandteil bleiben. Es stellt sich die Aufgabe, die in die aberrante Lokalisation involvierten Strukturen und Regulationsprozesse zu charakterisieren, um somit möglicherweise neue Therapieansätze oder ein besseres Verständnis der AML zu erreichen.

5. Zusammenfassung

Das elementare Kennzeichen der eukaryontischen Zelle ist der Zellkern, in welchem die Erbinformation in Form der DNA vorliegt. Dieser ist von einer äußeren Kernhülle umgeben, welche kontinuierlich in das endoplasmatische Retikulum übergeht. An der inneren Kernhülle setzt die Kernlamina an. Unterbrochen wird die Kernhülle durch die Kernporen. Diese bestehen aus Untereinheiten, welche als Nukleoporine bezeichnet werden. Eine wesentliche Aufgabe der Kernporen ist der Transport von Makromolekülen, welche durch spezifische Transportsignalsequenzen gekennzeichnet sind. Es mehren sich die Hinweise, dass die Nukleoporine nicht allein für den Kerntransport verantwortlich sind, sondern auch regulatorische Eigenschaften bei Mitose, der Expression von Proteinen und der Stabilisierung des Genoms übernehmen. Nach der Entdeckung der Philadelphia Translokation bei der chronisch myeloischen Leukämie wurden eine Reihe weiterer chromosomaler Translokationen im Rahmen von hämatologischen Neoplasien beschrieben. Hierbei sind auch Nukleoporine involviert. Es entstehen Fusionsproteine, welche ein neues Verteilungsmuster der Proteine erzeugen und möglicherweise auch neue Funktionen innehaben. Nup214/CAN ist ein Onkogen, welches in akuten myeloischen Leukämien mit einer chromosomalen Translokation einhergeht t(6;9). Diese Translokation t(6;9) ist mit einer schlechteren Prognose für den Patienten verbunden. Der genaue onkogene Mechanismus ist noch nicht ausreichend verstanden.

Ziel dieser Doktorarbeit war die Frage, welches Verteilungsmuster Nup214 als Fusionsprotein mit einer veränderten NLS in Leukämiezellen der chromosomalen Translokation t(6;9) aufweist, zu beantworten. Zu diesem Zweck wurden die Fusionsproteinfragmente DEK, CAN Mitte und CAN 80/81 in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt und der Herstellung eines spezifischen Antikörpers zugeführt. Hierzu wurden die mit den Proteinfragmenten transfizierten *E. coli* amplifiziert. Nach Lyse der Zellen wurden die Proteinfragmente elektrophoretisch getrennt und den ermittelten Molekulargewichten zugeordnet. Mit Hilfe einer

Affinitätschromatographie und einem Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran wurde mit polyvalentem Serum eine Affinitätsreinigung des Antikörpers durchgeführt. Dadurch konnten spezifische Antikörper generiert werden, welche in der Immunfluoreszenz die physiologischen Verteilungsmuster zeigten. In einem nachfolgenden Schritt konnte in Kooperation mit dem Biologischen Institut Basel mittels Immuno-Gold-Lokalisation von Nup214/CAN in Leukämiezellen mit einer chromosomalen Translokation t(6;9) erstmalig die Lokalisation des Proteins auf zytoplasmatischer und nukleoplasmatischer Seite einer Kernpore gezeigt werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass es durch diese Mislokalisierung zu einer Störung des nukleären Transports kommen kann, der wiederum zu einem Wachstumsvorteil oder einer Inhibition der Apoptose der Leukämiezellen führt.

6. Abkürzungsverzeichnis

AS: Aminosäure

APLS Motiv: ArfGAP1 lipid packing sensor

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA: Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)

EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure

ER: Endoplasmatisches Retikulum

FG-reiche Motive: Phenylalanin- und Glycin- reiche Sequenzmotive

GAP: GTPase-activating protein

HBSS: HEPES Buffered Saline Solution

Kap: Karyopherin

IF: Intermediärfilament

INM: Innere Kernmembran (inner nuclear membrane)

IPTG: Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid

LB – Medium: lysogeny broth Medium

M: Mol

NCT: nukleozytoplasmatischer Transport (nucleocytoplasmatic transport)

NE: Nuclear envelope

NPC: Kernporenkomplex (nuclear pore complex)

Nup: Nukleoporin (Nucleoporine)

Ni²⁺-NTA: Nickel- Nitrilotriessigsäure

nm: Nanometer

ONM: Äußere Kernmembran (outer nuclear membrane)

PBS: phosphate buffered saline

PSMF: Phenylmethylsulfonylfluorid

Rpm: rounds per minute

S: Svedberg Einheit

SDS: sodium dodecyl sulphate

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulphate polyacrylamid gel electrophoresis

RT: Raumtemperatur

TEMED: Tetramethylethyldiamin

TRIS: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Tween®: Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat

(v/v): Volumen/Volumen

(w/v): Gewicht/Volumen

7. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: aus (Roux and Burke 2007): Überblick über die Kernmembran. Eine Auswahl an Proteinen mit den Hauptkomponenten innere Kernmembran (INM), äußere Kernmembran (ONM), Kernporenkomplexe (NPC) und die Kernlamina ist dargestellt. Nesprin (dunkelgrün) verbindet über die Sun1/2 Proteine die Kernmembran mit dem Zytoskelett. Ebenso sind Lamina assoziierte Polypeptide (LAP 1 und 2) und mit Chromatin interagierende Proteine wie Emerin und MAN1 dargestellt. 2
- Abbildung 2: A: oktagonale Darstellung einer Kernpore (Gall 1967)..... 4
- Abbildung 3 (links) aus (Alber, Dokudovskaya et al. 2007) und Abbildung 4 (rechts) aus (Fernandez-Martinez and Rout 2009). Zu 3: Darstellung der einzelnen Untereinheiten eines NPC. Mlp1 und Mlp2, welche für die Bildung der Korbstruktur postuliert werden (Krull, Thyberg et al. 2004), sind nicht berücksichtigt. Entsprechend ihrer Funktion und Lokalisation wurden die Substrukturen farblich dargestellt: transmembranöser Ring (braun), innerer Ring (violett), äußerer Ring (gelb), „linker Nup`s“ (türkis) und FG Nup`s (grün). Die Kernmembran ist in grau gehalten. Eine Speiche ist als Auszug gesondert aufgeschlüsselt. Zu 4: Nup`s aus der Hefe- und Vertebratenzelle werden korrespondierend gelistet. Die farbliche Trennung entspricht den einzelnen Substrukturen aus Abbildung 3..... 7
- Abbildung 5: aus (Alber, Dokudovskaya et al. 2007) a: Schnitt durch einen NPC. Die dargestellten Nukleoporine sind entsprechend ihrer Lokalisation und Volumina (Alber, Dokudovskaya et al. 2007) dargestellt. Die farbliche Darstellung der Nukleoporine entspricht der aus Abbildung 3. Die unstrukturierten FG-Domänen werden als grüne Wolke mittels der Chimera-Technik (Pettersen, Goddard et al. 2004) dargestellt. b: Darstellung der wahrscheinlichen Lokalisation der FG-Nup`s. Rot dargestellt sind exklusiv zytoplasmatisch lokalisierte FG-Nup`s (Nup42, Nup100, Nup116 und Nup159), blau für die nukleoplasmatische Lokalisation (Nup60, Nup145N und Nup1). In weißer Farbe werden zu

beiden Seiten ermittelte Nup`s gehalten (Nup49, Nup53, Nup57, Nup59 and Nsp1). Die Äquatorialebene ist mit einer weiß-gestrichelten Linie dargestellt, grau-gestrichelt der NPC und violett die Kernmembran. Überlappungen der einzelnen FG-Regionen sind durch Farbübergänge erkennbar. Eine 25nm Skala zeigt die Größenrelation. Die korrespondierenden Vertebraten Nukleoporeine können aus Abbildung 3 entnommen werden. 19

Abbildung 6: aus (Akey 1990): Verschiedene Transportkonfiguration im "double iris model" mit Buchstabennummerierungen (rechts oben a-e). In der oberen Zeile sind elektronenmikroskopische Aufnahmen zu sehen, in der unteren Zeile Schemazeichnungen. a und b zeigt das Andocken eines Substrates, c und d während des Transportvorganges und e und f in der geöffneten Form..... 21

Abbildung 7: aus (Rout, Aitchison et al. 2003): Das „virtual gating model“ Es zeigt das Verhalten (a) eines Substrates (türkis) ohne Transportrezeptor und (b) mit einem Transportrezeptor (grün) mit Substrat (türkis). Nur mit Hilfe eines Rezeptors gelingt die Passage durch die Kernpore NPC (blau). 21

Abbildung 8: aus (Macara 2001): Das „oily-spaghetti“ Modell. Moleküle >10nm können nicht durch die Pore diffundieren, sie werden durch die FG-Domänen (zufällig gezeichnete Striche) abgehalten. Substrat-Rezeptorkomplexe binden via Transportprotein mit schwachen intermolekularen Wechselwirkungen an den FG-Domänen und können so hindurchdiffundieren. Die Richtung wird dabei durch RanGTP vorgegeben und nicht durch die Pore selbst..... 23

Abbildung 10: aus (Peters 2005): Das "Reduction-of-dimensionality model" A: Der NPC wird als großer Kanal dargestellt, welcher durch FG Motive (rot dargestellt) ausgekleidet ist und als Bindungsstelle für Transportrezeptoren dient. Der Zentralkanal ist mit einem losen Netzwerk von hydrophoben ungefalteten Peptidketten ausgefüllt. B: Die FG Oberfläche wird in verschiedene Regionen eingeteilt. Während in dem filamentösen Abschnitt

die Transportkomplexe gesammelt werden, werden sie im Zentralkanal durchgeleitet, um dann wieder auf der gegenüberliegenden filamentösen Seite entlassen zu werden. C: Kleine Moleküle, wie Ionen können via Diffusion den NPC passieren, große inerte Moleküle ohne Transportrezeptor können nicht passieren. D: Transportkomplexe binden an Filamente oder dem Kanaleingang, um in zufälliger 2D Manier dem Kanalausgang überführt zu werden..... 24

Abbildung 11: aus (Weis 2007): schematische Darstellung wie FG–Domänen eine Selektivität erreichen können. A: zeigt das „virtual gate model“ von Rout (Rout, Aitchison et al. 2003), in welchem FG-repeats (orange) eine entropische Barriere bilden. Die Interaktion mit den FG–repeats erleichtert den Durchtritt. B: Im “selective phase model” (Ribbeck and Gorlich 2001) bilden die FG–Filamente durch Interaktionen ein 3D Maschenwerk, welches inerten Substraten die Passage verwehrt. C: Das “saturated hydrogel” von Frey und Görlich (Frey and Gorlich 2007) zeichnet sich durch ein Maximum an FG–Interaktionen aus. Es wird ein geordnetes Maschenwerk gebildet. 26

Abbildung 12: aus (Stewart 2007): schematische Darstellung des klassischen nukleären Imports. a: Beladung eines NLS-Proteins mit Importin β und α . Anschließend RanGTP vermittelte Dissoziation im Nucleus. Nucleoporine, wie Nup50 (Nup2 in der Hefe) verstärken diesen Vorgang. Anschließend rezirkulieren die beiden Transportfaktoren wie oben beschrieben wieder ins Zytosol. RanGAP führt dort wieder zu einer Freisetzung. b: parallel ablaufender RanGTP Zyklus. Blitze zeigen sowohl in a als auch in b die energieabhängigen Prozesse. 28

Abbildung 13: aus (Terry, Shows et al. 2007): Regulation des nukleozytoplasmatischen Transports in Bezug auf das Transportsubstrat (rosa), den Transportrezeptor (grün) und der Kernpore (blau). Auf der rechten Seite findet sich die hierarchische Gliederung mit den jeweils zugehörigen Mechanismen..... 29

- Abbildung 14 aus (Funasaka and Wong 2011): Schematische Darstellung der Generierung der Fusionsproteine (rechte Spalte) von Nup214 (links oben) mit den Proteinen Dek, Set und Abl..... 39
- Abbildung 15: Induktionsprobe des CAN Mitte Fusionsproteins. Die einzelnen Fraktionen wurden auf ein 12,5% SDS Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Linksbündig der Molekulargewichtstandard in kDa. In der Kopfzeile durchnummerierte Zahlen 1-10 werden unten erläutert. Trotz der Tatsache, dass die nicht induzierte Probe in 4 eine 5x höhere Konzentration als induzierte Probe in 5 aufweist, ist eine intensivere Anreicherung des Fusionsproteins auf Höhe der 66kDa Bande (Pfeilmarkierung) zu verzeichnen. Ebenfalls lässt sich das Fusionsprotein in 7 auch im Pellet nachweisen. 59
- Abbildung 16: Induktionsprobe des DEK und des CAN 80/81 Fusionsproteins. Die einzelnen Fraktionen wurden auf ein 12,5% SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Linksbündig der Molekulargewichtstandard in kDa. In der Kopfzeile durchnummerierte Zahlen 1-10 werden unten erläutert. In der Spalte 4 ist eine nicht induzierte Probe von DEK aufgetragen, das gesuchte Protein wird im Bereich von 66kDa erwartet. Dies ist in Spalte 7 dargestellt (Pfeilmarkierung) und lässt auf ein Vorkommen in unlöslichen „inclusion bodies schließen“, da wie in Spalte 6 dargestellt, nur marginal eine Anfärbung zu verzeichnen ist. Das Fusionsprotein 80/81 wird auf der Höhe der 45kDa Bande erwartet. Die gewünschte Bande in Spalte 10 befindet sich in diesem Gel zwischen der 66kDa und der 45kDa Bande (Pfeilmarkierung). In der nachfolgend dargestellten Affinitätschromatographie von CAN 80/81 ist die eindeutige Positionierung zu sehen. Ebenso wie im DEK Fusionsprotein befindet sich CAN 80/81 im Bakterienpellet und lässt sich durch Induktion suffizient exprimieren..... 59
- Abbildung 17: Affinitätschromatographie des CAN Mitte Fusionsproteins. Die einzelnen Fraktionen wurden auf ein 12,5% SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Linksbündig der Molekulargewichtstandard in kDa. In der Kopfzeile sind die verschiedenen Fraktionen des Gels

durchnummeriert, welche unten erläutert werden (EP= Elutionspuffer). In den Fraktionen 4-6 findet sich auf Höhe der 66kDa Bande (Pfeilmarkierung) die größte Anreicherung des Fusionsproteins CAN Mitte 60

Abbildung 18: Affinitätschromatographie des CAN 80/81 Fusionsproteins. Die einzelnen Fraktionen wurden auf ein 12,5% SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Linksbündig der Molekulargewichtstandard in kDa. In der Kopfzeile sind die verschiedenen Fraktionen des Gels durchnummeriert, welche unten erläutert werden (EP= Elutionspuffer). In den Fraktionen 5-7 findet sich auf Höhe der 45kDa Bande die größte Anreicherung des Fusionsproteins CAN 80/81 (Pfeilmarkierung). 61

Abbildung 19: Affinitätschromatographie des DEK Fusionsproteins. Die einzelnen Fraktionen wurden auf ein 12,5% SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Linksbündig der Molekulargewichtstandard in kDa. In der Kopfzeile sind die verschiedenen Fraktionen des Gels durchnummeriert, welche unten erläutert werden (BP=Bindepuffer; WP=Waschpuffer; EP= Elutionspuffer). In den Fraktionen WP 5 und 6 findet sich auf Höhe der 66kDa Bande die größte Anreicherung des Fusionsproteins DEK (Pfeilmarkierung). 62

Abbildung 20: Immunoblot mit CAN Mitte/AntiCAN Mitte Die Fusionsproteine Fraktion 12 EP wurden über ein 12,5% SDS-Gel auf Nitrocellulosemembran geblottet, mit dem korrespondierenden affinitätsgereinigten Antikörper inkubiert und mit dem Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Linksbündig sind die Molekulargewicht in kDa zu sehen. Dargestellt ist der Immunoblot mit CAN Mitte/Anti-CAN Mitte. Die Belichtungszeit betrug ca. 2 sec. Es lässt sich auf Höhe von 66kDa das gesuchte Fusionsprotein erkennen (Pfeilmarkierung), mit wie in Abb. (17) gezeigter Doppelbande. Auf Grund der besseren Darstellung wurde der Ausschnitt in schwarz/weiß Optik überführt. 63

Abbildung 21: Immunoblot mit CAN 80/81/Anti-CAN 80/81 Die Fusionsproteine Fraktion 12 EP wurden über ein 12,5% SDS-Gel auf Nitrocellulosemembran geblottet, mit dem korrespondierenden

affinitätsgereinigten Antikörper inkubiert und mit dem Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Linksbündig sind die Molekulargewichte in kDa zu sehen. 1: Immunoblot mit CAN 80/81/Anti-CAN 80/81. Die Belichtungszeit betrug ca. 2sec. Es lässt sich auf Höhe von 45kDa das gesuchte Fusionsprotein erkennen (Pfeilmarkierung). 2: Immunoblot mit CAN 80/81/Anti-CAN 80/81. Die Belichtungszeit betrug ca. 0,5sec. Bei kürzerer Belichtungszeit wird eine dreifache Bande sichtbar, wie sie auch in Abb.18 zu sehen ist. Auf Grund der besseren Darstellung wurde der Ausschnitt in schwarz/weiß Optik überführt. 64

Abbildung 22: Immunfluoreszenzmikroskopie DEK A: Immunfluoreszenz kultivierter HeLa Zellen, welche mit nach Inkubation mit dem affinitätsgereinigten Antikörper mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurden. Es zeigt sich ein Färbemuster, welches die Korrelation des DEK Proteins zum Nukleus erkennen lässt. Exemplarisch ist ein Nukleus vergrößert dargestellt. B: Negativkontrolle kultivierter HeLa Zellen, welche keine Inkubation mit dem Primärantikörper erfahren haben. 65

Abbildung 23: Lokalisation von Nup214/CAN in peripheren Blastenzellen bei AML Patienten. Triton X-100 permeabilisierte Zellen wurden mit dem Anti-Nup214/CAN Antikörper inkubiert und an 8nm Goldpartikel konjugiert. Dargestellt sind ausgewählte immunelektronenmikroskopische Abbildungen mit dem Verteilungsmuster der Partikel (Pfeilmarkierung) (c, Zytoplasma; n, Nukleus. Skala mit 50 nm; FH1-1 Zelllinie mit t(6;9) Translokation; AN, TM, BA, NA, ME Initialen der Patienten). 68

Abbildung 24: Lokalisation von Nup214/CAN in HL 60 Zellen. Es zeigt sich eine exklusiv zytoplasmatische Lokalisation (Pfeilmarkierung). 69

Abbildung 25 : Schematische Darstellung der Lokalisation von Nup214/CAN in myeloischen und nicht-myeloischen Zellen im Gefüge der 3D Architektur eines NPC durch elliptische "Lokalisationswolken". In Zellen der chromosomalen Translokation (gelb) ist Nup214/CAN sowohl auf zytoplasmatischer Seite (c), als auch auf nukleoplasmatischer Seite (n) lokalisiert, während in der Kontroll-Zellpopulation (blau) eine exklusive

zytoplasmatische Lokalisation zu finden ist. Das Zentrum jeder Lokalisationswolke repräsentiert den durchschnittlichen Abstand von der Äquatorialebene und der symmetrischen Anordnung wie in der Einleitung dargestellt. Die Durchmesser der Lokalisationswolken sind durch die Standardabweichung der vertikalen und radialen Abstände definiert..... 69

Tabelle 1: modifiziert aus (Martens and Stunnenberg): tabellarische Aufgliederung der häufigsten chromosomalen Translokationen..... 40

Tabelle 2: Gemessene optische Dichte der mit den jeweiligen Fusionsproteinen transfizierten E. coli für die präparative Induktion. Zur Bestimmung der ausreichenden Vermehrung wird eine OD von 0,6-1,0 angestrebt. Hier besitzen die Bakterien noch ausreichend Teilungspotential für die anschließende Induktion. Die obere Spalte zeigt die Zeit in Minuten an. Die nachfolgenden Spalten der mit dem jeweiligen Fusionsprotein transfizierte E. coli Stamm und der ermittelten OD. 57

Tabelle 3: Patientendaten der verwendeten Proben. Bei allen konnte eine t(6;9) Translokation nachgewiesen. Vier der Patienten waren jung und wiesen ein Durchschnittsalter von 24,25 Jahren auf. Das durchschnittliche Überleben betrug 7,5 Monate. Ein Patient war 78 Jahre dessen „Follow up“ jedoch nicht dokumentiert wurde. (FAB: French-American-British Klassifikation)..... 66

Tabelle 4: Lokalisation von Nup/214/CAN in Patienten- und Kontrollzellen. Die oberen Zahlenwerte zeigen die jeweiligen Abstände in Bezug zur zytoplasmatischen Seite, die darunter liegenden den Bezug zur nukleoplasmatischen Seite. In Bezug auf die Äquatorialebene zeigen 80 % der Goldpartikel, welche auf der zytoplasmatischen Seite detektiert wurden einen Abstand zwischen 20 und 40nm und einen durchschnittlichen Abstand von 23.8 nm ± 5.9 nm. Der durchschnittliche Abstand zur oktogonalen Symmetrieachse beträgt 14.1 nm ± 9.8 nm. Auf nukleoplasmatischer Seite wurden die Goldpartikel zwischen -20 nm und -40 nm dargestellt (durchschnittlicher Abstand 14.1 nm ± 9.8 nm). Der

durchschnittliche Abstand zur oktogonalen Symmetrieachse beträgt 14.1 nm \pm 9.8 nm. Vergleiche ebenfalls Abbildung 25..... 70

8.Literaturverzeichnis

1. Aaronson, R. P. and G. Blobel (1975). "Isolation of nuclear pore complexes in association with a lamina." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(3): 1007-1011.
2. Adam, S. A., T. J. Lobl, et al. (1989). "Identification of specific binding proteins for a nuclear location sequence." Nature **337**(6204): 276-279.
3. Adam, S. A., R. S. Marr, et al. (1990). "Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors." J Cell Biol **111**(3): 807-816.
4. Adrian, M., J. Dubochet, et al. (1984). "Cryo-electron microscopy of viruses." Nature **308**(5954): 32-36.
5. Aebi, U., J. Cohn, et al. (1986). "The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments." Nature **323**(6088): 560-564.
6. Ageberg, M., K. Drott, et al. (2008). "Identification of a novel and myeloid specific role of the leukemia-associated fusion protein DEK-NUP214 leading to increased protein synthesis." Genes Chromosomes Cancer **47**(4): 276-287.
7. Ageberg, M., U. Gullberg, et al. (2006). "The involvement of cellular proliferation status in the expression of the human proto-oncogene DEK." Haematologica **91**(2): 268-269.
8. Akey, C. W. (1989). "Interactions and structure of the nuclear pore complex revealed by cryo-electron microscopy." J Cell Biol **109**(3): 955-970.
9. Akey, C. W. (1990). "Visualization of transport-related configurations of the nuclear pore transporter." Biophys J **58**(2): 341-355.
10. Akey, C. W. and D. S. Goldfarb (1989). "Protein import through the nuclear pore complex is a multistep process." J Cell Biol **109**(3): 971-982.
11. Alber, F., S. Dokudovskaya, et al. (2007). "Determining the architectures of macromolecular assemblies." Nature **450**(7170): 683-694.
12. Alber, F., S. Dokudovskaya, et al. (2007). "The molecular architecture of the nuclear pore complex." Nature **450**(7170): 695-701.
13. Alexiadis, V., T. Waldmann, et al. (2000). "The protein encoded by the proto-oncogene DEK changes the topology of chromatin and reduces the efficiency of DNA replication in a chromatin-specific manner." Genes Dev **14**(11): 1308-1312.
14. Antonin, W., C. Franz, et al. (2005). "The integral membrane nucleoporin pom121 functionally links nuclear pore complex assembly and nuclear envelope formation." Mol Cell **17**(1): 83-92.

15. Aquino, V. M. (2002). "Acute myelogenous leukemia." Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care **32**(2): 50-58.
16. Aravind, L. and E. V. Koonin (2000). "SAP - a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization." Trends Biochem Sci **25**(3): 112-114.
17. Arber DA, B. R., Le Beau MM, Falini B, Vardiman JW, Porwit A et al. (2008). Acute myeloid leukaemia with recurrent genetic abnormalities. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. International Agency for Research on Cancer (IARC). Lyon: 110-123.
18. Argiropoulos, B. and R. K. Humphries (2007). "Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis." Oncogene **26**(47): 6766-6776.
19. Auroy, P., Y. Mir, et al. (1992). "Local structure and density profile of polymer brushes." Phys Rev Lett **69**(1): 93-95.
20. Bayliss, R., T. Littlewood, et al. (2000). "Structural basis for the interaction between FxFG nucleoporin repeats and importin-beta in nuclear trafficking." Cell **102**(1): 99-108.
21. Bayliss, R., K. Ribbeck, et al. (1999). "Interaction between NTF2 and xFxFG-containing nucleoporins is required to mediate nuclear import of RanGDP." J Mol Biol **293**(3): 579-593.
22. Beaudouin, J., D. Gerlich, et al. (2002). "Nuclear envelope breakdown proceeds by microtubule-induced tearing of the lamina." Cell **108**(1): 83-96.
23. Beck, M., F. Forster, et al. (2004). "Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography." Science **306**(5700): 1387-1390.
24. Beck, M., V. Lucic, et al. (2007). "Snapshots of nuclear pore complexes in action captured by cryo-electron tomography." Nature **449**(7162): 611-615.
25. Belgareh, N., G. Rabut, et al. (2001). "An evolutionarily conserved NPC subcomplex, which redistributes in part to kinetochores in mammalian cells." J Cell Biol **154**(6): 1147-1160.
26. Ben-Efraim, I. and L. Gerace (2001). "Gradient of increasing affinity of importin beta for nucleoporins along the pathway of nuclear import." J Cell Biol **152**(2): 411-417.
27. Benson, D. A., I. Karsch-Mizrachi, et al. (2005). "GenBank." Nucleic Acids Res **33**(Database issue): D34-38.
28. Bernad, R., D. Engelsma, et al. (2006). "Nup214-Nup88 nucleoporin subcomplex is required for CRM1-mediated 60 S preribosomal nuclear export." J Biol Chem **281**(28): 19378-19386.
29. Bertani, G. (1951). "Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*." J Bacteriol **62**(3): 293-300.

30. Bischoff, F. R., C. Klebe, et al. (1994). "RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear Ras-related Ran." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(7): 2587-2591.
31. Bischoff, F. R., H. Krebber, et al. (1995). "Co-activation of RanGTPase and inhibition of GTP dissociation by Ran-GTP binding protein RanBP1." EMBO J **14**(4): 705-715.
32. Bischoff, F. R. and H. Ponstingl (1991). "Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1." Nature **354**(6348): 80-82.
33. Black, R. J., F. Bray, et al. (1997). "CANcer incidence and mortality in the European Union: CANcer registry data and estimates of national incidence for 1990." Eur J Cancer **33**(7): 1075-1107.
34. Blobel, G. (1980). "Intracellular protein topogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(3): 1496-1500.
35. Blobel, G. (1985). "Gene gating: a hypothesis." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(24): 8527-8529.
36. Blobel, G. and R. W. Wozniak (2000). "Proteomics for the pore." Nature **403**(6772): 835-836.
37. Boer, J., J. Bonten-Surtel, et al. (1998). "Overexpression of the nucleoporin CAN/NUP214 induces growth arrest, nucleocytoplasmic transport defects, and apoptosis." Mol Cell Biol **18**(3): 1236-1247.
38. Bogerd, H. P., A. Echarri, et al. (1998). "Inhibition of human immunodeficiency virus Rev and human T-cell leukemia virus Rex function, but not Mason-Pfizer monkey virus constitutive transport element activity, by a mutant human nucleoporin targeted to Crm1." J Virol **72**(11): 8627-8635.
39. Bonner, W. M., Ed. (1978). Protein migration and accumulation in nuclei. The cell nucleus. New York, Academic.
40. Borrow, J., A. M. Shearman, et al. (1996). "The t(7;11)(p15;p15) translocation in acute myeloid leukaemia fuses the genes for nucleoporin NUP98 and class I homeoprotein HOXA9." Nat Genet **12**(2): 159-167.
41. Bouvier, D., J. Hubert, et al. (1985). "Characterization of lamina-bound chromatin in the nuclear shell isolated from HeLa cells." Exp Cell Res **156**(2): 500-512.
42. Burke, B. (1990). "On the cell-free association of lamins A and C with metaphase chromosomes." Exp Cell Res **186**(1): 169-176.
43. Burnette, W. N. (1981). ""Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." Anal Biochem **112**(2): 195-203.

44. Cai, Y., Y. Gao, et al. (2002). "Characterization and potential function of a novel testis-specific nucleoporin BS-63." Mol Reprod Dev **61**(1): 126-134.
45. Callan, H. G. and S. G. Tomlin (1950). "Experimental studies on amphibian oocyte nuclei. I. Investigation of the structure of the nuclear membrane by means of the electron microscope." Proc R Soc Lond B Biol Sci **137**(888): 367-378.
46. Campillos, M., M. A. Garcia, et al. (2003). "Transcriptional activation by AP-2alpha is modulated by the oncogene DEK." Nucleic Acids Res **31**(5): 1571-1575.
47. Carro, M. S., F. M. Spiga, et al. (2006). "DEK Expression is controlled by E2F and deregulated in diverse tumor types." Cell Cycle **5**(11): 1202-1207.
48. Chi, N. C., E. J. Adam, et al. (1997). "Different binding domains for Ran-GTP and Ran-GDP/RanBP1 on nuclear import factor p97." J Biol Chem **272**(10): 6818-6822.
49. Chi, Y., V. Lindgren, et al. (2008). "Acute myelogenous leukemia with t(6;9)(p23;q34) and marrow basophilia: an overview." Arch Pathol Lab Med **132**(11): 1835-1837.
50. Chook, Y. M. and G. Blobel (2001). "Karyopherins and nuclear import." Curr Opin Struct Biol **11**(6): 703-715.
51. Cingolani, G., C. Petosa, et al. (1999). "Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha." Nature **399**(6733): 221-229.
52. Clarke, D. J., L. P. O'Neill, et al. (1993). "Selective use of H4 acetylation sites in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Biochem J **294** (Pt 2): 557-561.
53. Comings, D. E. and T. A. Okada (1970). "Association of chromatin fibers with the annuli of the nuclear membrane." Exp Cell Res **62**(2): 293-302.
54. Conconi, A. (2005). "The yeast rDNA locus: a model system to study DNA repair in chromatin." DNA Repair (Amst) **4**(8): 897-908.
55. Conti, E. (2002). "Structures of importins." Results Probl Cell Differ **35**: 93-113.
56. Conti, E. and J. Kuriyan (2000). "Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin alpha." Structure **8**(3): 329-338.
57. Coons, A. H. (1961). "The beginnings of immunofluorescence." J Immunol **87**: 499-503.
58. Cory, S., D. C. Huang, et al. (2003). "The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis." Oncogene **22**(53): 8590-8607.
59. Crabtree, G. R. and E. N. Olson (2002). "NFAT signaling: choreographing the social lives of cells." Cell **109** Suppl: S67-79.

60. Crans, H. N. and K. M. Sakamoto (2001). "Transcription factors and translocations in lymphoid and myeloid leukemia." Leukemia **15**(3): 313-331.
61. Cronshaw, J. M., A. N. Krutchinsky, et al. (2002). "Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex." J Cell Biol **158**(5): 915-927.
62. D'Angelo, M. A., D. J. Anderson, et al. (2006). "Nuclear pores form de novo from both sides of the nuclear envelope." Science **312**(5772): 440-443.
63. D'Angelo, M. A. and M. W. Hetzer (2008). "Structure, dynamics and function of nuclear pore complexes." Trends Cell Biol **18**(10): 456-466.
64. D'Angelo, M. A., M. Raices, et al. (2009). "Age-dependent deterioration of nuclear pore complexes causes a loss of nuclear integrity in postmitotic cells." Cell **136**(2): 284-295.
65. Daigle, N., J. Beaudouin, et al. (2001). "Nuclear pore complexes form immobile networks and have a very low turnover in live mammalian cells." J Cell Biol **154**(1): 71-84.
66. De Keersmaecker, K., J. L. Rocnik, et al. (2008). "Kinase activation and transformation by NUP214-ABL1 is dependent on the context of the nuclear pore." Mol Cell **31**(1): 134-142.
67. De Keersmaecker, K., M. Versele, et al. (2008). "Intrinsic differences between the catalytic properties of the oncogenic NUP214-ABL1 and BCR-ABL1 fusion protein kinases." Leukemia **22**(12): 2208-2216.
68. Dechat, T., K. Pflieger, et al. (2008). "Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin." Genes Dev **22**(7): 832-853.
69. Deguchi, K. and D. G. Gilliland (2002). "Cooperativity between mutations in tyrosine kinases and in hematopoietic transcription factors in AML." Leukemia **16**(4): 740-744.
70. Dejean, L. M., S. Martinez-Caballero, et al. (2006). "Is MAC the knife that cuts cytochrome c from mitochondria during apoptosis?" Cell Death Differ **13**(8): 1387-1395.
71. Delphin, C., T. Guan, et al. (1997). "RanGTP targets p97 to RanBP2, a filamentous protein localized at the cytoplasmic periphery of the nuclear pore complex." Mol Biol Cell **8**(12): 2379-2390.
72. Denning, D. P., S. S. Patel, et al. (2003). "Disorder in the nuclear pore complex: the FG repeat regions of nucleoporins are natively unfolded." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2450-2455.
73. Deschler, B. and M. Lubbert (2006). "Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology." Cancer **107**(9): 2099-2107.
74. Devos, D., S. Dokudovskaya, et al. (2006). "Simple fold composition and modular architecture of the nuclear pore complex." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(7): 2172-2177.

75. Dingwall, C., S. V. Sharnick, et al. (1982). "A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus." *Cell* **30**(2): 449-458.
76. Doye, V. and E. Hurt (1997). "From nucleoporins to nuclear pore complexes." *Curr Opin Cell Biol* **9**(3): 401-411.
77. Drummond, S. P., S. A. Rutherford, et al. (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**(3-4): 423-430.
78. Dultz, E., E. Zanin, et al. (2008). "Systematic kinetic analysis of mitotic dis- and reassembly of the nuclear pore in living cells." *J Cell Biol* **180**(5): 857-865.
79. Enninga, J., D. E. Levy, et al. (2002). "Role of nucleoporin induction in releasing an mRNA nuclear export block." *Science* **295**(5559): 1523-1525.
80. Fahrenkrog, B., B. Maco, et al. (2002). "Domain-specific antibodies reveal multiple-site topology of Nup153 within the nuclear pore complex." *J Struct Biol* **140**(1-3): 254-267.
81. Fahrenkrog, B. T., M.; Ehninger, G.; Kraemer, DM (2011). Nup214/CAN localizes on both sides of the nuclear pore complex in acute myeloid leukaemia, indicating a nucleoplasmic localization of the DEK-CAN fusion protein. Basel.
82. Fairbanks, G., T. L. Steck, et al. (1971). "Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane." *Biochemistry* **10**(13): 2606-2617.
83. Fawcett, D. W. (1966). "On the occurrence of a fibrous lamina on the inner aspect of the nuclear envelope in certain cells of vertebrates." *Am J Anat* **119**(1): 129-145.
84. Feldherr, C. M., Ed. (1972). *Advances in Cell and molecular Biology*, Academic Press, New York.
85. Feldherr, C. M. and D. Akin (1991). "Signal-mediated nuclear transport in proliferating and growth-arrested BALB/c 3T3 cells." *J Cell Biol* **115**(4): 933-939.
86. Feldherr, C. M., E. Kallenbach, et al. (1984). "Movement of a karyophilic protein through the nuclear pores of oocytes." *J Cell Biol* **99**(6): 2216-2222.
87. Fernandez-Martinez, J. and M. P. Rout (2009). "Nuclear pore complex biogenesis." *Curr Opin Cell Biol* **21**(4): 603-612.
88. Ferrando-May, E., V. Cordes, et al. (2001). "Caspases mediate nucleoporin cleavage, but not early redistribution of nuclear transport factors and modulation of nuclear permeability in apoptosis." *Cell Death Differ* **8**(5): 495-505.

89. Finlay, D. R., D. D. Newmeyer, et al. (1987). "Inhibition of in vitro nuclear transport by a lectin that binds to nuclear pores." J Cell Biol **104**(2): 189-200.
90. Fischer, U., J. Huber, et al. (1995). "The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs." Cell **82**(3): 475-483.
91. Fontes, M. R., T. Teh, et al. (2000). "Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin- α ." J Mol Biol **297**(5): 1183-1194.
92. Fontoura, B. M., G. Blobel, et al. (1999). "A conserved biogenesis pathway for nucleoporins: proteolytic processing of a 186-kilodalton precursor generates Nup98 and the novel nucleoporin, Nup96." J Cell Biol **144**(6): 1097-1112.
93. Forler, D., G. Rabut, et al. (2004). "RanBP2/Nup358 provides a major binding site for NXF1-p15 dimers at the nuclear pore complex and functions in nuclear mRNA export." Mol Cell Biol **24**(3): 1155-1167.
94. Forman, D., D. Stockton, et al. (2003). "Cancer prevalence in the UK: results from the EUROPREVAL study." Ann Oncol **14**(4): 648-654.
95. Fornerod, M., J. van Deursen, et al. (1997). "The human homologue of yeast CRM1 is in a dynamic subcomplex with CAN/Nup214 and a novel nuclear pore component Nup88." EMBO J **16**(4): 807-816.
96. Franke, W. W. (1974). "Structure, biochemistry, and functions of the nuclear envelope." Int Rev Cytol Suppl **4**: 71-236.
97. Franke, W. W. and U. Scheer (1970). "The ultrastructure of the nuclear envelope of amphibian oocytes: a reinvestigation. II. The immature oocyte and dynamic aspects." J Ultrastruct Res **30**(3): 317-327.
98. Frey, S. and D. Gorlich (2007). "A saturated FG-repeat hydrogel CAN reproduce the permeability properties of nuclear pore complexes." Cell **130**(3): 512-523.
99. Frey, S., R. P. Richter, et al. (2006). "FG-rich repeats of nuclear pore proteins form a three-dimensional meshwork with hydrogel-like properties." Science **314**(5800): 815-817.
100. Fried, H. and U. Kutay (2003). "Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory." Cell Mol Life Sci **60**(8): 1659-1688.
101. Funasaka, T. and R. W. Wong (2011). "The role of nuclear pore complex in tumor microenvironment and metastasis." CANcer Metastasis Rev.
102. Gall (1967). "Octagonal nuclear pores." J Cell Biol. **32**(2): 391-399.
103. Galy, V., W. Antonin, et al. (2008). "A role for gp210 in mitotic nuclear-envelope breakdown." J Cell Sci **121**(Pt 3): 317-328.
104. Gambacorti-Passerini, C. (2008). "Part I: Milestones in personalised medicine--imatinib." Lancet Oncol **9**(6): 600.

105. Gamble, M. J., H. Erdjument-Bromage, et al. (2005). "The histone chaperone TAF-I/SET/INHAT is required for transcription in vitro of chromatin templates." Mol Cell Biol **25**(2): 797-807.
106. Gerace, L. and B. Burke (1988). "Functional organization of the nuclear envelope." Annu Rev Cell Biol **4**: 335-374.
107. Gigliotti, S., G. Callaini, et al. (1998). "Nup154, a new Drosophila gene essential for male and female gametogenesis is related to the nup155 vertebrate nucleoporin gene." J Cell Biol **142**(5): 1195-1207.
108. Gilchrist, D., B. Mykytka, et al. (2002). "Accelerating the rate of disassembly of karyopherin.cargo complexes." J Biol Chem **277**(20): 18161-18172.
109. Gillespie, P. J., G. A. Khoudoli, et al. (2007). "ELYS/MEL-28 chromatin association coordinates nuclear pore complex assembly and replication licensing." Curr Biol **17**(19): 1657-1662.
110. Glavy, J. S., A. N. Krutchinsky, et al. (2007). "Cell-cycle-dependent phosphorylation of the nuclear pore Nup107-160 subcomplex." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(10): 3811-3816.
111. Gojo, I. and J. E. Karp (2001). "The impact of biology on the treatment of secondary AML." CANcer Treat Res **108**: 231-255.
112. Goldberg, M. W., C. Wiese, et al. (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.
113. Goldstein, L., Ed. (1974). Movement of molecules between nucleus and cytoplasm. The Cell Nucleus. New York, Academic.
114. Gorlich, D., P. Henklein, et al. (1996). "A 41 amino acid motif in importin-alpha confers binding to importin-beta and hence transit into the nucleus." EMBO J **15**(8): 1810-1817.
115. Gorlich, D. and U. Kutay (1999). "Transport between the cell nucleus and the cytoplasm." Annu Rev Cell Dev Biol **15**: 607-660.
116. Gorlich, D., S. Prehn, et al. (1994). "Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import." Cell **79**(5): 767-778.
117. Graux, C., J. Cools, et al. (2004). "Fusion of NUP214 to ABL1 on amplified episomes in T-cell acute lymphoblastic leukemia." Nat Genet **36**(10): 1084-1089.
118. Griffis, E. R., N. Altan, et al. (2002). "Nup98 is a mobile nucleoporin with transcription-dependent dynamics." Mol Biol Cell **13**(4): 1282-1297.
119. Gruenbaum, Y., A. Margalit, et al. (2005). "The nuclear lamina comes of age." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(1): 21-31.
120. Gurdon, J. B. (1970). "Nuclear transplantation and the control of gene activity in animal development." Proc R Soc Lond B Biol Sci **176**(44): 303-314.

121. Gurskaya, N. G., V. V. Verkhusha, et al. (2006). "Engineering of a monomeric green-to-red photoactivatable fluorescent protein induced by blue light." Nat Biotechnol **24**(4): 461-465.
122. Harborth, J., S. M. Elbashir, et al. (2001). "Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs." J Cell Sci **114**(Pt 24): 4557-4565.
123. Harel, A., R. C. Chan, et al. (2003). "Importin beta negatively regulates nuclear membrane fusion and nuclear pore complex assembly." Mol Biol Cell **14**(11): 4387-4396.
124. Hawryluk-Gara, L. A., M. Platani, et al. (2008). "Nup53 is required for nuclear envelope and nuclear pore complex assembly." Mol Biol Cell **19**(4): 1753-1762.
125. Heim, S. and F. Mitelman (1992). "Cytogenetic analysis in the diagnosis of acute leukemia." Cancer **70**(6 Suppl): 1701-1709.
126. Hodel, A. E., M. T. Harreman, et al. (2006). "Nuclear localization signal receptor affinity correlates with in vivo localization in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **281**(33): 23545-23556.
127. Hodel, M. R., A. H. Corbett, et al. (2001). "Dissection of a nuclear localization signal." J Biol Chem **276**(2): 1317-1325.
128. Hutten, S. and R. H. Kehlenbach (2006). "Nup214 is required for CRM1-dependent nuclear protein export in vivo." Mol Cell Biol **26**(18): 6772-6785.
129. Johnson, A. W., E. Lund, et al. (2002). "Nuclear export of ribosomal subunits." Trends Biochem Sci **27**(11): 580-585.
130. Kalab, P., K. Weis, et al. (2002). "Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic *Xenopus* egg extracts." Science **295**(5564): 2452-2456.
131. Kalderon, D., W. D. Richardson, et al. (1984). "Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen." Nature **311**(5981): 33-38.
132. Kalderon, D., B. L. Roberts, et al. (1984). "A short amino acid sequence able to specify nuclear location." Cell **39**(3 Pt 2): 499-509.
133. Kappes, F., K. Burger, et al. (2001). "Subcellular localization of the human proto-oncogene protein DEK." J Biol Chem **276**(28): 26317-26323.
134. Kappes, F., J. Fahrner, et al. (2008). "DEK is a poly(ADP-ribose) acceptor in apoptosis and mediates resistance to genotoxic stress." Mol Cell Biol **28**(10): 3245-3257.
135. Kastrup, L., H. Oberleithner, et al. (2006). "Nuclear envelope barrier leak induced by dexamethasone." J Cell Physiol **206**(2): 428-434.

136. Kerr, J. R., F. Barah, et al. (2003). "Association of acute parvovirus B19 infection with new onset of acute lymphoblastic and myeloblastic leukaemia." J Clin Pathol **56**(11): 873-875.
137. Kim, D. W., J. I. Chae, et al. (2009). "Proteomic analysis of apoptosis related proteins regulated by proto-oncogene protein DEK." J Cell Biochem **106**(6): 1048-1059.
138. Kiseleva, E., T. D. Allen, et al. (2004). "Yeast nuclear pore complexes have a cytoplasmic ring and internal filaments." J Struct Biol **145**(3): 272-288.
139. Kiseleva, E., S. Rutherford, et al. (2001). "Steps of nuclear pore complex disassembly and reassembly during mitosis in early Drosophila embryos." J Cell Sci **114**(Pt 20): 3607-3618.
140. Kobe, B. (1999). "Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha." Nat Struct Biol **6**(4): 388-397.
141. Kohler, M., S. Ansieau, et al. (1997). "Cloning of two novel human importin-alpha subunits and analysis of the expression pattern of the importin-alpha protein family." FEBS Lett **417**(1): 104-108.
142. Kohler, M., C. Speck, et al. (1999). "Evidence for distinct substrate specificities of importin alpha family members in nuclear protein import." Mol Cell Biol **19**(11): 7782-7791.
143. Komeili, A. and E. K. O'Shea (1999). "Roles of phosphorylation sites in regulating activity of the transcription factor Pho4." Science **284**(5416): 977-980.
144. Kraemer, D., R. W. Wozniak, et al. (1994). "The human CAN protein, a putative oncogene product associated with myeloid leukemogenesis, is a nuclear pore complex protein that faces the cytoplasm." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(4): 1519-1523.
145. Kraemer, D. Thiede., Ch., Filser, J. Fahrenkrog, B. (2005). NUP214/CAN Localizes on Both Sides of the Nuclear Pore Complex in Acute Myeloid Leukaemia, Indicating a Nucleoplasmic Localization of the DEK-CAN Fusion Protein., Blood
146. Krull, I., M. W. M, et al. (2010). "Two patients with an identical novel mutation in the AAAS gene and similar phenotype of triple A (Allgrove) syndrome." Exp Clin Endocrinol Diabetes **118**(8): 530-536.
147. Krull, S., J. Thyberg, et al. (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**(9): 4261-4277.
148. Kubitscheck, U., D. Grunwald, et al. (2005). "Nuclear transport of single molecules: dwell times at the nuclear pore complex." J Cell Biol **168**(2): 233-243.
149. Kutay, U. and M. W. Hetzer (2008). "Reorganization of the nuclear envelope during open mitosis." Curr Opin Cell Biol **20**(6): 669-677.

150. la Cour, T., R. Gupta, et al. (2003). "NESbase version 1.0: a database of nuclear export signals." Nucleic Acids Res **31**(1): 393-396.
151. Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
152. Lange, A., R. E. Mills, et al. (2008). "A PY-NLS nuclear targeting signal is required for nuclear localization and function of the *Saccharomyces cerevisiae* mRNA-binding protein Hrp1." J Biol Chem **283**(19): 12926-12934.
153. Lange, A., R. E. Mills, et al. (2007). "Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha." J Biol Chem **282**(8): 5101-5105.
154. Lee, B. J., A. E. CANSizoglu, et al. (2006). "Rules for nuclear localization sequence recognition by karyopherin beta 2." Cell **126**(3): 543-558.
155. Lee, K. S., D. W. Kim, et al. (2008). "Caspase-dependent apoptosis induction by targeted expression of DEK in *Drosophila* involves histone acetylation inhibition." J Cell Biochem **103**(4): 1283-1293.
156. Lee, S. J., Y. Matsuura, et al. (2005). "Structural basis for nuclear import complex dissociation by RanGTP." Nature **435**(7042): 693-696.
157. Lei, E. P. and P. A. Silver (2002). "Protein and RNA export from the nucleus." Dev Cell **2**(3): 261-272.
158. Lim, R. Y., U. Aebi, et al. (2008). "Towards reconciling structure and function in the nuclear pore complex." Histochem Cell Biol **129**(2): 105-116.
159. Lim, R. Y. and B. Fahrenkrog (2006). "The nuclear pore complex up close." Curr Opin Cell Biol **18**(3): 342-347.
160. Lim, R. Y., B. Fahrenkrog, et al. (2007). "Nanomechanical basis of selective gating by the nuclear pore complex." Science **318**(5850): 640-643.
161. Lim, R. Y., N. P. Huang, et al. (2006). "Flexible phenylalanine-glycine nucleoporins as entropic barriers to nucleocytoplasmic transport." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(25): 9512-9517.
162. Lindsay, M. E., J. M. Holaska, et al. (2001). "Ran-binding protein 3 is a cofactor for Crm1-mediated nuclear protein export." J Cell Biol **153**(7): 1391-1402.
163. Look, A. T. (1997). "Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias." Science **278**(5340): 1059-1064.
164. Lounsbury, K. M. and I. G. Macara (1997). "Ran-binding protein 1 (RanBP1) forms a ternary complex with Ran and karyopherin beta and reduces Ran GTPase-activating protein (RanGAP) inhibition by karyopherin beta." J Biol Chem **272**(1): 551-555.
165. Lusk, C. P., G. Blobel, et al. (2007). "Highway to the inner nuclear membrane: rules for the road." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(5): 414-420.

166. Macara, I. G. (2001). "Transport into and out of the nucleus." Microbiol Mol Biol Rev **65**(4): 570-594, table of contents.
167. Macaulay, C. and D. J. Forbes (1996). "Assembly of the nuclear pore: biochemically distinct steps revealed with NEM, GTP gamma S, and BAPTA." J Cell Biol **132**(1-2): 5-20.
168. Maeshima, K., K. Yahata, et al. (2006). "Cell-cycle-dependent dynamics of nuclear pores: pore-free islands and lamins." J Cell Sci **119**(Pt 21): 4442-4451.
169. Makio, T., L. H. Stanton, et al. (2009). "The nucleoporins Nup170p and Nup157p are essential for nuclear pore complex assembly." J Cell Biol **185**(3): 459-473.
170. Martens, J. H. and H. G. Stunnenberg "The molecular signature of oncofusion proteins in acute myeloid leukemia." FEBS Lett **584**(12): 2662-2669.
171. Matsuura, Y. and M. Stewart (2004). "Structural basis for the assembly of a nuclear export complex." Nature **432**(7019): 872-877.
172. Matsuura, Y. and M. Stewart (2005). "Nup50/Npap60 function in nuclear protein import complex disassembly and importin recycling." EMBO J **24**(21): 3681-3689.
173. Maul, G. G., H. M. Maul, et al. (1972). "Time sequence of nuclear pore formation in phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes and in HeLa cells during the cell cycle." J Cell Biol **55**(2): 433-447.
174. Maul, G. G., J. W. Price, et al. (1971). "Formation and distribution of nuclear pore complexes in interphase." J Cell Biol **51**(21): 405-418.
175. McKeon, F. D., M. W. Kirschner, et al. (1986). "Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins." Nature **319**(6053): 463-468.
176. McLane, L. M. and A. H. Corbett (2009). "Nuclear localization signals and human disease." IUBMB Life **61**(7): 697-706.
177. Meier, I. (2001). "The plant nuclear envelope." Cell Mol Life Sci **58**(12-13): 1774-1780.
178. Miyauchi, Y., N. Sakaguchi, et al. (2009). "Oncogenic nucleoporin CAN/Nup214 interacts with vitamin D receptor and modulates its function." J Cell Biochem **106**(6): 1090-1101.
179. Moore, M. S. (1998). "Ran and nuclear transport." J Biol Chem **273**(36): 22857-22860.
180. Moore, M. S. and G. Blobel (1992). "The two steps of nuclear import, targeting to the nuclear envelope and translocation through the nuclear pore, require different cytosolic factors." Cell **69**(6): 939-950.
181. Moore, M. S. and G. Blobel (1993). "The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus." Nature **365**(6447): 661-663.

182. Moore, M. S. and G. Blobel (1994). "Purification of a Ran-interacting protein that is required for protein import into the nucleus." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(21): 10212-10216.
183. Mosammamarast, N. and L. F. Pemberton (2004). "Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators." Trends Cell Biol **14**(10): 547-556.
184. Nachury, M. V. and K. Weis (1999). "The direction of transport through the nuclear pore CAN be inverted." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(17): 9622-9627.
185. Napetschnig, J., G. Blobel, et al. (2007). "Crystal structure of the N-terminal domain of the human protooncogene Nup214/CAN." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(6): 1783-1788.
186. Newmeyer, D. D., J. M. Lucocq, et al. (1986). "Assembly in vitro of nuclei active in nuclear protein transport: ATP is required for nucleoplasmin accumulation." EMBO J **5**(3): 501-510.
187. O'Donnell, M. R., C. N. Abboud, et al. (2011). "Acute myeloid leukemia." J Natl Compr Canc Netw **9**(3): 280-317.
188. Oki, M. and T. Nishimoto (2000). "Yrb1p interaction with the gsp1p C terminus blocks Mog1p stimulation of GTP release from Gsp1p." J Biol Chem **275**(42): 32894-32900.
189. Onischenko, E., L. H. Stanton, et al. (2009). "Role of the Ndc1 interaction network in yeast nuclear pore complex assembly and maintenance." J Cell Biol **185**(3): 475-491.
190. Ossareh-Nazari, B., C. Gwizdek, et al. (2001). "Protein export from the nucleus." Traffic **2**(10): 684-689.
191. Paine, P. L. (1975). "Nucleocytoplasmic movement of fluorescent tracers microinjected into living salivary gland cells." J Cell Biol **66**(3): 652-657.
192. Pan, Q., Y. J. Zhu, et al. (2008). "A new fusion gene NUP98-IQCG identified in an acute T-lymphoid/myeloid leukemia with a t(3;11)(q29q13;p15)del(3)(q29) translocation." Oncogene **27**(24): 3414-3423.
193. Pante, N. and M. Kann (2002). "Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm." Mol Biol Cell **13**(2): 425-434.
194. Parcels, B. W., A. K. Ikeda, et al. (2006). "FMS-like tyrosine kinase 3 in normal hematopoiesis and acute myeloid leukemia." Stem Cells **24**(5): 1174-1184.
195. Padeloup, D., D. Blondel, et al. (2009). "Herpesvirus capsid association with the nuclear pore complex and viral DNA release involve the nucleoporin CAN/Nup214 and the capsid protein pUL25." J Virol **83**(13): 6610-6623.

196. Patel, S. S., B. J. Belmont, et al. (2007). "Natively unfolded nucleoporins gate protein diffusion across the nuclear pore complex." Cell **129**(1): 83-96.
197. Paulillo, S. M., E. M. Phillips, et al. (2005). "Nucleoporin domain topology is linked to the transport status of the nuclear pore complex." J Mol Biol **351**(4): 784-798.
198. Pedersen-Bjergaard, J., P. Philip, et al. (1993). "Therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. Cytogenetic characteristics of 115 consecutive cases and risk in seven cohorts of patients treated intensively for malignant diseases in the Copenhagen series." Leukemia **7**(12): 1975-1986.
199. Pemberton, L. F. and B. M. Paschal (2005). "Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export." Traffic **6**(3): 187-198.
200. Peters, R. (2005). "Translocation through the nuclear pore complex: selectivity and speed by reduction-of-dimensionality." Traffic **6**(5): 421-427.
201. Pettersen, E. F., T. D. Goddard, et al. (2004). "UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis." J Comput Chem **25**(13): 1605-1612.
202. Porath, J., J. Carlsson, et al. (1975). "Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation." Nature **258**(5536): 598-599.
203. Pyhtila, B. and M. Rexach (2003). "A gradient of affinity for the karyopherin Kap95p along the yeast nuclear pore complex." J Biol Chem **278**(43): 42699-42709.
204. Quere, R., G. Karlsson, et al. (2011). "Smad4 binds Hoxa9 in the cytoplasm and protects primitive hematopoietic cells against nuclear activation by Hoxa9 and leukemia transformation." Blood **117**(22): 5918-5930.
205. Rabbitts, T. H. (1994). "Chromosomal translocations in human Cancer." Nature **372**(6502): 143-149.
206. Rabut, G., V. Doye, et al. (2004). "Mapping the dynamic organization of the nuclear pore complex inside single living cells." Nat Cell Biol **6**(11): 1114-1121.
207. Radu, A., G. Blobel, et al. (1995). "Identification of a protein complex that is required for nuclear protein import and mediates docking of import substrate to distinct nucleoporins." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(5): 1769-1773.
208. Ribbeck, K. and D. Gorlich (2001). "Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes." EMBO J **20**(6): 1320-1330.
209. Ribbeck, K. and D. Gorlich (2002). "The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion." EMBO J **21**(11): 2664-2671.

210. Riddick, G. and I. G. Macara (2005). "A systems analysis of importin- α - β mediated nuclear protein import." *J Cell Biol* **168**(7): 1027-1038.
211. Rodenas, E., E. P. Klerkx, et al. (2009). "Early embryonic requirement for nucleoporin Nup35/NPP-19 in nuclear assembly." *Dev Biol* **327**(2): 399-409.
212. Rosati, R., R. La Starza, et al. (2007). "Cryptic chromosome 9q34 deletion generates TAF- α /CAN and TAF- β /CAN fusion transcripts in acute myeloid leukemia." *Haematologica* **92**(2): 232-235.
213. Rossi, G., A. M. Pelizzari, et al. (2000). "Cytogenetic analogy between myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia of elderly patients." *Leukemia* **14**(4): 636-641.
214. Rout M.P., W. S. R. (1994). "Pores for thought: nuclear pore complex proteins." *Trends Cell Biol* **4**: 357-365.
215. Rout, M. P., J. D. Aitchison, et al. (2003). "Virtual gating and nuclear transport: the hole picture." *Trends Cell Biol* **13**(12): 622-628.
216. Rout, M. P., J. D. Aitchison, et al. (2000). "The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism." *J Cell Biol* **148**(4): 635-651.
217. Rout MP, A. J. (2001). "The nuclear pore complex as a transport machine." *J Biol Chem*. **276**(20): 16593-16596.
218. Roux, K. J. and B. Burke (2007). "Nuclear envelope defects in muscular dystrophy." *Biochim Biophys Acta* **1772**(2): 118-127.
219. Ryan, K. J., Y. Zhou, et al. (2007). "The karyopherin Kap95 regulates nuclear pore complex assembly into intact nuclear envelopes in vivo." *Mol Biol Cell* **18**(3): 886-898.
220. Saito, S., M. Miyaji-Yamaguchi, et al. (2004). "Aberrant intracellular localization of SET-CAN fusion protein, associated with a leukemia, disorganizes nuclear export." *Int J Cancer* **111**(4): 501-507.
221. Salinovich, O. and R. C. Montelaro (1986). "Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis." *Anal Biochem* **156**(2): 341-347.
222. Sammons, M., S. S. Wan, et al. (2006). "Negative regulation of the RelA/p65 transactivation function by the product of the DEK proto-oncogene." *J Biol Chem* **281**(37): 26802-26812.
223. Satterly, N., P. L. Tsai, et al. (2007). "Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(6): 1853-1858.
224. Savli, H., Y. Aalto, et al. (2002). "Gene expression analysis of 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -dependent differentiation of HL-60 cells: a cDNA array study." *Br J Haematol* **118**(4): 1065-1070.

225. Scherer, W. F., J. T. Syverton, et al. (1953). "Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix." J Exp Med **97**(5): 695-710.
226. Schirmer, E. C., L. Florens, et al. (2003). "Nuclear membrane proteins with potential disease links found by subtractive proteomics." Science **301**(5638): 1380-1382.
227. Shahin, V., L. Albermann, et al. (2005). "Steroids dilate nuclear pores imaged with atomic force microscopy." J Cell Physiol **202**(2): 591-601.
228. Sheehan, M. A., A. D. Mills, et al. (1988). "Steps in the assembly of replication-competent nuclei in a cell-free system from *Xenopus* eggs." J Cell Biol **106**(1): 1-12.
229. Shulga, N. and D. S. Goldfarb (2003). "Binding dynamics of structural nucleoporins govern nuclear pore complex permeability and may mediate channel gating." Mol Cell Biol **23**(2): 534-542.
230. Siniosoglou, S., M. Lutzmann, et al. (2000). "Structure and assembly of the Nup84p complex." J Cell Biol **149**(1): 41-54.
231. Soares, L. M., K. Zanier, et al. (2006). "Intron removal requires proofreading of U2AF/3' splice site recognition by DEK." Science **312**(5782): 1961-1965.
232. Sorokin, A. V., E. R. Kim, et al. (2007). "Nucleocytoplasmic transport of proteins." Biochemistry (Mosc) **72**(13): 1439-1457.
233. Stade, K., C. S. Ford, et al. (1997). "Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor." Cell **90**(6): 1041-1050.
234. Stewart, M. (2007). "Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(3): 195-208.
235. Stierle, V., J. Couprie, et al. (2003). "The carboxyl-terminal region common to lamins A and C contains a DNA binding domain." Biochemistry **42**(17): 4819-4828.
236. Stoffler, D., B. Feja, et al. (2003). "Cryo-electron tomography provides novel insights into nuclear pore architecture: implications for nucleocytoplasmic transport." J Mol Biol **328**(1): 119-130.
237. Strahl, B. D. and C. D. Allis (2000). "The language of covalent histone modifications." Nature **403**(6765): 41-45.
238. Strawn, L. A., T. Shen, et al. (2004). "Minimal nuclear pore complexes define FG repeat domains essential for transport." Nat Cell Biol **6**(3): 197-206.
239. Strelkov, S. V., H. Herrmann, et al. (2002). "Conserved segments 1A and 2B of the intermediate filament dimer: their atomic structures and role in filament assembly." EMBO J **21**(6): 1255-1266.
240. Stuurman, N., S. Heins, et al. (1998). "Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions." J Struct Biol **122**(1-2): 42-66.

241. Su, A. I., T. Wiltshire, et al. (2004). "A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(16): 6062-6067.
242. Such, E., J. Cervera, et al. (2011). "A novel NUP98/RARG gene fusion in acute myeloid leukemia resembling acute promyelocytic leukemia." Blood **117**(1): 242-245.
243. Suel, K. E., H. Gu, et al. (2008). "Modular organization and combinatorial energetics of proline-tyrosine nuclear localization signals." PLoS Biol **6**(6): e137.
244. Suntharalingam, M. and S. R. Wentz (2003). "Peering through the pore: nuclear pore complex structure, assembly, and function." Dev Cell **4**(6): 775-789.
245. Takata, H., S. Uchiyama, et al. (2007). "A comparative proteome analysis of human metaphase chromosomes isolated from two different cell lines reveals a set of conserved chromosome-associated proteins." Genes Cells **12**(3): 269-284.
246. Takeda, A., C. Goolsby, et al. (2006). "NUP98-HOXA9 induces long-term proliferation and blocks differentiation of primary human CD34+ hematopoietic cells." Cancer Res **66**(13): 6628-6637.
247. Takeda, A., N. J. Sarma, et al. (2010). "Inhibition of CRM1-mediated nuclear export of transcription factors by leukemogenic NUP98 fusion proteins." J Biol Chem **285**(21): 16248-16257.
248. Terry, L. J., E. B. Shows, et al. (2007). "Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport." Science **318**(5855): 1412-1416.
249. Thiede, C., C. Steudel, et al. (2002). "Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis." Blood **99**(12): 4326-4335.
250. Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4354.
251. Tran, E. J. and S. R. Wentz (2006). "Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge." Cell **125**(6): 1041-1053.
252. van Deursen, J., J. Boer, et al. (1996). "G2 arrest and impaired nucleocytoplasmic transport in mouse embryos lacking the proto-oncogene CAN/Nup214." EMBO J **15**(20): 5574-5583.
253. Van Vlierberghe, P., M. van Grotel, et al. (2008). "The recurrent SET-NUP214 fusion as a new HOXA activation mechanism in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia." Blood **111**(9): 4668-4680.
254. Vasu, S. K. and D. J. Forbes (2001). "Nuclear pores and nuclear assembly." Curr Opin Cell Biol **13**(3): 363-375.

255. von Lindern, M., D. Breems, et al. (1992). "Characterization of the translocation breakpoint sequences of two DEK-CAN fusion genes present in t(6;9) acute myeloid leukemia and a SET-CAN fusion gene found in a case of acute undifferentiated leukemia." Genes Chromosomes Cancer **5**(3): 227-234.
256. von Lindern, M., M. Fornerod, et al. (1992). "The translocation (6;9), associated with a specific subtype of acute myeloid leukemia, results in the fusion of two genes, dek and can, and the expression of a chimeric, leukemia-specific dek-can mRNA." Mol Cell Biol **12**(4): 1687-1697.
257. von Lindern, M., A. Poustka, et al. (1990). "The (6;9) chromosome translocation, associated with a specific subtype of acute nonlymphocytic leukemia, leads to aberrant transcription of a target gene on 9q34." Mol Cell Biol **10**(8): 4016-4026.
258. von Lindern, M., S. van Baal, et al. (1992). "CAN, a putative oncogene associated with myeloid leukemogenesis, may be activated by fusion of its 3' half to different genes: characterization of the set gene." Mol Cell Biol **12**(8): 3346-3355.
259. Waldmann, T., I. Scholten, et al. (2004). "The DEK protein--an abundant and ubiquitous constituent of mammalian chromatin." Gene **343**(1): 1-9.
260. Walther, T. C., P. Askjaer, et al. (2003). "RanGTP mediates nuclear pore complex assembly." Nature **424**(6949): 689-694.
261. Walther, T. C., M. Fornerod, et al. (2001). "The nucleoporin Nup153 is required for nuclear pore basket formation, nuclear pore complex anchoring and import of a subset of nuclear proteins." EMBO J **20**(20): 5703-5714.
262. Walther, T. C., H. S. Pickersgill, et al. (2002). "The cytoplasmic filaments of the nuclear pore complex are dispensable for selective nuclear protein import." J Cell Biol **158**(1): 63-77.
263. Wang, R. and M. G. Brattain (2007). "The maximal size of protein to diffuse through the nuclear pore is larger than 60kDa." FEBS Lett **581**(17): 3164-3170.
264. Weirich, C. S., J. P. Erzberger, et al. (2004). "The N-terminal domain of Nup159 forms a beta-propeller that functions in mRNA export by tethering the helicase Dbp5 to the nuclear pore." Mol Cell **16**(5): 749-760.
265. Weis, K. (2007). "The nuclear pore complex: oily spaghetti or gummy bear?" Cell **130**(3): 405-407.
266. Wenthe, S. R. (2000). "Gatekeepers of the nucleus." Science **288**(5470): 1374-1377.
267. Winey, M., D. Yarar, et al. (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**(11): 2119-2132.

268. Wingo, P. A., C. J. Cardinez, et al. (2003). "Long-term trends in Cancer mortality in the United States, 1930-1998." Cancer **97**(12 Suppl): 3133-3275.
269. Wise-Draper, T. M., H. V. Allen, et al. (2006). "Apoptosis inhibition by the human DEK oncoprotein involves interference with p53 functions." Mol Cell Biol **26**(20): 7506-7519.
270. Wozniak, R. W., M. P. Rout, et al. (1998). "Karyopherins and kissing cousins." Trends Cell Biol **8**(5): 184-188.
271. Wu, J., M. J. Matunis, et al. (1995). "Nup358, a cytoplasmically exposed nucleoporin with peptide repeats, Ran-GTP binding sites, zinc fingers, a cyclophilin A homologous domain, and a leucine-rich region." J Biol Chem **270**(23): 14209-14213.
272. Yang, W., J. Gelles, et al. (2004). "Imaging of single-molecule translocation through nuclear pore complexes." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(35): 12887-12892.
273. Yasuhara, N., M. Oka, et al. (2009). "The role of the nuclear transport system in cell differentiation." Semin Cell Dev Biol **20**(5): 590-599.
274. Yi, R., Y. Qin, et al. (2003). "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs." Genes Dev **17**(24): 3011-3016.
275. Zilman, A. (2009). "Effects of multiple occupancy and interparticle interactions on selective transport through narrow channels: theory versus experiment." Biophys J **96**(4): 1235-1248.
276. Zuccolo, M., A. Alves, et al. (2007). "The human Nup107-160 nuclear pore subcomplex contributes to proper kinetochore functions." EMBO J **26**(7): 1853-1864.

Danksagung

Bei Prof. Dr. med. Doris M. Krämer möchte ich mich für die Überlassung des interessanten Themas und die geduldige Unterstützung während der Arbeit herzlich bedanken.

Mein Dank gilt auch dem Team des immunologischen Labors (AG Prof. Tony) der Medizinischen Klinik II für die gute Einführung in die experimentellen Methoden und die freundliche Betreuung im Labor.

Ein ganz besonderer Dank geht an Aurelia und meine Familie, die mich unglaublich lieb während der letzten Jahre unterstützt haben.