

# INAUGURAL – DISSERTATION

Zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich - Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht – Karls – Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Diplom-Chemiker Jochen Baßler  
aus Mannheim

Tag der mündlichen Prüfung \_\_\_\_\_

Thema:

**Isolierung eines nukleären  
60S Prä-Ribosoms, das ein Exportintermediat  
ins Zytoplasma darstellt**

Gutachter: Prof. Dr. Ed Hurt  
Prof. Dr. Bernhard Dobberstein

*Für Christine*

*& Jonas*

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich meiner Frau Christine danken für die Unterstützung meiner Arbeit in jeglicher Form.

Meinen Eltern danke ich, daß Sie mir das Chemiestudium ermöglicht haben.

Bei Ed Hurt bedanke ich mich für das faszinierende Thema, die hervorragende Betreuung und dafür, daß ich bei ihm immer ein offenes Ohr gefunden habe.

Meinen Kollegen möchte ich danken für den kameradschaftlichen Umgang und das angenehme Arbeitsklima, besonders Olivier Gadal und Daniela Strauß für viele hilfreiche Diskussionen und Vorschläge zu meiner Arbeit.

Ferner möchte ich mich auch bedanken bei Paola Grandi (Cellzome GmbH; Heidelberg) für die Unterstützung bei der Etablierung der "TAP-Methode", David Tollervey und Elisabeth Petfalski (Institute of Cell and Molecular Biology; University of Edinburgh; Großbritannien) für die rRNA-Analysen der *nug1* und *nug2* Mutanten, sowie des Nug1p-Komplexes, Johannes Lechner (Biochemiezentrum Heidelberg) für die Identifikation der Proteinkomponenten des Nug1p-Komplexes und Torben Leßmann für seine Unterstützung während seines Forschungspraktikums, sowie allen Ungenannten, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	Seite 3
<b>1. Einleitung</b>	Seite 4
1.1 Der Kernporenkomplex	Seite 4
1.2 Die Proteinfamilie der Karyopherine	Seite 7
1.3 Der Ran-Zyklus und die Regulierung des nukleozytoplasmatischen Transports	Seite 9
1.4 Export von tRNA	Seite 12
1.5 Export von mRNA	Seite 12
1.5.1 Nukleoporene und ihre Rolle im mRNA-Export	Seite 14
1.5.2 Die Funktion von hnRNP-Proteinen und mRNA-modifizierenden Proteinen im mRNA-Export	Seite 15
1.5.3 Die Bedeutung des Ran-Zyklus und der Karyopherine für den mRNA-Export	Seite 17
1.5.4 Der Mex67p-Mtr2p-Komplex spielt eine zentrale Rolle im Export von mRNA in <i>S. cerevisiae</i>	Seite 19
1.5.5 Der Mex67p-Mtr2p vermittelte mRNA-Export ist an den Spleißprozess gekoppelt	Seite 23
1.5.6 Modell des mRNA-Exportes in <i>S. cerevisiae</i>	Seite 25
1.6 Export von Ribosomen	Seite 26
<b>2. Aufgabenstellung</b>	Seite 30
<b>3. Ergebnisse</b>	Seite 31
3.1 Mtr2p und Ecm1p sind am Export von 60S Prä-Ribosomen beteiligt	Seite 31
3.1.1 <i>mtr2-33</i> , eine ungewöhnliche <i>mtr2</i> Mutante	Seite 31
3.1.2 Die <i>mtr2-33</i> Mutante zeigt spezifische Defekte im ribosomalen Export des 60S Partikels	Seite 37
3.2 Nug1p und Nug2p sind essentiell für den ribosomalen Export	Seite 41
3.2.1 <i>ECM1</i> interagiert genetisch mit <i>RPL2a</i> und <i>NUG1</i>	Seite 41
3.2.2 Die <i>nug1-1 ecm1Δ</i> Mutante zeigt einen ribosomalen Exportdefekt	Seite 43
3.2.3 Nug1p ist evolutionär konserviert in eukaryontischen Zellen	Seite 45

Inhaltsverzeichnis	Seite 2
3.2.4 <i>nug1 / nug2</i> Mutanten zeigen Defekte im Export der 60S Untereinheit	Seite 47
3.2.5 Nug1p und Nug2p assoziieren mit 60S präribosomalen Partikeln	Seite 50
3.3 Reinigung und Charakterisierung eines 60S prä-ribosomalen Partikels	Seite 53
<b>4. Diskussion und Ausblick</b>	Seite 58
4.1 Repräsentiert der Nug1p-Komplex ein ribosomales Exportintermediat?	Seite 58
4.2 Welche Bedeutung haben GTPasen, insbesondere Nug1p für den ribosomalen Export?	Seite 61
4.3 Welche Rolle spielen Mtr2p und Ecm1p im ribosomalen Export?	Seite 62
<b>5. Material und Methoden</b>	Seite 64
5.1 Molekularbiologische Methoden	Seite 64
5.1.1 Allgemeine Methoden zur DNA Manipulierung	Seite 64
5.1.2 Verwendete Plasmide	Seite 64
5.1.3 Herstellung der <i>mtr2-33</i> , <i>nug1-2</i> , <i>nug1-2</i> und <i>nug2-1</i> Mutanten	Seite 67
5.2 Mikrobiologische Methoden für <i>S. cerevisiae</i>	Seite 68
5.2.1 Allgemeine Arbeitsmethoden	Seite 68
5.2.2 Verwendete Hefestämme	Seite 69
5.2.3 Bestimmung der genetischen Interaktion zweier Gene	Seite 71
5.2.4 Lokalisierung von Proteinen in der Zelle	Seite 73
5.2.5 Analyse von RNA Exportdefekten in Hefemutanten	Seite 73
5.3 Biochemische Methoden	Seite 73
5.3.1 Aufreinigung von TAP-Fusionsproteinen	Seite 74
5.3.2 RNA Profilanalyse / Sedimentationsanalyse mittels Saccharosedichtegradienten	Seite 75
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	Seite 76
6.1 Eigene Publikationen	Seite 76
6.2 Allgemeine Literatur	Seite 76
6.3 Datenbanken und Programme	Seite 93
<b>7. Abkürzungen</b>	Seite 94

## Zusammenfassung

Im Gegensatz zu anderen nukleozytoplasmatischen Transportprozessen in eukaryontischen Zellen, ist der Export von Ribosomen aus dem Zellkern ins Zytoplasma noch weitgehend unverstanden. In dieser Arbeit wird die Reinigung und Charakterisierung eines prä-ribosomalen 60S Partikels beschrieben, das ein spätes Exportintermediat aus dem Zellkern ins Zytoplasma darstellen könnte. Ausgehend von der ungewöhnlichen *mtr2-33* Mutante (Mtr2p ist ein mRNA-Exportfaktor), die keinen mRNA-Exportdefekt, aber einen ribosomalen Exportdefekt aufweist, wurden über genetische Ansätze die neuen Ribosomenbiogenesefaktoren Ecm1p, Nug1p und Nug2p identifiziert. Dabei sind Nug1p und Nug2p Mitglieder einer neuartigen evolutionär konservierten Proteinfamilie von GTPasen. Es konnte gezeigt werden, daß Nug1p und Nug2p mit 60S Prä-Ribosomen assoziieren. Entsprechend war es möglich, diese 60S prä-ribosomalen Partikel durch Affinitätsreinigung von Nug1p zu isolieren. Das Nug1p / Nug2p enthaltende Prä-Ribosom besteht aus den ribosomalen L-Proteinen, 27SB und 7S rRNA-Vorstufen und reifer 25S, 5.8S und 5S rRNA. Weiterhin enthält das 60S Prä-Ribosom mindestens 23 nichtribosomale Proteine, die überwiegend essentiell und evolutionär konserviert sind. Nachdem *nug1* und *nug2* ts Mutanten Defekte im 60S Export aufweisen, aber nicht in der rRNA-Prozessierung beeinträchtigt sind, schlage ich vor, daß das isolierte Nug1p-Partikel ein Intermediat während des Exportes der 60S Untereinheit aus dem Zellkern ins Zytoplasma darstellt.

## 1. Einleitung

Das zentrale Kennzeichen eukaryontischer Zellen ist die Präsenz von Organellen. Die Aufgliederung von Zellen in Kompartimente ermöglicht eine höhere Effizienz und bessere Regulierung der verschiedenen Zellprozesse, benötigt jedoch ein effizientes Transportsystem, um beispielsweise Proteine vom Ort ihrer Synthese, dem Zytoplasma, zu ihrem Wirkungsort zu bringen.

Ein essentieller Transportprozess ist der regulierte Austausch von Makromolekülen zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma. So müssen Proteine, die an der Transkription, dem Spleißen von mRNA oder der rRNA Prozessierung, beteiligt sind, in den Kern transportiert werden, während verschiedene RNAs exportiert werden müssen. Die wichtigsten Beispiele sind der nukleäre Export von tRNA, mRNA oder rRNA. Diese nukleozytoplasmatischen Transportprozesse erfolgen durch Kernporenkomplexe (NPC), die in die Kernmembran (Nuclear Envelope, NE) eingebettet sind. Die Kernporen bilden Kanäle durch die Kernmembran und ermöglichen den Austausch von kleinen Molekülen und Ionen durch Diffusion, als auch den aktiven Transport von Makromolekülen. Vermittelt wird der aktive Transport durch Transportfaktoren, sogenannte Importine und Exportine, welche zwischen dem Zellkern und Zytoplasma hin- und herpendeln.

### 1.1 Der Kernporenkomplex

Der Kernporenkomplex (NPC) ist eine komplexe makromolekulare Struktur, die aus Proteinen, den sogenannten Nukleoporinen (kurz Nups), aufgebaut wird. In der Hefe *S. cerevisiae* besteht der Porenkomplex aus etwa 30 Nukleoporinen und besitzt eine Masse von 66 MDa (Rout und Blobel, 1993; Stoffler et al., 1999; Rout et al., 2000). Die Anzahl der Nups in Vertebraten wird auf ca. 50 geschätzt (Fontoura et al., 1999), was in einer Gesamtmasse des Kernporenkomplexes von etwa 125 MDa (Reichelt et al., 1990) resultiert. Trotz dieser Größenunterschiede

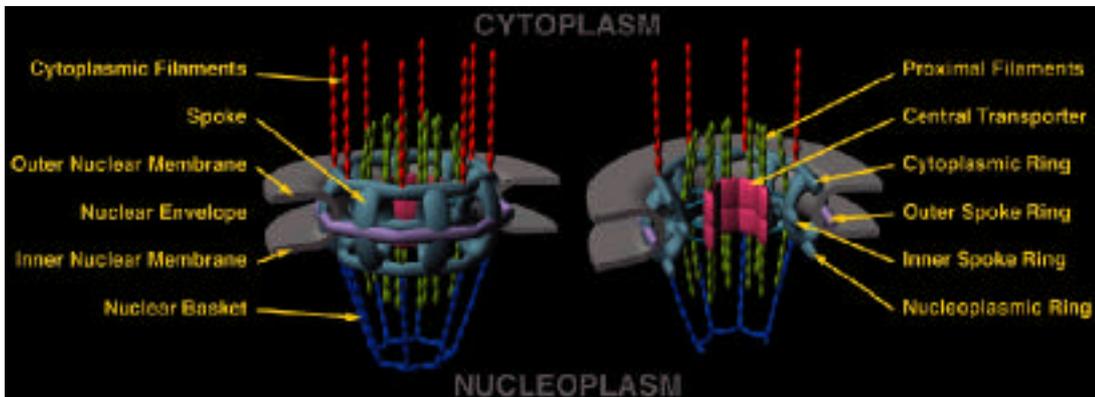
besitzen alle eukaryontischen Kernporen die gleiche Grundstruktur (Abb. 1A; Yang et al., 1998). Der gesamte Kernporenkomplex besitzt eine achtfache Rotations-symmetrie. Die Kernstruktur besteht aus dem Speichenring (Spoke), welcher auf der nukleären Seite über einen Ring mit dem sogenannten nukleären Korb verknüpft ist. Auf der zytoplasmatischen Seite existiert eine ähnliche Ringstruktur, welche mit den zytoplasmatischen Fibrillen verbunden ist (Yang et al., 1998; Stoffler et al., 1999; Fahrenkrog et al., 2001). Die Existenz eines sogenannten zentralen Transporters im Zentrum der Kernpore konnte durch mikroskopische Methoden nachgewiesen werden (Yang et al., 1998; Stoffler et al., 1999). Jedoch ist es umstritten, ob es sich hierbei um einen strukturellen Teil der Kernpore oder um Makromoleküle handelt, welche durch die Kernpore transportiert werden (Diskussion siehe Allen et al. 2000, Fahrenkrog et al., 2001). Desweiteren existieren von mindestens 65% der Hefenukleoporine entsprechende homologe Proteine in höheren eukaryontischen Zellen (siehe Doye und Hurt, 1997; Stoffler et al., 1999; Vasu und Forbes., 2001), was für einen konservierten Translokations-mechanismus spricht.

Die meisten Nukleoporine in *S. cerevisiae* konnten über genetische Screens identifiziert werden (siehe Fabre und Hurt, 1997). Vervollständigt wurde die Liste der Nukleoporine durch die biochemische Aufreinigung von Kernporenkomplexen (Rout et al., 2000). In Übereinstimmung mit der strukturellen Symmetrie der Kernpore, wurde gefunden, daß jedes der 30 gefundenen Nukleoporine in 8-, 16- oder 32-facher Kopienzahl pro Kernpore vorkommt. Die Kernporenproteine sind nicht nur die strukturellen Bausteine der Kernpore, sondern besitzen wichtige Funktionen bei der Translokation von Transportsubstraten. Hervorzuheben sind 12 Nukleoporine, die eine sogenannte "FG-repeat"-Domäne besitzen. Diese Domäne enthält mehrere Wiederholungen der Aminosäuren Phenylalanin-Glycin (FG). Aufgrund der Interaktion dieser "FG-repeats" mit Transportfaktoren wird vermutet, daß diese Domänen die Bindungsstellen der Kernpore für die Transportfaktoren darstellen (siehe Ryan und Wentz, 2000; Wentz et al., 2000; Stewart et al., 2001; Rout und Aitchison, 2001).

Die meisten Nups sind sowohl auf der nukleären als auch auf der zytoplasma-tischen Seite der Pore zu finden (Rout et al., 2000; Abb. 1B). Eine Sonderstellung

## Aufbau und Struktur des Kernporenkomplexes

A



B

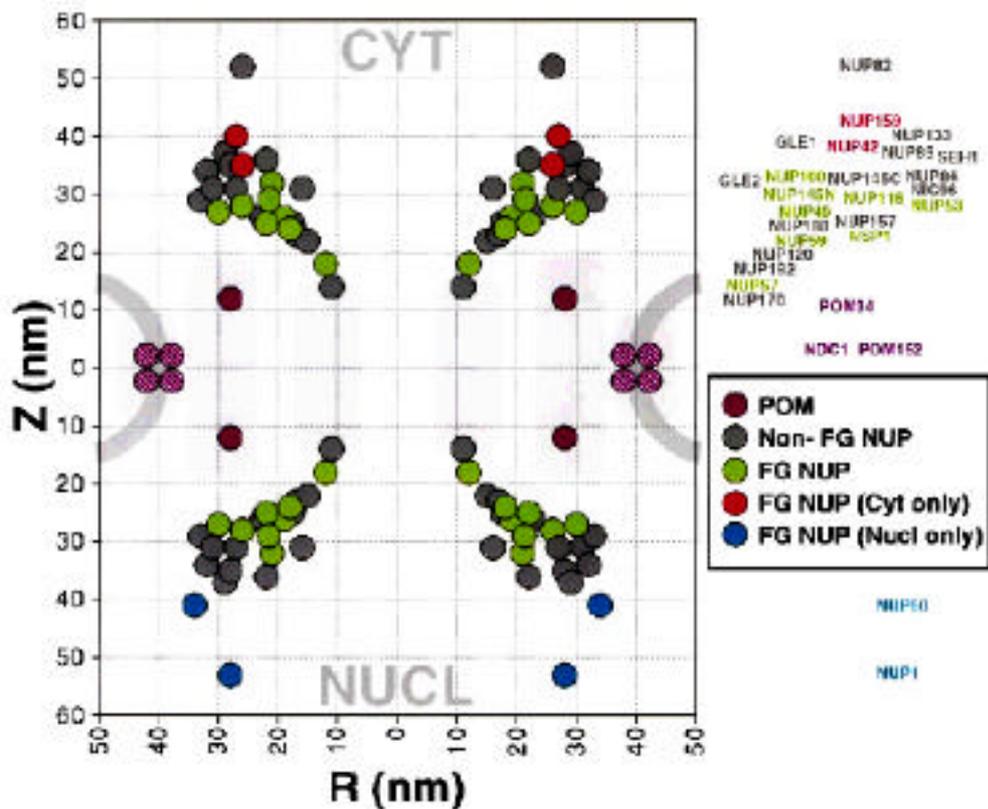


Abbildung 1: Teil A zeigt eine schematische Darstellung des Aufbaus eines Kernporenkomplexes (aus Rout und Aitchison 2001). Teil B zeigt die Lokalisierung der Nukleoporine von *S. cerevisiae* innerhalb der Kernpore (Rout et al., 2000). Erläuterungen siehe Text.

besitzen Nup159p, Nup42p, Nup60p und Nup1p (Abb. 1B; Rout et al., 2000).

Diese exklusive Lokalisierung auf der nukleären oder zytoplasmatischen Seite der Kernpore ermöglicht eine Kontrolle der Transportrichtung (Beispiel hierfür ist Nup60p (Denning et al., 2001)).

Es gibt auch Anzeichen, daß einzelne Nukleoporine dynamisch am Translokationsprozess teilnehmen (Ein Beispiel hierfür ist Nup2p (Dilworth et al., 2001)). Hervorzuheben sind Hinweise, daß die Kernpore mit nukleären Filamenten (Galy et al., 2000; Kosova et al., 2000) und den zytoplasmatischen Zytoskelett (Goldberg und Allen, 1995; Yan et al., 1997) verknüpft ist. Diese Verknüpfungen können sowohl eine wichtige strukturelle Bedeutung haben als auch eine Rolle für den Transport von Import- bzw. Exportsubstraten zur Kernpore hin bzw. von der Kernpore weg besitzen.

## 1.2 Die Proteinfamilie der Karyopherine

Der Transport von Makromolekülen durch die Kernpore ist ein aktiver, zielgerichteter Prozess, der durch spezifische Transportsignale reguliert wird.

Proteine, die in den Zellkern importiert werden, besitzen eine nukleäre Lokalisierungssequenz (NLS). Dagegen besitzen Proteine, welche aus dem Zellkern exportiert werden, ein nukleäres Exportsignal (NES). Diese Aminosäuresequenzen werden von spezifischen Transportfaktoren, den Karyopherinen (kurz Kaps), erkannt und durch die Kernpore transportiert. Die Karyopherine gehören zur Familie der Importin -ähnlichen Proteine, welche nach dem ersten charakterisierten Transportfaktor benannt wurden. Aufgrund ihrer zellulären Funktion unterscheidet man in Importine und Exportine (Überblick zu den Transportfaktoren und ihren Substraten siehe Tabelle 1; sowie Pemberton et al (1998), Mattaj und Englmeier (1998), Görlich und Kutay (1999) Kaffman und O'Shea (1999)). Das gemeinsame Kennzeichen der Importin -ähnlichen Transportfaktoren ist eine N-terminale RanGTP bindende Domäne (Görlich und Kutay, 1999; siehe Einleitung 1.3). Die C-terminale Domäne dient zur Interaktion mit den Transportsubstraten. Weiter sind die Transportfaktoren in der Lage an die

Tabelle 1 Die Transportrezeptoren der Importin -Proteinfamilie

Exportfaktor		Substrat
Kap124p	Crn1p / Xpo1p	Leucin reiche NES enthaltende Proteine Hog1p, Rna1p, Ssb1p, SRP-Komplex, Nmd3p- Rpl10p-60S ribosomale Untereinheit
	Cse1p	Srp1p (Imp )
	Los1p	tRNA
Kap142p	Msn5p	phosphoryliertes Pho4p und Far1p, Mig1p, Msn4p, Msn2p, Rtg1p-Rtg3p-Komplex

Importfaktor		Substrat
Kap95p	Imp	NLS enthaltende Proteine (die Bindungen dieser Proteine an Kap95p wird über Imp vermittelt), Histone (direktes Substrat)
Kap104p	Transportin	mRNA bindende Proteine Nab2p, Nab4p, Hrp1p
Kap123p	Yrb4p	ribosomale Proteine
Kap121p	Pse1p	ribosomale Proteine und Pho4p, Yra1p, Yra2p, Spo12p
Kap119p	Nmd5p	Hog1p, TFIIIS
Kap108p	Sxm1p	Rpl11p, Rpl25p, Rpl31p, Lha1p
Kap114p		Tbp1p
Kap111p	Mtr10p	Npl3p
Kap120p	Lph2p	unbekannt
Kap122p	Pdr6p	Toa1-Toa2p-Komplex
Kap142p	Msn5p	RPA-Komplex

(Die Informationen in Tabelle 1 sind der YPD Datenbank (siehe Literatur 6.3 entnommen.)

Repeatsequenzen (FG) der Nukleoporine zu binden, um so die Translokation durch die Kernpore zu ermöglichen. Der Import bzw. Export erfolgt in drei Schritten: 1. Substratbindung, 2. Translokation durch die Kernpore und 3. Freisetzung des Substrates im Zielkompartiment. Reguliert wird dieser Prozess über die GTPase Ran (siehe Einleitung 1.3). Nach Freisetzung des Substrates im Zielkompartiment wandert der Transportrezeptor zurück ins Ausgangskompartiment und steht dort für die Translokation des nächsten Substrates zur Verfügung.

Ein interessanter Aspekt ergibt sich durch die gemeinsame Nutzung eines Transportfaktors für den Import und Export verschiedener Substrate. Durch diese Doppelnutzung könnte die Transportkapazität eines Transportrezeptors pro

Transportzyklus optimiert werden. Die bisher einzigen Beispiele für eine solche Doppelfunktion sind Kap142p (Yoshida und Blobel, 2001) und das menschliche Importin13 (Mingot et al., 2001). Ob weitere Karyopherine ähnliche Eigenschaften besitzen bleibt offen.

### 1.3 Der Ran-Zyklus und die Regulierung des nukleozytoplasmatischen Transports

Eine zentrale Rolle im nukleozytoplasmatischen Transport spielt die GTPase Ran (Gsp1p in *S. cerevisiae*). Ran existiert in unterschiedlichen Konformationen, einer GTP und einer GDP gebundenen Form. Die GTP-Hydrolyseaktivität von Ran allein ist sehr gering, wird jedoch durch RanGAP (Rna1p in *S. cerevisiae*), einem GTPase aktivierenden Protein, stark stimuliert. Die Wiederherstellung von RanGTP wird durch den Austausch von GDP durch GTP erreicht. Diese Reaktion wird durch einen Guaninaustauschfaktor RanGEF (Rcc1p bzw. Prp20p in *S. cerevisiae*) katalysiert. Aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation dieser zwei regulierenden Proteine, RanGAP befindet sich im Zytoplasma und RanGEF im Zellkern (RanGEF bindet im Zellkern an Chromatin), wird postuliert, daß Ran im Zellkern überwiegend in der GTP gebundenen Form vorkommt, während im Zytoplasma die GDP gebundene Form überwiegt. Dieser Konzentrationsgradient von RanGTP ist essentiell für die Regulation des nukleozytoplasmatischen Transports. Aufgrund der Wechselwirkung der Karyopherine mit RanGTP ist das folgende vereinfachte Modell allgemein anerkannt (Abb. 2): Für den Export eines Substrates wird im Zellkern ein trimerer Komplex aus Exportfaktor (Exp), RanGTP und dem Substrat (Cargo) gebildet. Dieser Komplex wird durch die Wechselwirkung des Exportfaktors mit den Nukleoporinen durch die Kernpore transportiert. Im Zytoplasma erfolgt die Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP, was die Dissoziation des trimeren Exportkomplexes und somit die Freisetzung des Substrates zur Folge hat. Über den gleichen Mechanismus wird der nukleäre Import reguliert, jedoch kann das Importsubstrat nur in Abwesenheit von RanGTP

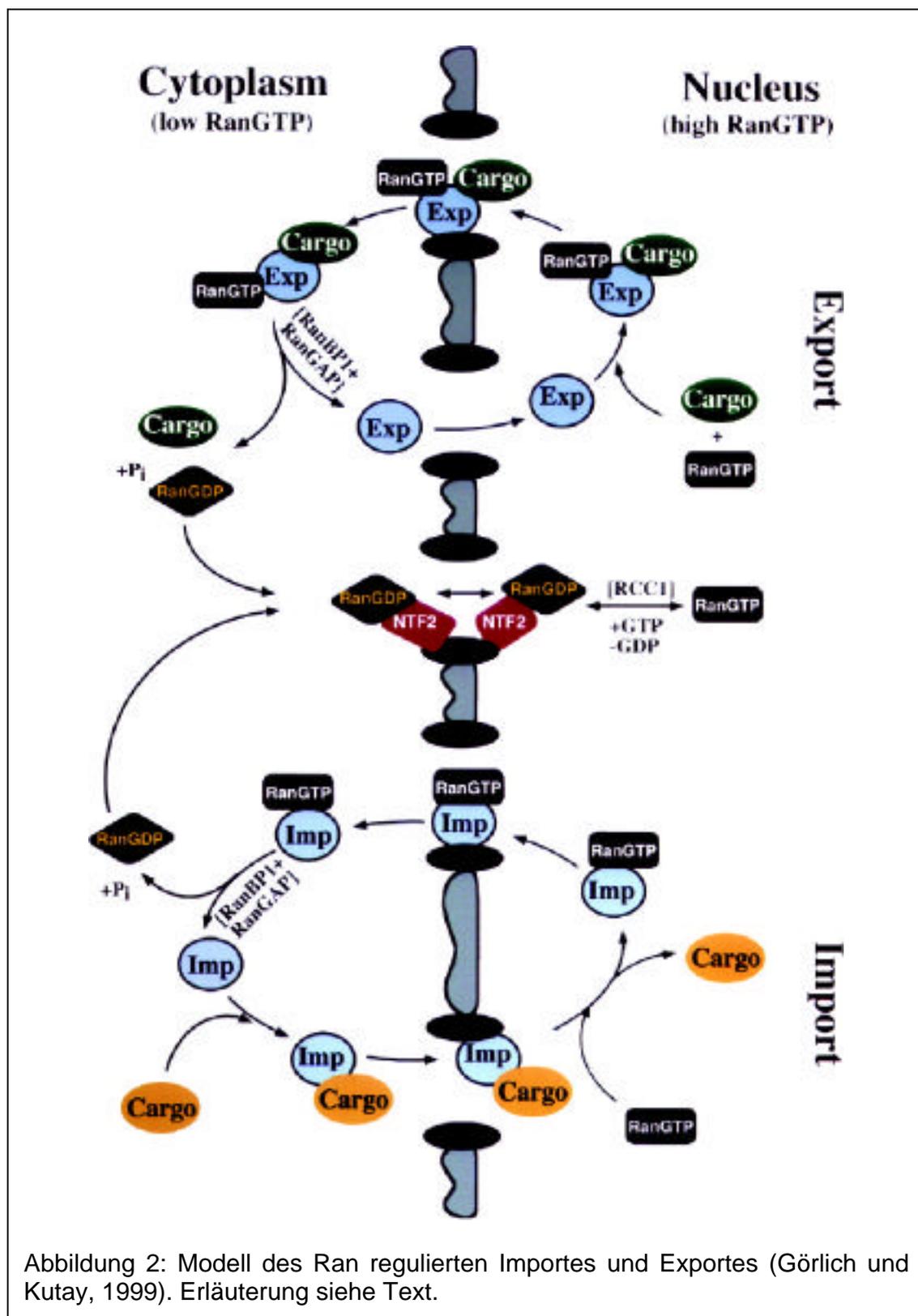


Abbildung 2: Modell des Ran regulierten Importes und Exportes (Görlich und Kutay, 1999). Erläuterung siehe Text.

an den Importfaktor (Imp) binden. D.h. im Zytoplasma bildet sich ein dimerer Komplex aus Substrat und Importfaktor, welcher durch die Wechselwirkung zwischen Importfaktor und Kernpore in den Zellkern importiert wird. Im Kern wird das Substrat durch die Bindung von RanGTP an den Importfaktor freigesetzt. Der RanGTP gebundene Importfaktor wandert zurück ins Zytoplasma. Hier erfolgt die Hydrolyse von RanGTP, der dimere Komplex zerfällt und der Importfaktor steht für einen neuen Importzyklus zur Verfügung. RanGDP wird über den Ran-spezifischen Transportfaktor Ntf2p in den Zellkern reimportiert. Anschließend wird dort durch RanGEF die GTP gebundene Form von Ran wiederhergestellt (siehe Mattaj und Englmeier (1998), Görlich und Kutay (1999), Kaffman und O'Shea (1999), Conti und Izaurralde (2001) und Künzler und Hurt, (2001), Kuersten et al., 2001).

Die tatsächliche Regulation des nukleozytoplasmatischen Transports ist jedoch komplizierter: So wird beispielsweise die Aktivität von RanGAP durch einen weiteren zytoplasmatischen Faktor, RanBP1 (Yrb1p in *S. cerevisiae*), zusätzlich stimuliert. Auch konnte gezeigt werden, daß die Anwesenheit von RanGTP im Zellkern nicht für die Dissoziation der mRNA bindenden Protein Npl3p, Nab2p und Hrp1 vom Importrezeptor ausreicht. Erst die zusätzliche Anwesenheit von RNA ermöglicht die Freisetzung dieser Importsubstrate. Dies zeigt, daß der Import von Npl3p, Nab2p und Hrp1p nicht direkt nach der Translokation endet, sondern bis zum Bestimmungsort, beispielsweise zum Ort der Transkription, erfolgt (Senger et al., 1998; Lee und Aitchison, 1999). Ein ähnliches Beispiel ist der Import des Transkriptionsfaktors Tbp1p (TATA-Box bindendes Protein). Es wurde gezeigt, daß die Freisetzung des Tbp1p vom Importin (Kap114p) durch Anwesenheit TATA-Box enthaltender DNA stimuliert wird (Pemberton et al., 1999). Vermutlich werden auch andere Import- oder Exportsubstrate nicht nur durch die Kernpore, sondern bis zu ihrem Bestimmungsort transportiert.

Eine zentrale Frage des nukleozytoplasmatischen Transports beschäftigt sich mit dem Energiebedarf. Bisher ist die Hydrolyse von RanGTP der einzig belegte energieverbrauchende Schritt. Jedoch ist nicht auszuschließen, daß für den Export größerer Substrate wie mRNA oder Ribosomen zusätzliche GTPasen oder ATPasen, beispielsweise in Form von RNA-Helikasen, benötigt werden.

## 1.4 Export von tRNA

Die Transkription und Prozessierung der tRNA erfolgt im Zellkern. Ihr Export wird durch ein Mitglied der Importin -Proteinfamilie (siehe Einleitung 1.2), Los1p in *S. cerevisiae* bzw. Exportin-t das homologe Protein in höheren eukaryontischen Zellen, vermittelt. Es konnte gezeigt werden, daß Los1p/Exportin-t direkt mit Nukleoporinen interagiert und mit der fertig prozessierten tRNA und RanGTP einen trimeren Exportkomplex bildet (Arts et al., 1998; Hellmuth et al., 1998; Kutay et al., 1998). Über die Wechselwirkung von Los1p/Exportin-t mit Kernpore wird der Komplex exportiert. Anschließend erfolgt durch die Hydrolyse von RanGTP die Freisetzung der tRNA im Zytoplasma (siehe Einleitung 1.3). Aufgrund der Tatsache, daß Los1p nicht essentiell ist (Hurt et al., 1987) und die Disruption nur zu einem relativ geringen Exportdefekt von intronloser tRNA führt (Großhans et al., 2000b), ist es wahrscheinlich, daß noch weitere Exportmechanismen existieren (Für Diskussion siehe Simos (1999), Simos und Hurt (1999), Wolin und Matera (1999) und Großhans et al. (2000a)).

## 1.5 Export von mRNA

Es ist allgemein akzeptiert, daß mRNA als mRNP-Partikel (Ribonukleoprotein-komplex) exportiert wird. Sogenannte hnRNP-Proteine assoziieren bereits während der Transkription mit der Precursor mRNA. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Bildung von mRNP-Komplexen, sowie bei der weiteren mRNA-Prozessierung, wie die 5'-Verknüpfung mit der m<sup>7</sup>G-Kappe und die 3'-Polyadenylierung (siehe Krecic und Swanson, 1999). Bei intronhaltiger mRNA ist zusätzliches Spleißen essentiell für den Export des mRNP-Komplexes (Legrain und Rosbash, 1989; Luo und Reed, 1999). Einige dieser hnRNP-Proteine pendeln zwischen Kern und Zytoplasma, was dafür spricht, daß diese Faktoren zusammen mit der mRNA aus dem Zellkern exportiert werden. Offen bleibt hierbei, ob diese Faktoren eine aktive Funktion am Exportprozess besitzen (siehe Einleitung 1.5.2).

Um die Komponenten der Exportmaschinerie zu identifizieren, wurde in *S. cerevisiae* eine Kollektion von temperatursensitiven Hefemutanten auf mRNA-Exportdefekte untersucht. Die dabei isolierten Gene wurden *mtr* (mRNA Transport) (Kadowaki et al., 1992; 1994b; 1994a) oder *rat* (Ribonucleic Acid Trafficking)(Amberg et al., 1992) genannt. Die identifizierten Gene können in drei Gruppen eingeteilt werden: 1. Nukleoporine, 2. hnRNP-Proteine / RNA modifizierende Proteine und 3. Faktoren des Ran-Zyklus und Karyopherine. Auf deren Rolle im mRNA-Export soll in den folgenden Kapiteln detaillierter eingegangen werden.

Im Screen für mRNA-Exportmutanten wurden auch zahlreiche Faktoren isoliert, die vermutlich keine direkte Rolle im mRNA-Export spielen. Hierzu gehört die Hefe-Acetyl-CoA-Carboxylase *ACC1/MTR7* (Kadowaki et al., 1994b; Schneiter und Kohlwein, 1997) ebenso wie die DEAD Box Helikase *Dob1p/Mtr4p* (Liang et al., 1996), *Mtr3p* (Kadowaki et al., 1994a; 1995), und *Xrn2p/Rat1p* (Amberg et al., 1992), die scheinbar eine primäre Rolle bei der Ribosomenbiosynthese spielen (Lafontaine und Tollervey, 1995; de la Cruz et al., 1998; Allmang et al., 1999; van Hoof et al., 2000). Ihr Einfluss auf den mRNA-Export ist unverstanden und wahrscheinlich indirekt.

Wichtig für die Aufklärung des mRNA-Exportprozesses waren genetische Screens ausgehend von der mRNA-Exportmutante *nup85Δ/rat9*. Hierdurch konnte der mRNA-Exportfaktor *Mex67p* identifiziert (Segref et al., 1997) und dessen Interaktion mit *Mtr2p* (Kadowaki et al. 1994b) charakterisiert werden (Santos-Rosa et al., 1998). Die Eigenschaften des heterodimeren *Mex67p-Mtr2p*-Komplex, sowohl an mRNA als auch an Nukleoporine zu binden, unterstreichen die Bedeutung dieser Proteine im mRNA-Exportprozess (siehe Sträßer und Hurt (1999), Stutz und Rosbash (1998), Gama-Carvalho und Carmo-Fonseca (1999), Nakielnny und Dreyfuss (1999), Zenklusen und Stutz (2001). Auf die zentrale Funktion dieses Komplexes beim Translokationsprozess wird in Kapitel 1.5.4 näher eingegangen.

### 1.5.1 Nukleoporine und ihre Rolle im mRNA-Export

Der nukleozytoplasmatische Austausch von Makromolekülen erfolgt durch die Kernpore. Daher ist der mRNA-Export auf eine intakte Kernpore angewiesen. Übereinstimmend wurde gefunden, daß nahezu alle der charakterisierten *RAT*-Gene für Nukleoporine kodieren (Fabre und Hurt, 1997). Die meisten der Nukleoporine mit einer Rolle im mRNA-Export (Nups, deren Mutation zu einem mRNA-Exportdefekt führen, sind unterstrichen) gehören zum Nup84p-Subkomplex (Siniosoglou et al., 1996; Siniosoglou et al., 2000; M. Lutzmann submitted): Nup85p/Rat9p (Goldstein et al. 1996), Nup120p/Rat2p (Aitchison et al. 1995, Heath et al., 1995), Nup145Cp/Rat10p (Fabre et al., 1994; Dockendorff et al., 1997; Teixeira et al., 1997), Nup84p, Sec13p, Seh1p und Nup133p/Rat3 (Doye et al., 1994; Li et al., 1995; Pemberton et al., 1995; Belgareh et al., 2001). Dieser Komplex ist symmetrisch auf beiden Seiten der Pore zu finden (Rout et al., 2000; Abb. 1B). Ein weiterer Subkomplex mit Beteiligung am mRNA-Export ist der Nup82p-Komplex (Wimmer et al., 1992) mit Rat7p/Nup159p (Belgareh et al., 1998; Gorsch et al., 1995; Kraemer et al., 1995), Nup82p (Hurwitz und Blobel, 1995; Hurwitz et al., 1998), Nsp1p (Bailer et al., 2001) und Nup116p (Wente und Blobel, 1993; Bailer et al., 2000). Durch die exklusive Lokalisation des Nup82p-Komplexes auf der zytoplasmatischen Seite der Kernpore (Kraemer et al., 1995; Rout et al., 2000) könnten diese Nukleoporine eine spezifische Rolle in der Termination der Translokation spielen. Dagegen könnte Nup1p (Davis und Fink, 1990; Bogerd et al., 1994; Schlaich und Hurt, 1995) aufgrund seiner Lokalisation auf der nukleären Seite (Rout et al., 2000; Abb. 1B), eine spezielle Funktion bei der Initiation der Translokation von Exportkomplexen besitzen. Mit Nup116p assoziiert ist Gle2p/Nup40p (Murphy et al., 1996; Bailer et al., 1998), welches auch im mRNA-Export impliziert ist (Fabre und Hurt, 1997). Interessanterweise ist Gle2p homolog zu Rae1p, das essentiell für den mRNA Export in *S. pombe* ist (Brown et al., 1995, Yoon et al., 2000), und dem humanen mRNA-Exportfaktor hRae1p (Bharathi et al., 1997; Prichard et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, daß hRae1p zwischen Kern und Zytoplasma hin und herwandert (Prichard et al., 1999) und durch UV-Bestrahlung an Poly(A)<sup>+</sup> RNA gekoppelt werden kann

(Kraemer und Blobel, 1997). Diese Eigenschaften legen nahe, daß Gle2p/hRAE1p eine Rolle im mRNA-Export spielt. Die genaue Funktion ist bisher jedoch noch unklar.

Ein weiterer Kernporenassoziierter mRNA-Exportfaktor ist Gle1p/Rss1p (Murphy und Wente, 1996). Gle1p interagiert sowohl genetisch als auch direkt mit Nup159p, der RNA-Helikase Dbp5p (siehe Einleitung 1.5.2) und Gfd1p (Del Priore et al., 1996; Strahm et al., 1999; Hodge et al., 1999). Aufgrund der Lokalisation auf der zytoplasmatischen Seite der Kernpore ist es wahrscheinlich, daß dieser Gle1p-Nup159p-Dbp5p-Gfd1p-Komplex eine Rolle bei der Termination der Translokation des mRNP-Partikels spielt (Strahm et al., 1999).

Interessanterweise enthalten Nup116p und Nup145Np sogenannte Nukleoporin-RNA-Bindungs-Motive (NRM), die *in vitro* an RNA binden können (Fabre et al., 1994). Diese Nukleoporine könnten während des Translokationsprozesses direkten Kontakt zum Exportsubstrat besitzen und dadurch den Transport erleichtern oder steuern. Weitere Nukleoporine, deren Mutanten mRNA-Exportdefekte zeigen, sind Nup49p, Nup57p (Grandi et al., 1995), sowie Rip1p/Nup42p (Saavedra et al., 1997; Vainberg et al., 2000).

Ein Problem bei der Interpretation von mRNA-Exportdefekten bei Nukleoporinmutanten ist jedoch, daß meist parallel zum mRNA-Export auch andere Import / Exportdefekte oder eine abnormale Kernporenverteilung zu beobachten sind (Fabre und Hurt, 1997). Dies macht es schwierig, zwischen direkten und indirekten Defekten zu unterscheiden, und erschwert es, verschiedenen Nukleoporinen eine definierte Rolle mRNA-Export zuzuordnen.

### **1.5.2 Die Funktion von hnRNP-Proteinen und mRNA-modifizierenden Proteinen im mRNA-Export**

Da die mRNA in Form eines mRNP-Partikels exportiert wird, ist zu vermuten, daß einige der mRNA assoziierten Proteine eine Rolle im mRNA-Export spielen. Zu diesen potentiellen Exportfaktoren gehören hnRNP-Proteine und mRNA-modifizierende Proteine wie Spleißfaktoren oder mRNA-Helikasen.

Einer dieser potentiellen mRNA-Exportfaktoren ist Npl3p/Mtr13p. Mutanten von *NPL3* zeigen eine Akkumulation von Poly(A)<sup>+</sup> RNA im Zellkern (Kadowaki et al., 1994a; Singleton et al., 1995). Die Beobachtungen, daß Npl3p direkt an mRNA bindet (Flach et al., 1994; Wilson et al., 1994) und zwischen Zellkern und Zytoplasma hin- und herpendelt (Lee et al., 1996) unterstreichen eine mögliche Beteiligung an mRNA-Export. Npl3p assoziiert bereits während der Transkription mit der mRNA (Lei et al., 2001) und wandert mit dem mRNP-Partikel ins Zytoplasma (Lee et al., 1996; Shen et al., 1998). Im Zytoplasma wird Npl3p durch Sky1p von dem mRNP-Partikel freigesetzt (Gilbert et al., 2001) und anschließend durch Mtr10p (siehe Einleitung 1.5.3) in den Kern reimportiert (Pemberton et al., 1997; Senger et al., 1998). Jedoch wurde bis heute keine funktionelle Verbindung zu Nukleoporinen oder Exportfaktoren gefunden, die bestätigen würde, daß Npl3p eine aktive Rolle beim mRNA-Export spielt. Dies könnte bedeuten, daß in *npl3* Mutanten der Exportprozess des mRNP-Partikels auf einer frühen Stufe beeinträchtigt ist. Möglicherweise ist Npl3p nötig um das mRNP-Partikel exportkompetent zu machen. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, daß Npl3p mit den SR-Proteinen verwandt ist (Birney et al., 1993), welche nach dem Spleißprozess auf der reifen mRNA verbleiben. Diese Faktoren können dadurch eine Exportsignal für die Exportfaktoren darstellen. (Zur Rolle von Spleißfaktoren im mRNA-Export siehe Einleitung 1.5.5.)

Hrp1p/Nab4p und Nab2p sind hnRNP-Proteine, die ebenfalls zwischen Zellkern und Zytoplasma hin und herwandern (Wilson et al., 1994; Lee und Aichison, 1999). Es fehlt jedoch auch hier eine direkte Verbindung zu Exportfaktoren oder Nukleoporinen. Interessanterweise besitzen die hnRNP-Proteine A1 und K aus höheren Eukaryonten Domänen mit einer NES Aktivität (M9 bzw. KNS) (Michael et al., 1995, 1997; Mili et al., 2001). Allerdings ist bisher kein Exportfaktor bekannt, der mit diesen NES-Signalen interagiert.

Auch hnRNP-Proteine, die ihre Funktion exklusiv im Kern ausüben (hnRNP C, U), können nötig sein für die Regulierung bzw. Kennzeichnung von exportkompetenter mRNA. So ist beispielsweise eine Entfernung einiger dieser hnRNPs von der mRNA nötig, um den mRNA-Export zu ermöglichen, da das Retentionsignal dieser Faktoren stärker als das Exportsignal der mRNA ist (Nakielny und Dreyfuss,

1996). Dieser Mechanismus dient dazu ungespleißte bzw. teilweise gespleißte mRNA im Kern zurückzuhalten (siehe Reed und Magni (2001).

Eine aktive Rolle im mRNA-Export spielt *rat8*, welches für die DEAD-Box Helikase Dbp5p codiert. Es wurde beobachtet, daß *dbp5* Mutanten einen starken mRNA-Exportdefekt zeigen (Snay-Hodge et al., 1998; Tseng et al., 1998). Dbp5p zeigt eine Lokalisierung auf der zytoplasmatischen Seite der Kernpore (Tseng et al., 1998) und interagiert dort mit Nup159p, Nup42p, Gle1p und Gfd1p (Hodge et al., 1999; Schmitt et al., 1999; Strahm et al., 1999). Da Dbp5p in der Lage ist ATP-abhängig RNA zu entwinden (Tseng et al., 1998), könnte dieser Komplex eine Rolle bei der Termination des mRNA-Exports spielen. Dadurch könnte zum einen Energie für die Translokation bereitgestellt werden und / oder sichergestellt werden, daß der mRNA-Export irreversibel erfolgt.

### **1.5.3 Die Bedeutung des Ran-Zyklus und der Karyopherine für den mRNA-Export**

Aufgrund der zentralen Bedeutung des Ran-Zyklus für den nukleozytoplasmatischen Transport, war es naheliegend Mutanten von Ran und dessen Cofaktoren auf einen mRNA-Exportdefekt zu analysieren. Die direkte Beteiligung des Ran-Zyklus und der Karyopherine beim mRNA-Export war in der Vergangenheit umstritten. Heute ist allgemein akzeptiert, daß diese Faktoren eher eine indirekte Rolle zu spielen (siehe Komeili und O'Shea, 2001). So wurde gezeigt, daß Mtr10p (Kadowaki et al., 1994a) der Importrezeptor für Npl3p ist (Senger et al., 1998; Pemberton et al., 1997). Wenn es nun zu einer Störung des Ran-Zyklus (beispielsweise Mtr1p/Prp20p) bzw. der Importfaktoren kommt, beeinträchtigt dies den Reimport der mRNA-Exportfaktoren und verursacht so einen indirekten mRNA-Exportdefekt.

Lange Zeit wurde über eine Beteiligung des Exportins Xpo1p am mRNA-Export diskutiert. So wird in der *xpo1-1* Mutante sowohl ein mRNA- als auch ein NES vermittelter Proteinexportdefekt beobachtet (Stade et al., 1997). Jedoch scheint dieser mRNA-Exportdefekt auch nur ein indirekter Defekt zu sein. Es wurde

gezeigt, daß Xpo1 benötigt wird, um Dbp5p aus dem Kern zu exportieren (Hodge et al., 1999). Wenn nun Dbp5p im Kern akkumuliert, kann die Dbp5p vermittelte zytoplasmatische Termination der Translokation nicht stattfinden und dadurch einen mRNA-Exportdefekt bewirken. Ein weiteres Indiz hierfür ist die Beobachtung, das eine Leptomycin B sensitive *xpo1* Mutante NES enthaltende Proteine im Kern akkumuliert, jedoch keine mRNA (Neville und Rosbash, 1999). Auch in höheren eukaryontischen Zellen kann eine Beteiligung von Xpo1p/Crm1p ausgeschlossen werden, da Leptomycin B Behandlung oder Injektion von NES Substraten in den Zellkern keinen Einfluss auf den Export zellulärer mRNA haben (Fornerod et al., 1997; Fischer et al., 1995). Kürzlich wurde außerdem beobachtet, daß die nukleäre Injektion von RanGAP oder einer Ran-Mutante den tRNA und U1 snRNA Export blockiert, jedoch nicht den Export von mRNA beeinträchtigt (Clouse et al., 2001). Dies legt die Schlussfolgerung nahe, daß der Export von zellulärer mRNA nicht über einen Exportfaktor der Importin -Familie vermittelt wird und unabhängig von Ran reguliert wird.

Eine Sonderstellung nimmt der Export viraler RNA ein. Dieser mRNA-Export erfolgt über einen anderen Exportweg. So konnte gezeigt werden, daß der Export viraler HIV RNA (humanes Immundefizienz-Virus) durch Xpo1p und RanGTP vermittelt wird (Pollard und Malim, 1998; Fornerod et al., 1997; Fukuda et al., 1997; Ullman et al., 1997; siehe Woodrich und Krausslich, 2001). Für die Replikation von Retroviren ist es nötig ungespleißte und gespleißte mRNA aus dem Zellkern zu exportieren. Um den zellulären Retentionsmechanismus für intronhaltige mRNAs zu umgehen (Legrain und Rosbash, 1989; Custodio et al., 1999), bindet das virale Rev Protein direkt an das RRE Motiv (Rev Response Element) der HIV RNA und vermittelt über seine NES den Xpo1p / RanGTP abhängigen Export. Dieser Export erfolgt nach dem allgemeinen Prinzip des RanGTP regulierten Proteintransportes durch die Kernpore (siehe Einleitung 1.3).

### 1.5.4 Der Mex67p-Mtr2p-Komplex spielt eine zentrale Rolle im Export von mRNA in *S. cerevisiae*

Der heterodimere Mex67p-Mtr2p-Komplex spielt eine zentrale Rolle bei der Translokation der mRNA durch die Kernpore. Der essentielle mRNA-Exportfaktor Mex67p wurde erstmals in einem synthetisch letalen Screen mit *NUP85 / RAT9* identifiziert (Segref et al., 1997). Das essentielle Mtr2p wurde im Screen für mRNA-Exportmutanten gefunden (Kadowaki et al., 1994b). Später wurde gefunden, daß beide Proteine sowohl genetisch als auch direkt *in vitro* und *in vivo* miteinander interagieren und Mtr2p stöchiometrisch an die M-Domäne von Mex67p bindet (Santos-Rosa et al., 1998; Sträßer et al., 2000). Verschiedene Mutanten beider Proteine zeigen bereits nach einer 5- bis 10- minütigen Inkubation bei restriktiver Temperatur eine Anhäufung von Poly(A)<sup>+</sup> RNA im Zellkern (Santos-Rosa et al., 1998; Hurt et al., 2000; Sträßer und Hurt, 2000; Sträßer et al., 2000), das eine direkte Rolle im mRNA-Export nahe legt. Aufgrund der Akkumulation verschiedener mRNA-Transkripte wie *SSA1*, *SSA2*, *SSA3*, *PGK1*, *ASH1* oder *RPL25* in der *mex67-5* Mutante (Hurt et al., 2000; Brodsky und Silver, 2000) kann man annehmen, daß Mex67p für den Export vieler, vielleicht sogar aller RNA-Polymerase II-Transkripte verantwortlich ist. Weiter konnte gezeigt werden, daß der Mex67p-Mtr2p-Komplex *in vitro* und *in vivo* an mRNA bindet (Segref et al., 1997; Santo-Rosa et al., 1998). Diese Interaktion erfolgt über die N+LRR-Domäne von Mex67p. Auf die Funktion dieser Mex67p-Domäne und deren Interaktion mit Yra1p und mRNA soll in Kapitel 1.5.5 näher eingegangen werden.

Zusätzlich zur Substratbindung interagiert der Mex67p-Mtr2p-Komplex direkt mit der Kernpore. Beide Faktoren lokalisieren *in vivo* an der Kernpore (Segref et al., 1997; Santos-Rosa et al., 1998) und können je nach genetischen Hintergrund im Zellkern oder im Zytoplasma detektiert werden (Santos-Rosa et al., 1998; Rout et al., 2000; Strawn et al., 2001), was für ein Pendeln zwischen den Kompartimenten spricht. Auch konnte eine genetische und direkte Interaktion *in vivo* und *in vitro* mit Nukleoporinen beobachtet werden (Santos-Rosa et al., 1998; Sträßer et al., 2000; Rout et al., 2000; Strawn et al., 2001; Allen et al., 2001). Hierbei gibt es

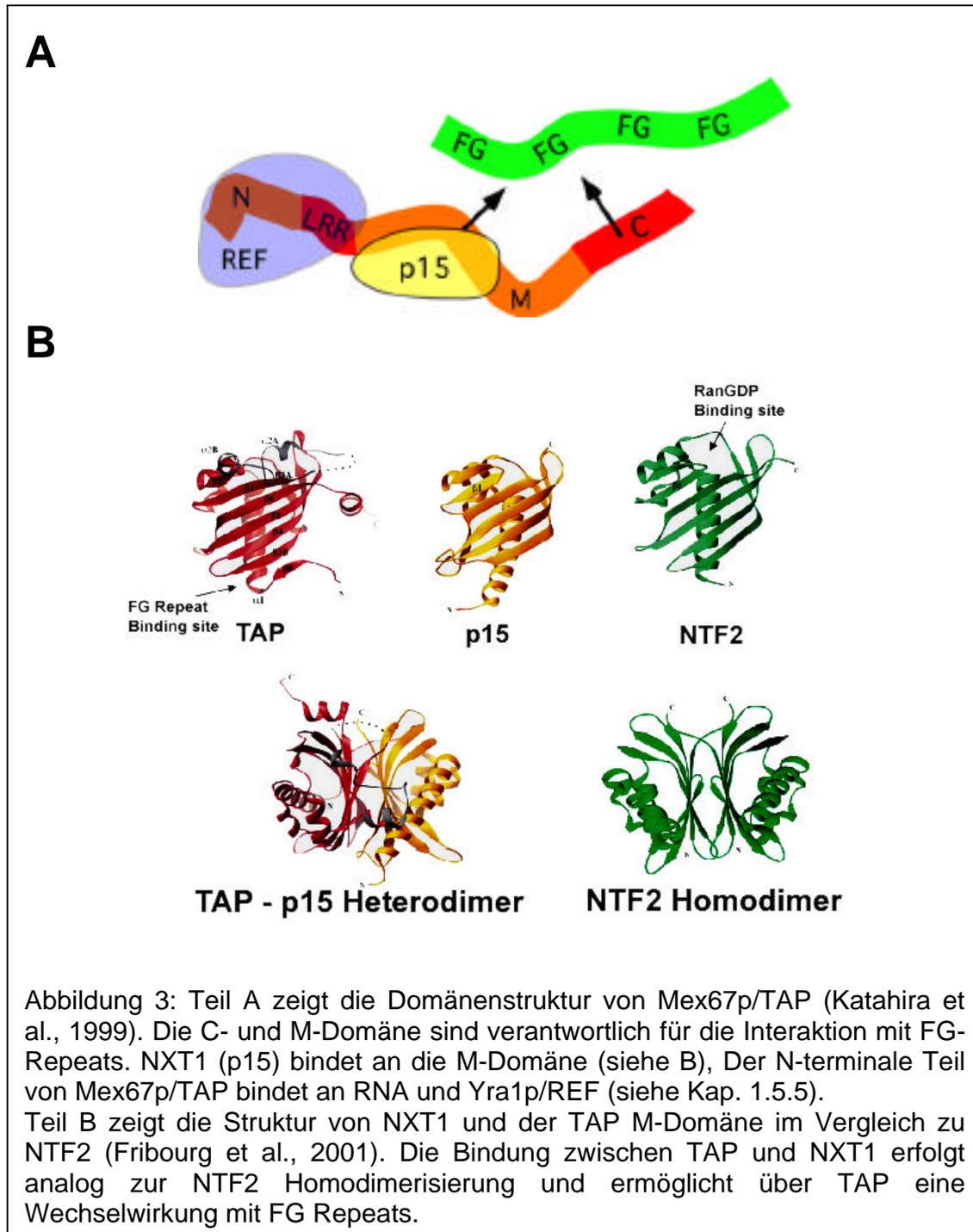
Anzeichen, daß diese Bindung von der M- und C-Domäne von Mex67 und Mtr2p abhängig ist, da einerseits die C-terminale Domäne genetisch mit Nukleoporinmutanten interagiert und andererseits Mtr2p die Bindung von Mex67p an FG-Repeats sehr stark stimuliert (Sträßer et al., 2000; eigene unveröffentlichte Daten; Strawn et al., 2001). Beispielsweise lokalisiert die *mex67-5* Mutante *in vivo* nicht mehr an der Kernpore aufgrund einer beeinträchtigten Bindung an Mtr2p (Santos-Rosa et al., 1998). Weiterhin existieren zwei Gruppen von *mtr2* Mutanten: die erste Gruppe zeigt bei restriktiver Temperatur eine Misslokalisierung im Zytoplasma, während die zweite Gruppe mit der Kernpore assoziiert bleibt. In allen Mutanten lässt sich jedoch eine Misslokalisierung von Mex67p beobachten (Santos-Rosa et al., 1998). Da nur die erste Gruppe von Mutanten genetisch mit Nukleoporinmutanten (z.B. *nup85*, *nup159*, *rip1*, *nup116*, *gle2*) interagiert (Santos-Rosa et al., 1998; eigene unveröffentlichte Daten), liegt die Vermutung nahe, daß die Bindung von Mex67p an die Kernpore über Mtr2p erfolgt oder entscheidend reguliert wird.

Durch die direkte Bindung an mRNA und Nukleoporine, sowie das Hin- und Herpendeln zwischen Zellkern und Zytoplasma besitzt der Mex67p-Mtr2p-Komplex die wichtigen Eigenschaften eines Exportfaktors (siehe Einleitung 1.2 u. 1.3). Daher ist es naheliegend, daß die Translokation des mRNP-Partikels durch die Kernpore vom Mex67p-Mtr2p-Komplex bewerkstelligt wird.

Unterstützt wird dieses Modell durch die Ergebnisse in höheren eukaryontischen Zellen. Mex67p und das menschliche Homolog TAP (Grüter et al., 1998; Kang und Cullen., 1999) besitzen eine evolutionär konservierte Aminosäuresequenz und gehören zu der NXF1 Proteinfamilie (Nuklear Export Faktor) (Segref et al. 1997; Katahira et al., 1999; Herold et al., 2000). Mtr2p besitzt zwar kein Homolog in höheren Zellen, jedoch ist es wahrscheinlich, daß NXT1 (p15) eine ähnliche zelluläre Funktion ausübt, da die Expression des heterodimeren TAP-NXT1-Komplexes in *S. cerevisiae* die letale *mtr2* und *mex67* Disruption teilweise komplementiert (Katahira et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, daß das menschliche NXF1 (TAP) und NXF1 aus *C. elegans* direkt beim Export zellulärer mRNA beteiligt sind (Tan et al., 2000; Braun et al., 2001; Levesque et al., 2001). TAP bindet an mRNA (Katahira et al., 1999; Braun et al., 1999; Tan et al., 2000;

Levesque et al., 2001), zeigt *in vivo* eine nukleäre und Kernporenassoziierte Lokalisation (Bear et al., 1999; Katahira et al., 1999; Bachi et al., 2000; Tan et al., 2000; Levesque et al., 2001) und besitzt die Fähigkeit zwischen Kern und Zytoplasma hin- und herzubewegen (Katahira et al., 1999; Bachi et al., 2000; Kang und Cullen, 1999; Bear et al., 1999; Tan et al., 2000; Schmitt und Gerace, 2001). Analog zu Mtr2p und Mex67p wurde gefunden, daß auch NXT1 an die M-Domäne von TAP bindet (Katahira et al., 1999; Braun et al., 1999; Kang et al., 2000; Suyama et al., 2000; Fribourg et al., 2001; Guzik et al., 2001) und daß die Coexpression von NXT1 den TAP vermittelten RNA-Export stimuliert (Herold et al., 2000; Guzik et al., 2001; Braun et al., 2001; Levesque et al., 2001). Diese Stimulation kann durch die erhöhte Affinität des TAP-NXT1-Komplexes zu Nukleoporinen erklärt werden (Levesque et al., 2001). Röntgenstrukturanalyse der M-Domäne von TAP und NXT1 ergab, daß beide Proteine eine NTF2 ähnliche Domäne bzw. Gesamtstruktur besitzen, welche eine Heterodimerisierung, analog der NTF2 Dimerisierung, erlaubt (Fribourg et al., 2001; siehe Abb. 3). Wie in NTF2 existiert in der TAP M-Domäne eine Bindungstasche, welche die Interaktion mit FG-Repeats erlaubt. Wichtige Unterschiede zu NTF2 sind die Unfähigkeit einer Homodimerisierung von TAP und einer Interaktion von TAP mit RanGTP oder RanGDP. Umstritten ist jedoch eine Interaktion zwischen NXT1 und RanGTP. So beobachteten Black et al (1999, 2001) eine Bindung zwischen NXT1 und RanGTP und eine Stimulierung des NES-vermittelten Exports durch NXT1. Diese Resultate konnten jedoch bisher von keinem anderen Labor bestätigt werden und stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen von Herold et al (2000) und Schmitt und Gerace (2001).

Die Interaktion des TAP-NXT1-Komplexes mit den Nukleoporinen erfolgt nicht nur über die M-Domäne von TAP. So wurde eine direkte Interaktion zwischen NXT1 und dem Nukleoporin p62 beobachtet, die durch die Komplexbildung zwischen TAP und NXT1 zusätzlich stimuliert wurde (Levesque et al., 2001). Weiter gibt es Ergebnisse, die zeigen, daß die C-Domäne von TAP direkt mit FG-Repeats interagiert (Katahira et al., 1999; Braun et al., 1999; Tan et al., 2000; Bachi et al., 2000; Suyama et al., 2000; Schmitt und Gerace, 2001). Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, daß die M- und C-Domäne von Mex67p/TAP synergistisch mit FG-



Repeats interagieren oder es existieren zwei unabhängige Mechanismen, die eventuell unterschiedlich reguliert werden. Aufgrund der Bildung eines RNA-TAP-NXT1-p62-Komplexes kann ausgeschlossen werden, daß NXT1 den Reimport von TAP vermittelt (Levesque et al., 2001). Dieser Reimport erfolgt über Transportin

(Bachi et al., 2000), ein Mitglied der Importin -Proteinfamilie (siehe Einleitung 1.2 u. 1.3). Während die primäre Funktion von Mex67p/TAP in der Bindung der mRNA an die Kernpore liegt, scheint die Rolle von Mtr2p/NXF1 in der Regulation der Nukleoporinbindung zu liegen. Der Mechanismus und die Regulation ist jedoch bisher noch unverstanden. Auch ist bisher nicht zweifelsfrei geklärt, ob NXT1 noch bei anderen Exportprozessen beteiligt ist (siehe Ossareh-Nazari et al., 2000).

### **1.5.5 Der Mex67p-Mtr2p vermittelte mRNA-Export ist an den Spleißprozess gekoppelt**

Durch die genetische Analyse der N-terminalen Domäne und die biochemische Reinigung von Mex67p wurde Yra1p als direkter Interaktionspartner identifiziert (Sträßer und Hurt, 2000; Stutz et al., 2000). Das essentielle nukleäre Yra1p (Portman et al., 1997) interagiert sowohl genetisch als auch direkt *in vivo* und *in vitro* mit Mex67p (Sträßer und Hurt, 2000; Stutz et al., 2000; Zenklusen et al., 2001). Aufgrund der Eigenschaften von Yra1p und homologer Proteine wurde diese Proteinfamilie REF genannt (RNA und Exportfaktor bindende Proteine) (Stutz et al., 2000). Auch Yra1p/REF spielt eine essentielle Rolle im mRNA-Export, ist jedoch in der Lage, RNA effizienter als Mex67p/TAP zu binden (Sträßer und Hurt, 2000; Stutz et al., 2000; Zenklusen et al., 2001; Zhou et al., 2000; Rodrigues et al., 2001). Daher könnte die Rolle von Yra1p/REF darin liegen, die Bindung zwischen mRNA und dem Exportfaktor Mex67p/TAP zu vermitteln. Interessanterweise wurde REF auch im Spleißosomkomplex und als Komponente des Exon-Exon-Komplexes (Le Hir et al., 2000a; 2000b) gefunden. Durch die Forschung von Zhou et al (2000) konnte gezeigt werden, daß REF während des Spleißprozesses an den mRNP-Komplex bindet. Diese Bindung von REF an die gespleißte mRNA wird über den Spleißfaktor Sub2p/UAP56 vermittelt (Luo et al., 2001; Sträßer und Hurt, 2001). Weiter konnte gezeigt werden, daß mRNA effizienter exportiert wird, wenn diese vorher gespleißt wurde im Vergleich zur gleichen mRNA ohne Intron (Zhou et al., 2000; siehe auch Luo und Reed, 1999; Huang und Steitz, 2001). Hervorzuheben ist hierbei, daß REF nur im

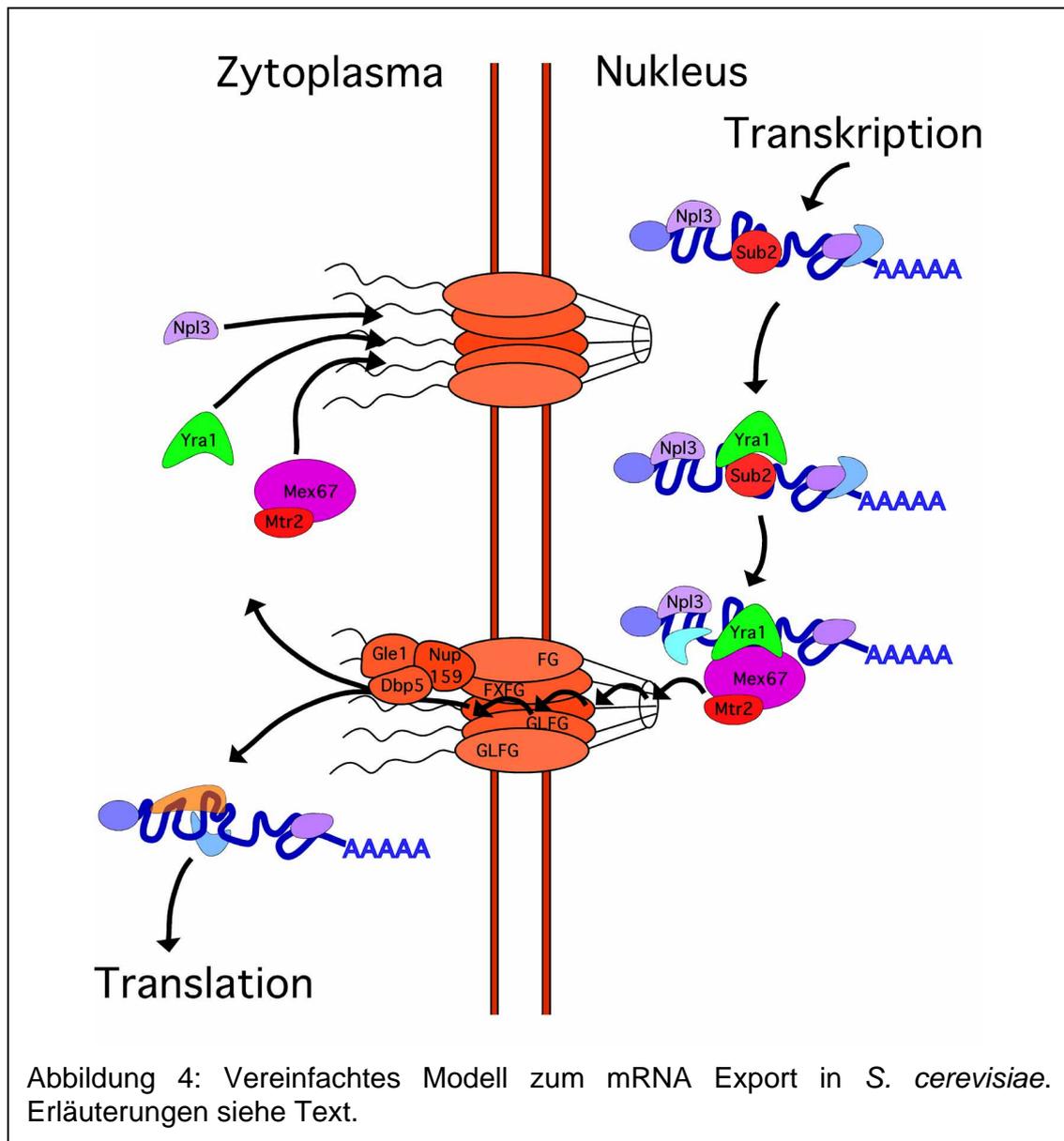
Komplex mit der mRNA gefunden wurde, die zuvor gespleißt wurde, während dagegen hnRNP A1 in beiden mRNP-Komplexen nachgewiesen werden konnte (Zhou et al., 2000; Le Hir et al., 2001). Jedoch ist zu beachten, daß die Überexpression von REF den Export sowohl gespleißter als auch intronloser mRNA stimuliert (Zhou et al., 2000; Rodrigues et al., 2001). Unterstützt wird eine Funktion im Export von intronloser als auch intronhaltiger mRNA durch die Beobachtung in *S. cerevisiae*, daß *sub2* Mutanten im Gegensatz zu anderen Spleißkomponenten Defekte im Export beider mRNA-Arten besitzen (Sträßler und Hurt., 2001; Jensen et al., 2001).

Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, daß sowohl intronhaltige als auch intronlose mRNAs über die gleiche evolutionär konservierte Exportmaschinerie ins Zytoplasma transportiert werden (siehe Reed und Magni, 2001), wobei vermutlich gespleißte mRNA bevorzugt exportiert wird.

Viren, die zur ihrer Replikation auch ungespleißte RNA exportieren müssen, brauchen einen anderen Exportmechanismus, weil erstens intronhaltige mRNA normalerweise im Kern zurückgehalten wird und zweitens nicht exportkompetent ist, da REF über den Spleißprozess zur mRNA dirigiert wird. Daher muss der Export viraler RNA über andere Exportwege erfolgen. Der Rev/Crm1p vermittelte Export von ungespleißter mRNA des HIV Virus wurde bereits in Kapitel 1.5.3 angesprochen. Andere Viren, wie z.B. der Mason-Pfizer Affen Virus besitzen in ihrem Intron ein sogenanntes CTE Motiv (Constitutives Transport Element), welches mit hoher Affinität direkt an die N-Domäne des mRNA-Exportfaktors TAP bindet (Grüter et al., 1999; Kang et al., 2000; Bachi et al., 1999; Braun et al., 1999; Liker et al., 2000) und damit die Regulierung über die Spleißmaschinerie und REF umgeht. Es konnte gezeigt werden, daß REF den Export zellulärer mRNA stimuliert, nicht jedoch den Export CTE enthaltender RNA (Rodrigues et al., 2001). Daraus kann gefolgert werden, daß die virale RNA durch einen anderen Mechanismus zum Exportfaktor TAP dirigiert wird. Der eigentliche Export durch TAP erfolgt jedoch analog dem Export zellulärer mRNA.

### 1.5.6 Modell des mRNA-Exportes in *S. cerevisiae*

Während der Synthese der mRNA im Zellkern binden hnRNP-Proteine an die mRNA und bilden das hnRNP-Partikel. Nach erfolgter 5'-Verknüpfung mit der m<sup>7</sup>G-Kappe und 3'-Polyadenylierung, sowie dem Spleißen intronhaltiger mRNA ist das mRNP-Partikel bereit für den Export ins Zytoplasma. Es konnte gezeigt werden, daß der mRNA-Exportfaktor Sub2p über den Spleißprozess zum mRNP-Komplex dirigiert wird. Da Sub2p auch essentiell für den Export intronloser mRNA



ist, existieren wahrscheinlich noch weitere Mechanismen um Sub2p zur mRNA zu lotsen. Über die Interaktion zu Sub2p wird dann der Exportfaktor Yra1p zur mRNA-Komplex rekrutiert. Yra1p vermittelt die Interaktion des mRNA-Partikels zum Mex67p-Mtr2p-Komplex. Durch die Bindung von Mex67p an Yra1p wird Sub2p von der mRNA freigesetzt. Anschließend wird das mRNA-Partikel über den Mex67p/Mtr2p Komplex zur Kernpore transportiert. Aufgrund multipler Interaktionen des Mex67p-Mtr2p-Komplexes mit den FG-Repeats verschiedener Nukleoporine erfolgt die Translokation des mRNA-Partikels durch die Kernpore. Auf der zytoplasmatischen Seite der Kernpore erfolgt die Termination durch den Nup159p-Gle1p-Dbp5p Komplex. Möglicherweise erfolgt dieser Schritt durch die Dissoziation des Mex67p-Yra1p-mRNA-Komplexes. Ein solcher Mechanismus wird durch die direkte Bindung zwischen Dbp5p und Yra1p nahe gelegt. Die mit der mRNA, exportierten Proteine und Transportfaktoren werden in den Zellkern reimportiert, während die mRNA durch die Bindung von Ribosomen und der Initiation der Translation im Zytoplasma zurückgehalten wird.

## 1.6 Export von Ribosomen

Vergleichbar mit dem Export der mRNA wird auch die ribosomale RNA als RNP-Komplex (Ribonucleoproteinpartikel) exportiert. Der Export der 40S und 60S ribosomalen Untereinheiten erfolgt vermutlich getrennt (Warner, 1990). Die 40S Untereinheit aus *S. cerevisiae* besteht aus der 18S RNA und 32 ribosomalen Proteinen, die 60S Untereinheit aus der 5S, 5.8S und 25S RNA sowie 45 ribosomalen Proteinen. Die Biogenese der Ribosomen erfolgt im Nukleolus, hier wird die rRNA synthetisiert und assembliert mit ribosomalen sowie nicht-ribosomalen Proteinen. Anschließend erfolgt eine Reihe von RNA-Prozessierungsschritten (siehe Abb. 5), bevor die ribosomalen Untereinheiten exportiert werden. Durch hauptsächlich genetische Ansätze wurden bisher über 60 nichtribosomale Proteine identifiziert, die bei der ribosomalen Biogenese beteiligt sind, darunter

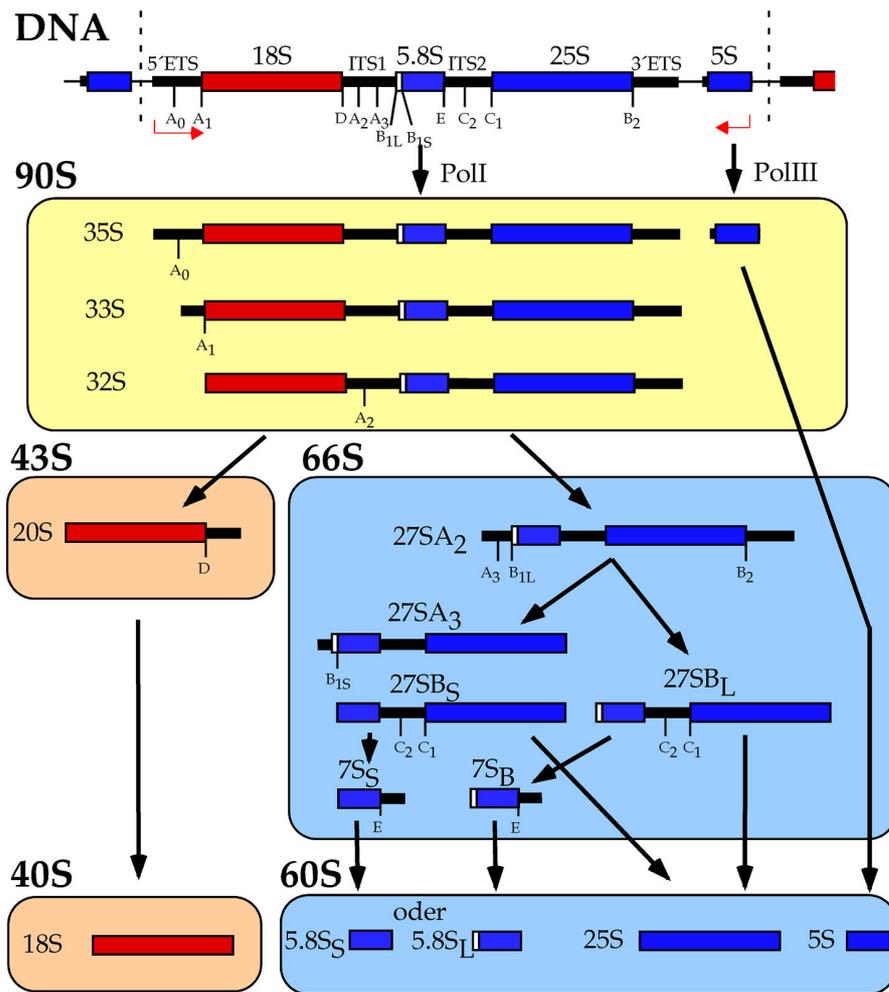


Abbildung 5: Vereinfachtes Modell zur rRNA-Prozessierung in *S. cerevisiae*. Die rDNA liegt in 100 bis 200 facher Kopienzahl vor. Die Synthese der prä 5S rRNA erfolgt durch Polymerase III, gefolgt von einem 3'-Prozessierungsschritt. Dagegen beginnt die Biosynthese der 5.8S, 25S und 18S rRNA mit der Transkription eines gemeinsamen 35S Precursors durch Polymerase I. Die 35S rRNA besteht aus der 5.8S, 25S und 18 rRNA und den externen bzw. internen transkribierten Spacerregionen (ETS, ITS). Die weiteren Prozessierungsschritte A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub> erfolgen innerhalb des 90S Komplexes. Danach wird die 32S rRNA an A<sub>2</sub> geschnitten und der 90S Komplex teilt sich in den 43S Komplex mit der 20S rRNA und den 66S Komplex mit der 27SA<sub>2</sub> rRNA. Durch die Prozessierung der 20S rRNA an der D Schnittstelle wird die reife 18S rRNA erhalten. Die weitere Prozessierung der 27SA<sub>2</sub> rRNA erfolgt über zwei alternative Wege: Etwa 85 % wird an der A<sub>3</sub> und B<sub>2</sub> Stelle, gefolgt von B<sub>1L</sub> prozessiert, während die restliche 27SA<sub>2</sub> rRNA an der B<sub>1S</sub> und B<sub>2</sub> Stelle geschnitten wird. In beiden Fällen erfolgt abschließend Prozessierung an der C<sub>2</sub> C<sub>1</sub> und E Position. Die daraus resultierende reife 60S Untereinheit enthält 5.8S, 25S und 5S<sub>L</sub> bzw 5S<sub>S</sub> rRNA. Für eine detailliertere Beschreibung siehe Kressler et al., 1999; Venema und Tollervey, 1999; Lafontaine und Tollervey 2001.

RNA-modifizierende Proteine, Endonukleasen, Exonukleasen, RNA-Helikasen und Proteine, welche mit der snoRNA assemblieren. Übersichtartikel zur Ribosomenbiogenese siehe Kressler et al (1999), Venema und Tollervey (1999), Lafontaine und Tollervey (2001).

Über den eigentlichen Export der Ribosomen ist bis heute sehr wenig bekannt. Um die Faktoren zu identifizieren, welche bei diesen Prozessen beteiligt sind, wurden zunächst Methoden entwickelt, um den ribosomalen Export verfolgen zu können. Für den Export der 60S Untereinheit wurde dieses Ziel durch die Verwendung des Rpl25p-eGFP Fusionsproteins erreicht (Hurt et al., 1999). Dieses Fusionsprotein wird anstelle des Rpl25p in die große ribosomale Untereinheit eingebaut und kann daher als visueller Marker für das 60S Partikel benutzt werden. Um den Export der kleinen Untereinheit zu verfolgen, wurde ein *in situ* Hybridisierungsverfahren gegen die 5'ITS (Interne transkriptierte Spacerregion) der 18S rRNA benutzt (Moy und Silver, 1999). Es wurde hierbei festgestellt, daß der Export beider Partikel durch Defekte im Ran-Zyklus und Mutationen in bestimmten Nukleoporinen beeinträchtigt wird (Hurt et al., 1999; Moy und Silver, 1999; Stage-Zimmermann et al., 2000). Um neue Faktoren zu identifizieren, wurde mit Hilfe des Rpl25p-eGFP Markers eine Kollektion von temperatursensitiven Hefestämmen auf Defekte im ribosomalen Export untersucht (Gadal et al., 2001a; Gadal et al., 2001b, Milkereit et al., 2001). Hierbei wurden eine Reihe von Rix Faktoren (Ribosomen Export) isoliert und charakterisiert, welche bei der Biogenese und/oder dem Export der 60S Untereinheit beteiligt sind. So wurden eine Reihe von Faktoren identifiziert, die beim intranukleären Transport des 60S prä-ribosomalen Partikels (Noc1p, Noc2p/Rix3p und Noc3p; Milkereit et al., 2001) oder bei einem späten Schritt der Biogenese (Rix7p; Gadal et al., 2001a; Rix9p/Rpl7p; O. Gadal et al., submitted) beteiligt sind. Einer der isolierten Faktoren, Rix5p, ist identisch mit Rpl10p, einem ribosomalen Protein der 60S Untereinheit. Es konnte gezeigt werden, daß Rpl10p mit Nmd3p interagiert, das über eine NES Sequenz an den Exportfaktor Xpo1p bindet (Ho et al., 2000; Gadal et al., 2001b). Daher kann angenommen werden, daß der ribosomale 60S Export über den trimeren Xpo1p-RanGTP-Nmd3p-Komplex vermittelt und reguliert wird. Offen bleibt jedoch die Frage, ob dieser Mechanismus ausreicht das große 60S

Partikel durch die Pore zu transportieren. Eventuell werden ATPasen und / oder GTPasen benötigt, um zusätzlich Energie zur Verfügung zu stellen, oder um Konformationsänderungen zu induzieren, die eine Translokation durch die Kernpore begünstigen. Die Erforschung und Charakterisierung des ribosomalen Exportes befindet sich erst am Anfang. Um zu verstehen, wie Ribosomen exportiert werden und welche Signale und Konformationsänderungen für die Translokation benötigt werden, müssen noch eine Reihe von Faktoren identifiziert werden, die beim Export des 60S und 40S Partikels beteiligt sind.

## 2. Aufgabenstellung

Der Export von rRNA, mRNA und tRNA aus dem Zellkern ins Zytoplasma ist essentiell für die Genexpression bei eukaryontischen Zellen.

Einer der essentiellen mRNA-Exportfaktoren ist Mtr2p, der zuerst in einem Screen für mRNA-Exportmutanten gefunden wurde (Kadowaki et al., 1994b). Später wurde Mtr2p in einem high copy suppressor Screen mit dem ts5 Allel des mRNA-Exportfaktors Mex67p gefunden (Santos-Rosa et al., 1998). Weitere Untersuchungen zeigten, daß Mtr2p und Mex67p einen heterodimeren Komplex bilden (Santos-Rosa et al., 1998). Dabei lokalisiert der Mex67p-Mtr2p-Komplex an der Kernpore (Santos-Rosa et al., 1998) und interagiert sowohl genetisch als auch biochemisch mit Nukleoporinen (Sträßer et al., 2000). Somit deuteten alle Ergebnisse daraufhin, daß der heterodimere Mex67p-Mtr2p-Komplex der zentrale mRNA-Exportrezeptor ist, der die Translokation des mRNP-Partikels durch die Kernpore vermittelt.

Die genaue Funktion von Mtr2p in diesem Prozess war aber unklar. Daher war es Ziel meiner Arbeit, die genaue Rolle von Mtr2p zu erforschen. Deshalb sollte die temperatursensitive *mtr2-33* Mutante näher charakterisiert werden. Mir fiel auf, daß, im Gegensatz zu allen bisher bekannten *mtr2* Mutanten, diese *mtr2-33* Mutante keinen mRNA-Exportdefekt bei restriktiver Temperatur aufweist. Dieser unerwartete Phänotyp warf die Frage auf, welcher nukleozytoplasmatische Prozess in *mtr2-33* Zellen beeinträchtigt ist.

Durch synthetisch letale (sl) Screens ausgehend von der *mtr2-33* Mutante sollten Faktoren identifiziert werden, welche bei der neuartigen Funktion von Mtr2p beteiligt sind. Über die genetische und funktionelle Charakterisierung dieser Faktoren, sowie deren biochemische Reinigung aus *S. cerevisiae*, sollte die neuartige Funktion von Mtr2p gefunden werden.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Mtr2p und Ecm1p sind am Export von 60S Prä-Ribosomen beteiligt

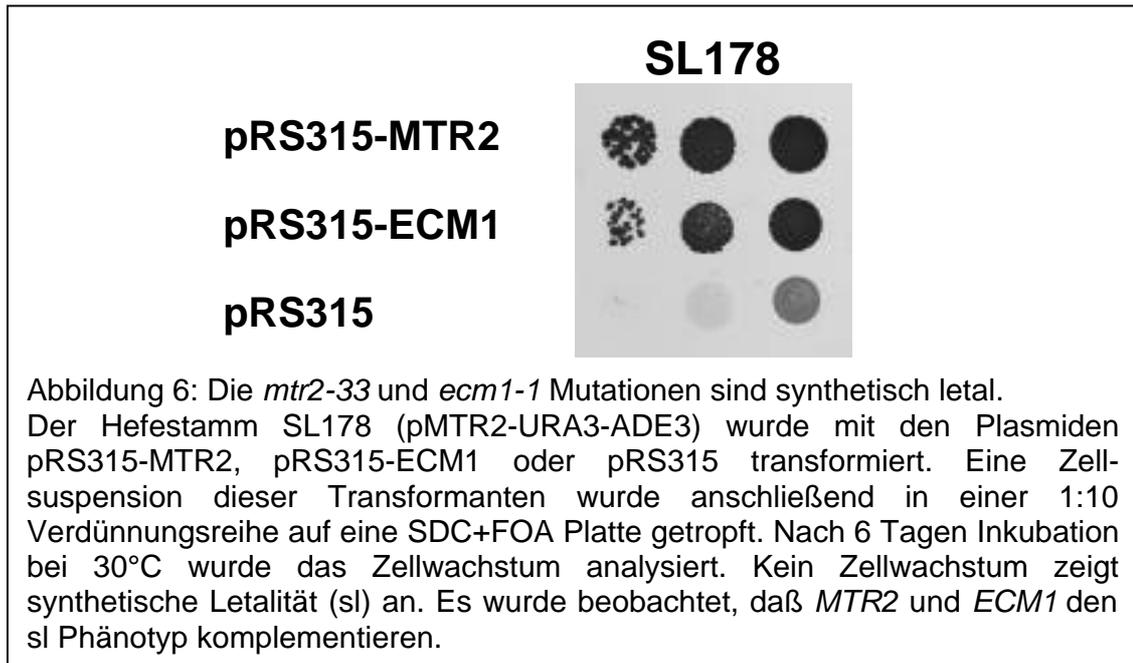
#### 3.1.1 *mtr2-33*, eine ungewöhnliche *mtr2* Mutante

Der heterodimere Komplex der beiden mRNA-Exportfaktoren Mtr2p und Mex67p vermittelt die Translokation des mRNP-Partikels durch die Kernpore.

Übereinstimmend zu diesem Modell zeigen alle bisher charakterisierten temperatursensitiven (ts) *mtr2* Mutanten einen starken Defekt beim Export von Poly(A)<sup>+</sup> RNA (Kadowaki et al.; 1994b; Santos-Rosa et al., 1998). Dieser Defekt lässt sich bereits nach wenigen Minuten Inkubation bei restriktiver Temperatur beobachten. Jedoch gab es eine temperatursensitive *mtr2* Mutante (E106G, R109G), die nicht in dieses Bild passt, da *mtr2-33* Zellen überraschenderweise keinen mRNA-Exportdefekt bei restriktiver Temperatur zeigen (siehe Ergebnisse 3.1.2; Abb. 11).

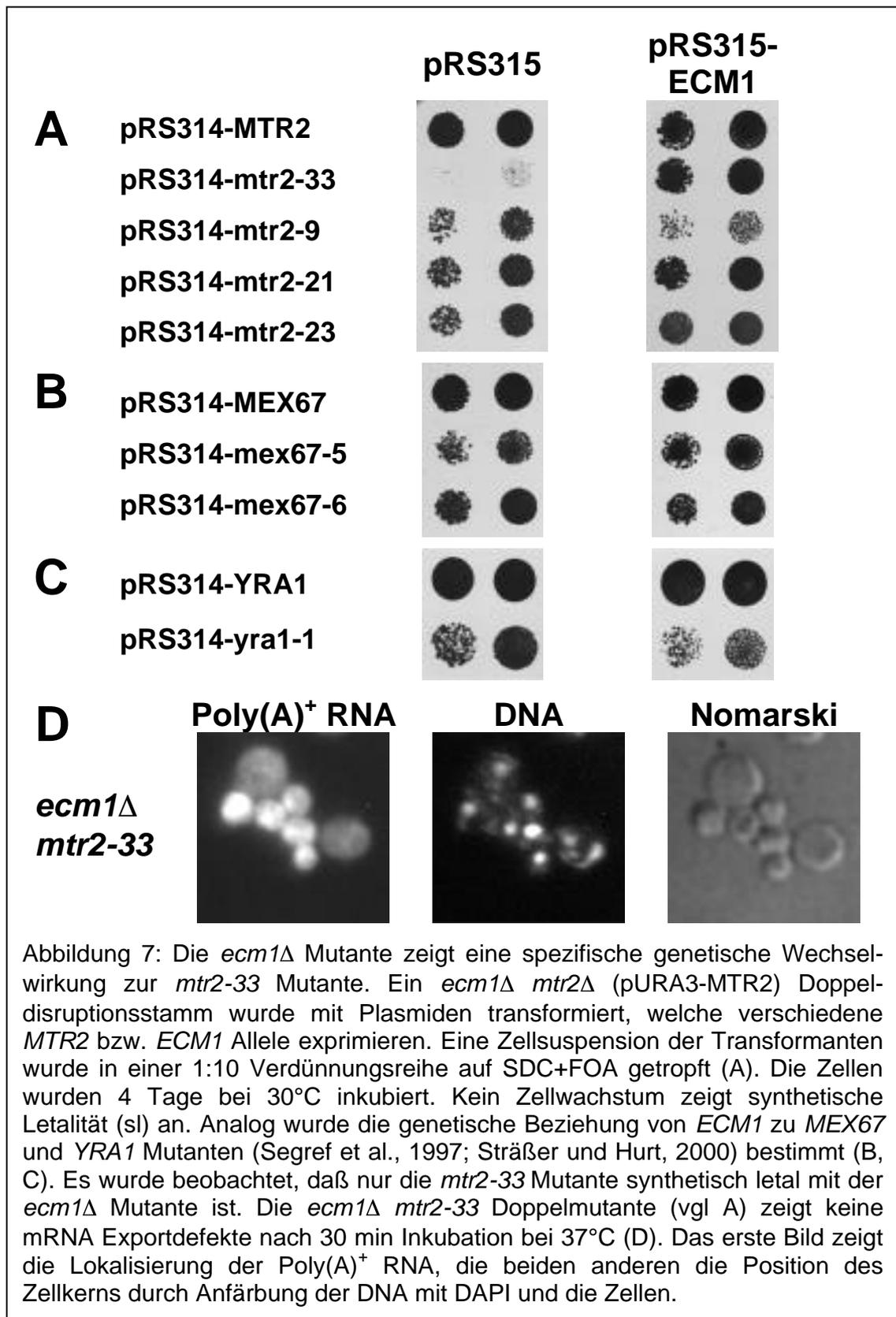
Um die unbekannt Funktion von Mtr2p, die offensichtlich in der *mtr2-33* Mutante beeinträchtigt ist, aufzuklären, wurde mit diesem Allel ein genetischer Screen (siehe Wimmer et al., 1992; Doye und Hurt, 1995) durchgeführt. Der Screen basiert auf dem Phänomen der synthetischen Letalität. Diese bezeichnet den Zelltod aufgrund der Kombination zweier nicht letaler Mutationen. Synthetische Letalität beobachtet man z.B. bei biochemisch direkt interagierenden Proteinen. Während die Mutation der jeweiligen Interaktionsdomäne alleine noch lebensfähig ist, führt die Kombination zum Verlust der Protein-Protein-Wechselwirkung und somit zur Letalität. Die si-Beziehung zwischen zwei Genen kann auch bei nicht direkt interagierenden Proteinen beobachtet werden, wenn diese Proteine funktionell überlappen.

Im Screen mit der *mtr2-33* Mutante wurden ca. 30.000 Kolonien auf einen si-Phänotyp, rote Kolonienfarbe und Nichtwachstum auf SDC+FOA (siehe Material und Methoden 5.2.3, Abb. 23), gesichtet. Hierbei wurde SL178 isoliert (Abb. 6).



Um das Gen zu bestimmen, dessen Mutation den sl-Phänotyp verursacht, wurde SL178 mit einer genomischen Hefebibliothek transformiert. Die Plasmide, welche den sl Phänotyp (rote Kolonienfarbe und Nichtwachstum auf SDC+FOA) komplementierten, wurden isoliert und sequenziert. Für SL178 wurde *ECM1* als komplementierendes Gen identifiziert. Wird SL178 mit einem *MTR2*- oder *ECM1*-Plasmid transformiert, dann sektoriert dieser Stamm wieder und wächst auf 5'-FOA-haltigen Medium (Abb. 6). Dass es sich hier um Komplementation und nicht um Suppression handelt, konnte durch Integration des *ECM1* Wildtypgens in den SL178 Stamm gezeigt werden. Dadurch wurde das mutierte genomische *ecm1-1* Gen durch das *ECM1* Wildtypgen ersetzt, was ebenfalls die Komplementation des sl-Phänotypes zur Folge hatte (eigene unveröffentlichte Daten).

Um die genetische Beziehung zwischen *MTR2* und dem nichtessentiellen *ECM1* unabhängig zu verifizieren, wurde ein Doppeldisruptionsstamm (*mtr2* $\Delta$ , *ecm1* $\Delta$ , pURA3-MTR2) hergestellt (siehe Material und Methoden 5.2.3) und mit verschiedenen *MTR2* Allelen transformiert. Anschließend wurde das Wachstum dieser Transformanten auf SDC+FOA analysiert (Abb. 7). Es wurde beobachtet, daß nur die *mtr2-33* Mutante in Kombination mit der *ecm1* Disruption zu einem letalen (bei 37°C) bzw. extrem kranken Wachstumsphänotyp (bei 23°C, 30°C)



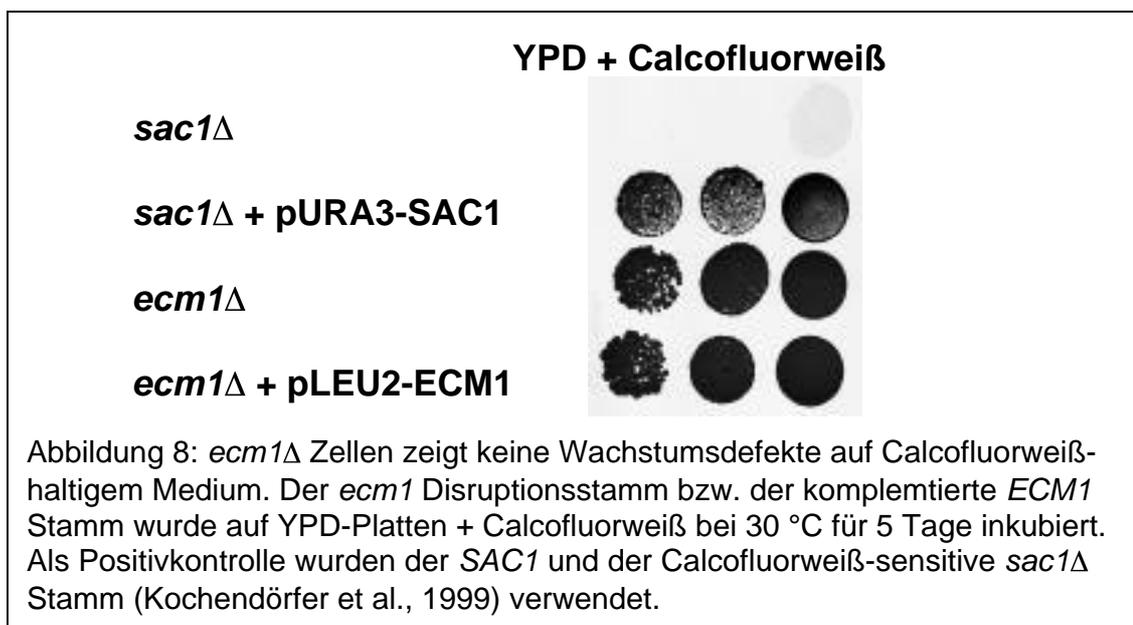
führt. Die übrigen *mtr2* Mutanten besitzen alle einen sehr starken mRNA-Exportdefekt (Santos-Rosa et al., 1998; eigene unveröffentlichte Ergebnisse). Die so gezeigte allelspezifische genetische Beziehung zwischen *mtr2-33* und *ecm1Δ* deutet auf eine funktionelle Verbindung zwischen Mtr2p und Ecm1p.

Ist Ecm1p Teil der mRNA-Exportmaschinerie, oder besitzt es eine davon unabhängige Funktion? Um diese Frage zu beantworten, wurde die genetische Wechselwirkung von *ECM1* zu den mRNA-Exportfaktoren *MEX67* und *YRA1* (siehe Einleitung 1.5.4 und 1.5.5) untersucht (Abb. 7B, C). Die Analyse zeigte keine genetische Wechselwirkung zwischen *ECM1* und *MEX67* oder *YRA1*.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß der langsam wachsende *mtr2-33 ecm1Δ* Stamm keinen mRNA-Exportdefekt aufweist (Abb. 7D). Aus diesen Daten lässt sich schließen, daß Ecm1p nicht am Export von mRNA beteiligt ist.

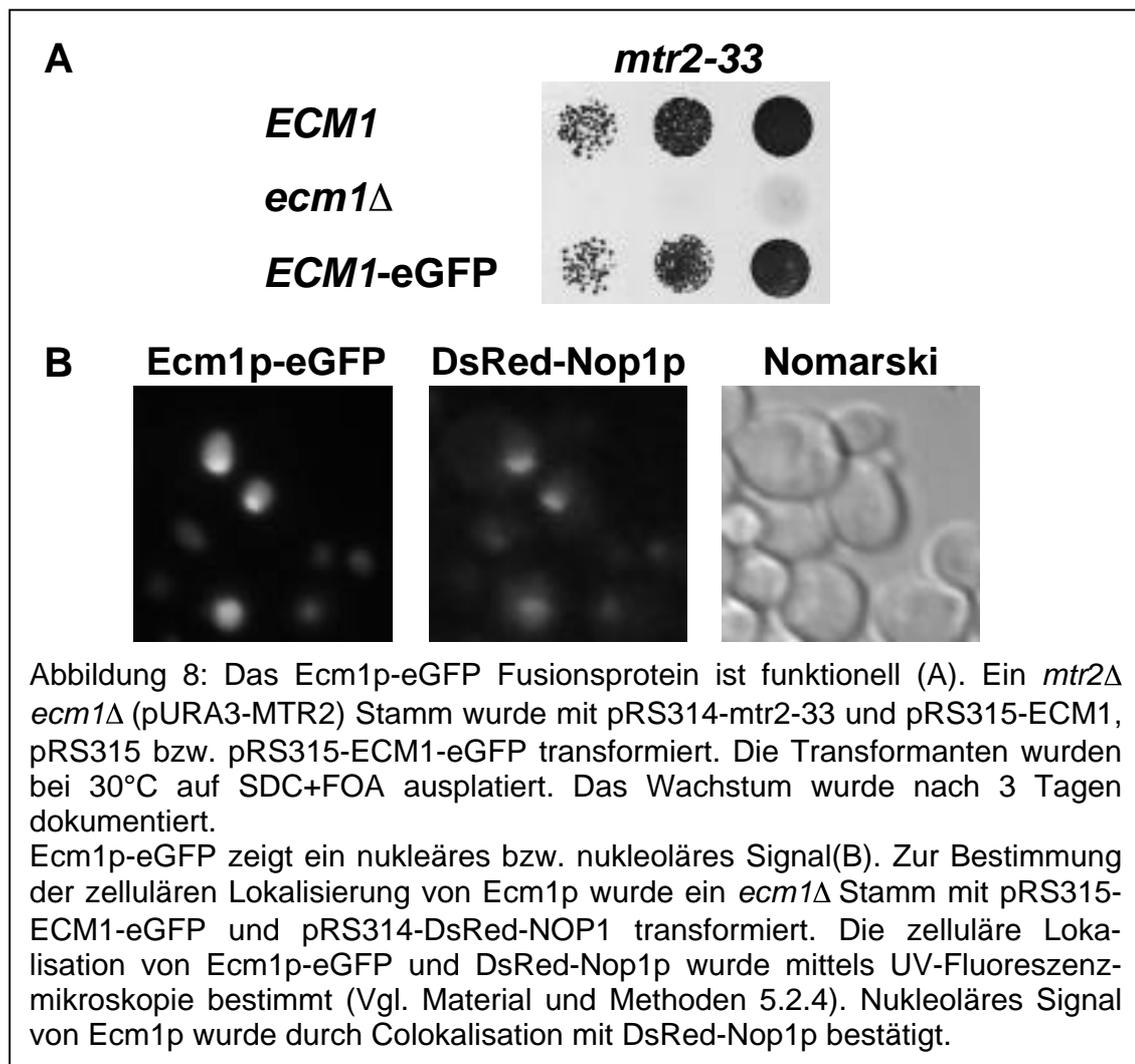
Welche Funktion hat dann Ecm1p? Ecm1p steht für „Extra-Zelluläre-Mutante“ und wurde erstmals in einem Screen für Zellwandbiogenesemutanten gefunden (Lussier et al., 1997). Ein *ecm1* Disruptionsstamm wurde daher als sensitiv gegen Calcofluorweiß beschrieben, das sich in die Zellwand einlagert. Dieser Befund konnte aber von mir nicht reproduziert werden (Abb. 8). Als Positivkontrolle wurde die *sac1Δ* Mutante benutzt (Kochendörfer et al., 1999). (Sac1p ist beteiligt beim ATP-Transport vom Zytoplasma ins Endoplasmatische Retikulum.)

Die Analyse des *ecm1* Disruptionsstammes ergab keinen Wachstumsdefekt



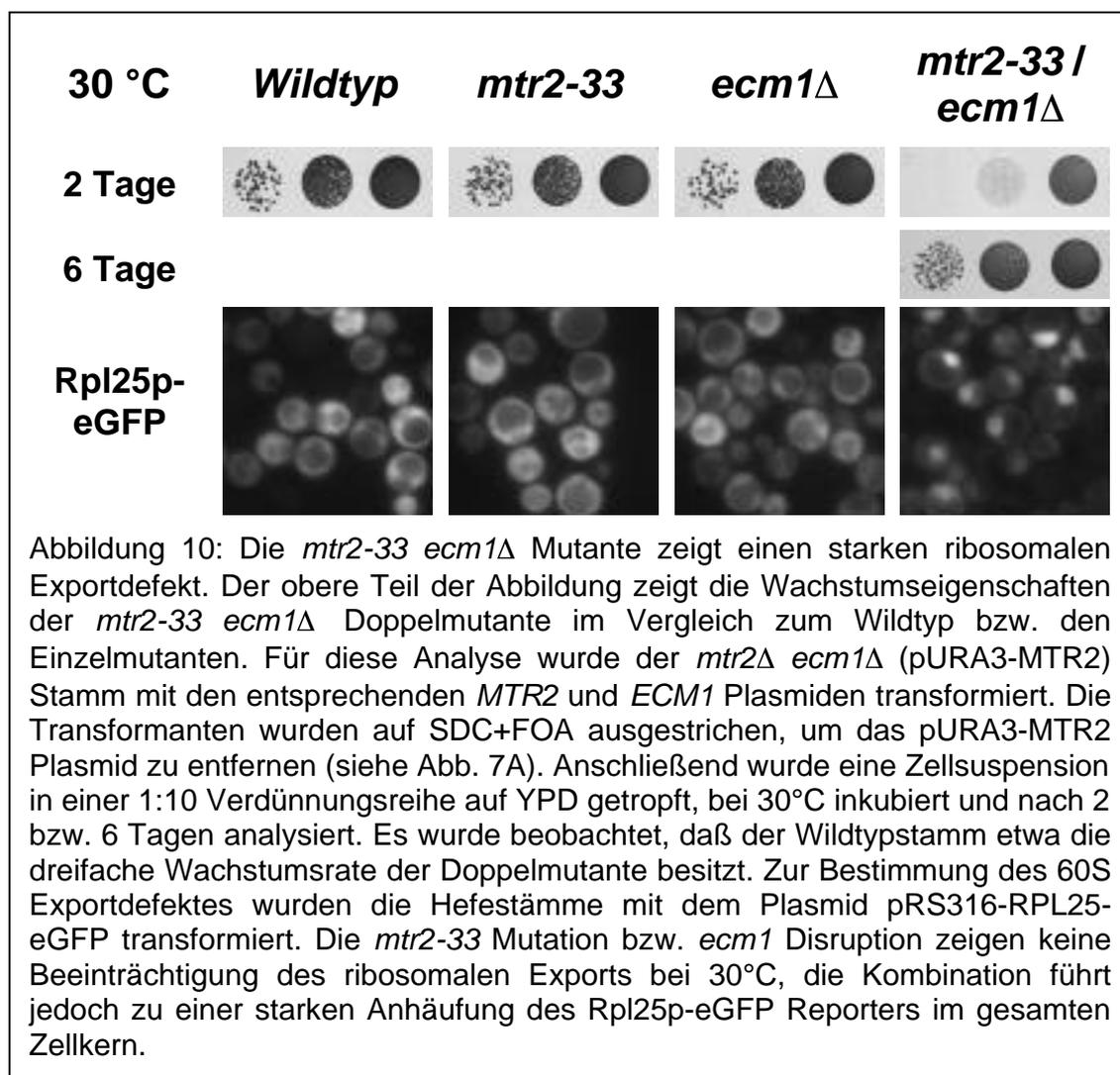
innerhalb des getesteten Temperaturbereichs von 23 °C bis 37°C und erwartungsgemäß keinen mRNA-Exportdefekt in diesem Temperaturbereich.

Um mehr über die Funktion von Ecm1p zu lernen, wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt: über einen weiteren genetischen Screen sollten neue Interaktionspartner identifiziert werden (siehe Ergebnisse 3.2.1), parallel dazu wurde die zelluläre Lokalisation von Ecm1p bestimmt. Hierzu wurde ein Ecm1p-eGFP Fusionsprotein generiert. Dieses eGFP-Funktionsprotein ist funktionell, da es den Wachstumsdefekt der *mtr2-33 ecm1Δ* Mutante komplementiert (Abb. 9A). Die Lokalisation von Ecm1p-eGFP wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie in einem *ecm1* Disruptionsstamm bestimmt. Es wurde beobachtet, daß dieses Fusionsprotein ein nukleäres Signal zeigt (Abb. 9B). Etwa die Hälfte der untersuchten Zellen wiesen außerdem eine signifikante Akkumulierung im Nukleolus auf, was



durch die Coexpression des nukleolären Markers DsRed-Nop1p (Gadal et al., 2001b ) verifiziert wurde (Abb. 9B).

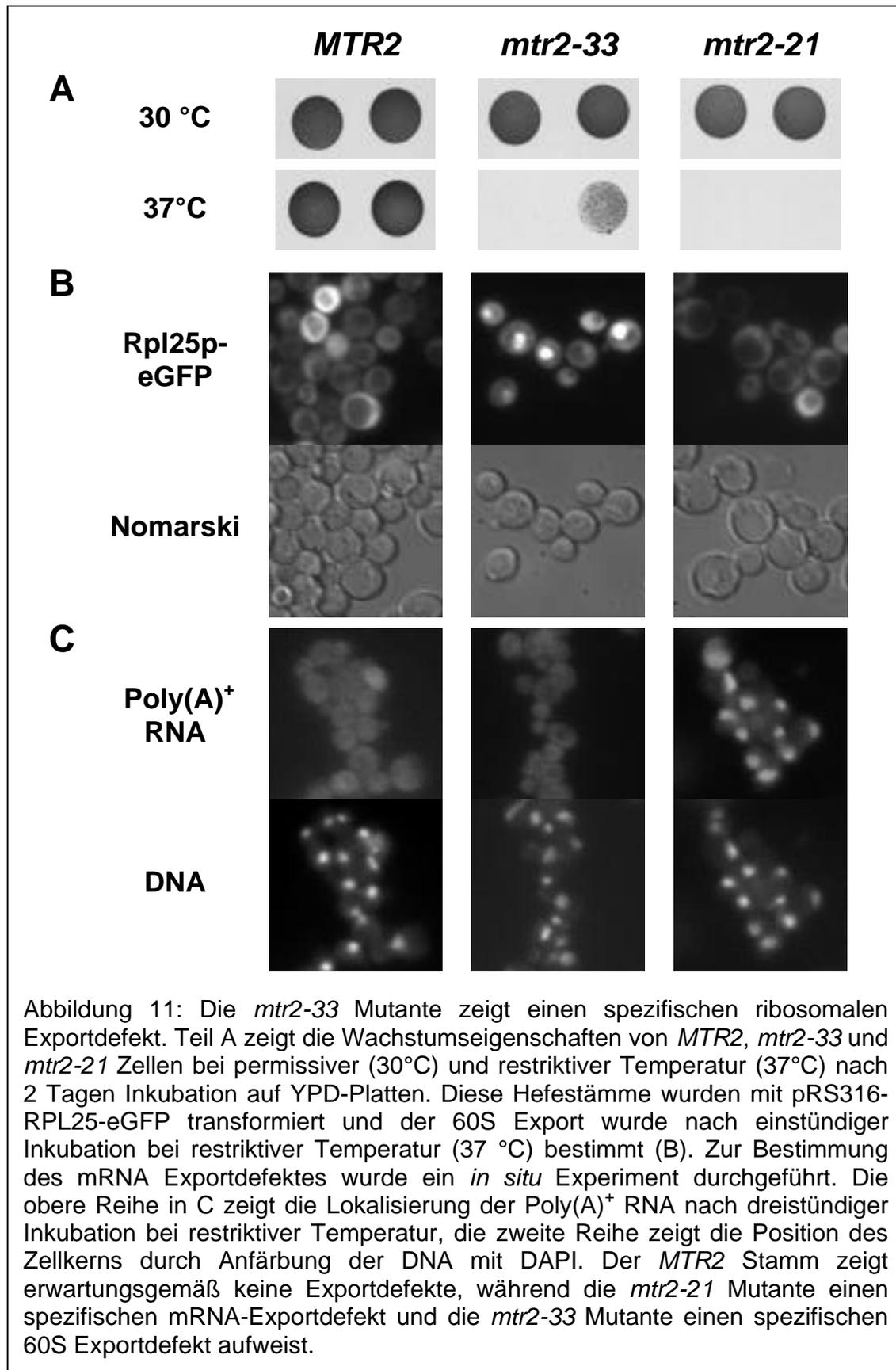
Da im Nukleolus die Ribosomenbiogenese stattfindet, vermutete ich, daß Ecm1p an diesem Prozess beteiligt sein könnte. Um diese Hypothese zu testen, sollte die Lokalisierung des Rpl25p-eGFP-Fusionsproteins in der *mtr2-33 ecm1Δ* Mutante analysiert werden. Das Rpl25p-eGFP-Fusionsprotein wird in die große ribosomale Untereinheit integriert und kann daher als visueller Marker für die 60S Ribosomenbiogenese bzw. den Export benutzt werden (Hurt et al., 1999; Gadal et al., 2000a). Mit diesem *in vivo* Exportassay wurde der 60S Export in der langsamwachsende *mtr2-33 ecm1Δ* Doppelmutante (Abb. 10), sowie den Einzelmutanten und dem Wildtypstamm untersucht. Im Wildtypstamm sowie in den *mtr2-33* und *ecm1Δ*



Einzelmutanten wurde eine zytoplasmatische Verteilung des Rpl25p-eGFP Reporters beobachtet (Abb. 10). Zu beachten ist, daß 30 °C permissive Temperatur für die *mtr2-33* Mutante ist; siehe Ergebnisse 3.1.2. Dagegen zeigte die *mtr2-33 ecm1Δ* Doppelmutante eine sehr starke Anhäufung des Rpl25p-eGFP-Reporters im Zellkern (Abb. 10). Dieses Ergebnis zeigt, daß der Export der 60S Untereinheit stark gestört ist. Um auszuschließen, daß dieser Defekt durch das langsame Wachstum der Mutante verursacht wird, wurde die *scR1Δ* Mutante (Brown et al., 1994) als Negativkontrolle benutzt. Die Deletion des *scR1*-Gens, welches die SRP-RNA kodiert, zeigt einen vergleichbaren Wachstumsphänotyp, jedoch keinen Defekt in der Ribosomenbiogenese (eigene unveröffentlichte Daten). Daraus wurde gefolgert, daß der ribosomale Exportdefekt der 60S Untereinheit spezifisch für die *mtr2-33 ecm1Δ* Doppelmutante auftritt (siehe Diskussion).

### **3.1.2 Die *mtr2-33* Mutante zeigt spezifische Defekte im ribosomalen Export des 60S Partikels**

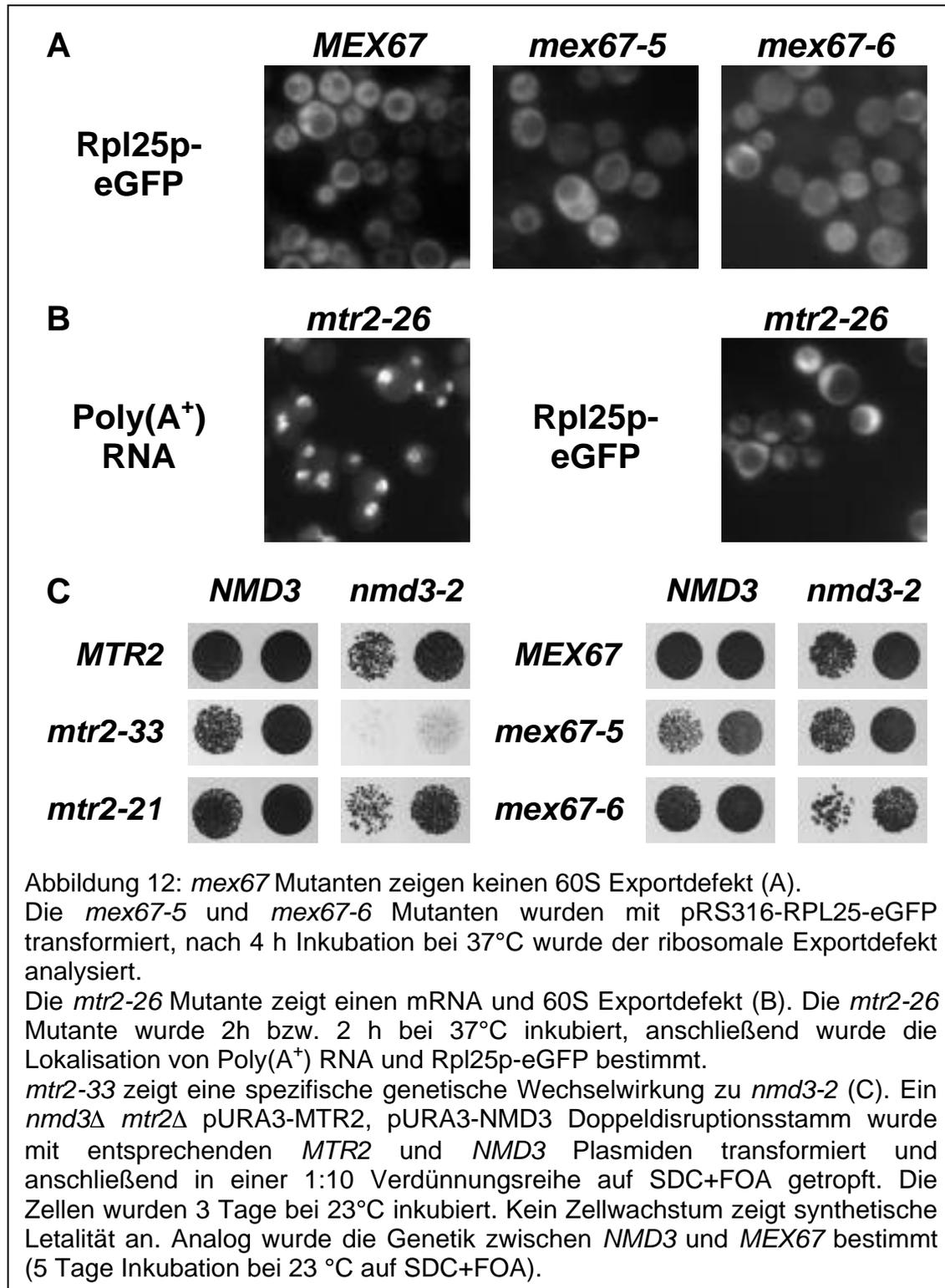
Eine Aufgabenstellung dieser Arbeit war die Charakterisierung der außergewöhnlichen *mtr2-33* Mutante. Nachdem die *mtr2-33 ecm1Δ* Doppelmutante keinen mRNA-, sondern einen starken 60S-Exportdefekt zeigte, vermutete ich, daß bereits in der *mtr2-33* Mutante dieser Prozess gestört ist. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde der ribosomale Export in der *mtr2-33* Mutante bei restriktiver Temperatur untersucht. Als Kontrolle diente die *mtr2-21* Mutante, die einen starken mRNA-Exportdefekt aufweist (Santos-Rosa et al., 1998). Die Wachstumseigenschaften beider Mutanten sind in Abbildung 11A dargestellt. Um den ribosomalen Export der 60S Untereinheit zu analysieren, wurden die Hefestämme mit dem pURA3-RPL25-eGFP Plasmid transformiert (siehe Gadai et al., 2000a; Material und Methoden 5.2.5). Für die verschiedenen *MTR2* Allele wurden folgende Beobachtungen gemacht: In der *mtr2-33* Mutante häuft bereits nach einer Stunde Inkubation bei restriktiver Temperatur der Rpl25p-eGFP-Reporter im



Zellkern an (Abb. 11B). Dagegen wurde in *MTR2* und *mtr2-21* Zellen kein ribosomaler Exportdefekt nachgewiesen (Abb. 11B). Selbst nach dreistündiger Inkubation bei restriktiver Temperatur wurde keine Beeinträchtigung des ribosomalen Exportes in der *mtr2-21* Mutante nachgewiesen. Analysiert man den mRNA-Export durch Poly(A)<sup>+</sup> RNA *in situ* Hybridisierung (Doye et al., 1994; Santos-Rosa et al., 1998) beobachtet man die umgekehrte Situation: In *mtr2-21* Zellen akkumuliert Poly(A)<sup>+</sup> RNA bereits nach 15 Minuten Inkubation bei 37 °C im Zellkern (Santos-Rosa et al., 1998; eigene unveröffentlichte Daten). Dagegen sieht man in *mtr2-33* Zellen selbst nach drei Stunden bei restriktiver Temperatur keinen mRNA-Exportdefekt (Abb. 11C).

Da Mtr2p einen stabilen heterodimeren Komplex mit Mex67p bildet (Santos-Rosa et al., 1998; Sträßer et al., 2000), stellte sich die Frage, ob auch Mex67p beim 60S Export beteiligt ist. Um dies zu testen wurde der ribosomale Export in verschiedenen *mex67* Mutanten (Segref et al., 1997; Sträßer und Hurt, 2000) analysiert. Hierbei wurden keine Defekte beobachtet (Abb. 12A), jedoch ist zu beachten, daß das Rpl25p-eGFP Signal in den *mex67* Mutanten relativ schwach war, vermutlich aufgrund der beeinträchtigten Proteinsynthese als Folge des blockierten mRNA-Exportes. Um zu testen, ob der mRNA-Exportdefekt die Analyse des 60S Exports beeinträchtigt, wurde der Export in *mtr2-26* Zellen (Santos-Rosa et al., 1998) untersucht. Ähnlich *mex67* Mutanten zeigt auch die *mtr2-26* Mutante eine nukleäre mRNA Akkumulation nach 10-15 minütigem Shift zur restriktiven Temperatur (Santos-Rosa et al., 1998). Aufgrund der Beobachtung, daß die *mtr2-26* Mutante sowohl einen mRNA- als auch 60S-Exportdefekt zeigt (Abb. 12B), ist anzunehmen, daß die Beteiligung von Mtr2p im ribosomalen Export der großen Untereinheit unabhängig von Mex67p ist.

Um die Funktion von Mtr2p im ribosomalen Export weiter aufzuklären, wurde die genetische Beziehung zwischen *MTR2* und *NMD3*, dem bereits charakterisierten Exportfaktor der 60S Untereinheit (Ho et al., 2000, Gadai et al., 2001b), getestet. Nmd3p fungiert als Adaptor zwischen dem ribosomalen Protein Rpl10p und dem Exportfaktor Xpo1p und vermittelt somit den Kontakt zwischen dem Exportsubstrat und dem Exportfaktor. Analog zu vorherigen Experimenten wurde die genetische Interaktion in einem Doppeldisruptionsstamm (*mtr2Δ nmd3Δ*, pURA3-MTR2,

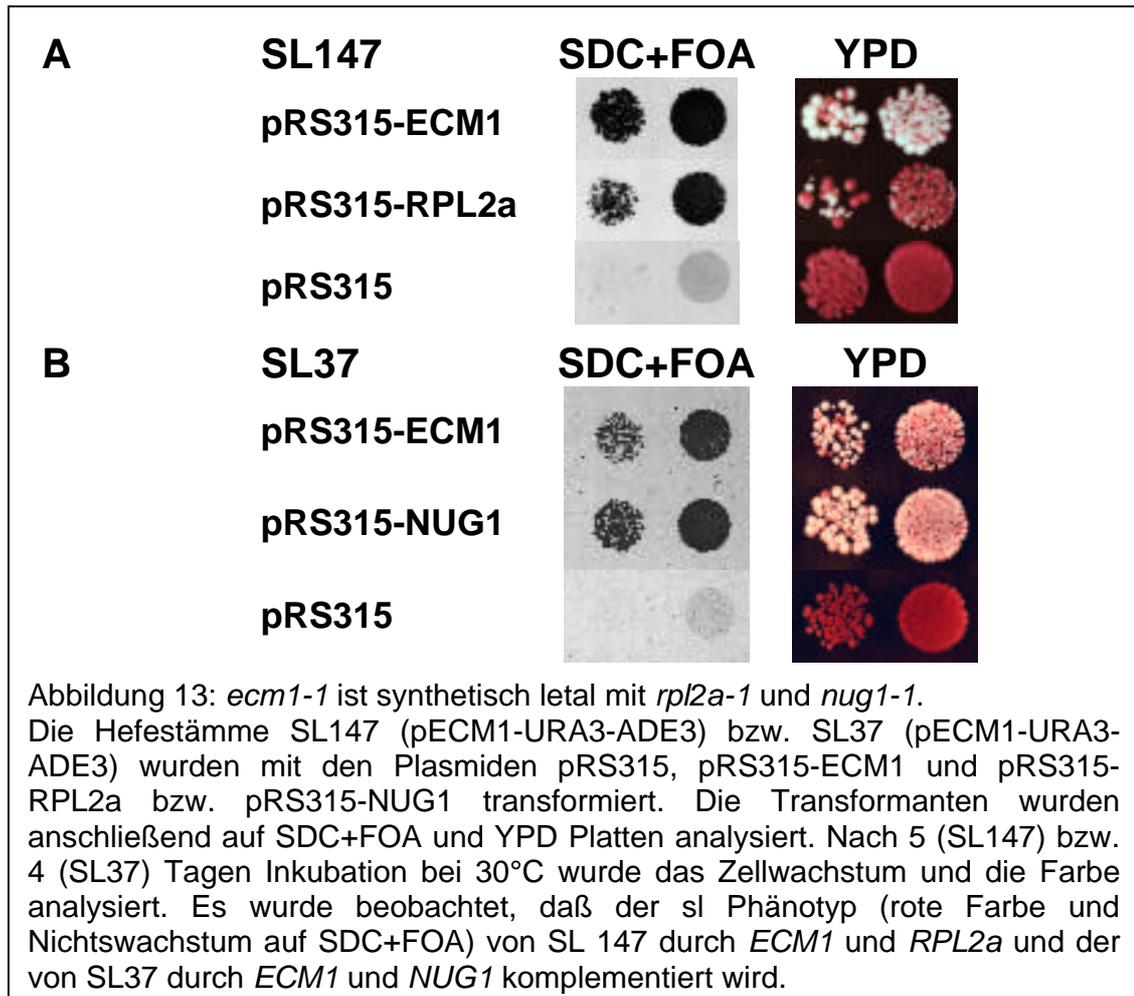


pURA3-NMD3) bestimmt (siehe Material und Methoden 5.2.3). Für *MTR2* und *NMD3* wurde hierbei eine allelspezifische Interaktion zwischen *mtr2-33* und *nmd3-2* beobachtet (Abb. 12C). Kein synergistischer Effekt wurde für die *mtr2-21* Mutante beobachtet (Abb. 12C). Dieses Ergebnis untermauert die Resultate der Exportdefekte, daß *mtr2-33* Zellen ausschließlich einen ribosomalen Exportdefekt zeigen, während *mtr2-21* Zellen einen spezifischen mRNA-Exportdefekt zeigen. Die Tatsache, daß keine synthetisch letale Beziehung zwischen *MEX67* und *NMD3* beobachtet wurde, steht im Einklang mit der Beobachtung, daß der ribosomale Export in *mex67* Mutanten nicht beeinträchtigt ist. Aufgrund der genetischen Beziehung und den ribosomalen Exportdefekten kann angenommen werden, daß Mtr2p auch eine wichtige Rolle beim Translokationsprozess des 60S prä-ribosomalen Partikels spielt, welche wahrscheinlich unabhängig von Mex67p ist (siehe Diskussion).

## **3.2 Nug1p und Nug2p sind essentiell für den ribosomalen Export**

### **3.2.1 *ECM1* interagiert genetisch mit *RPL2a* und *NUG1***

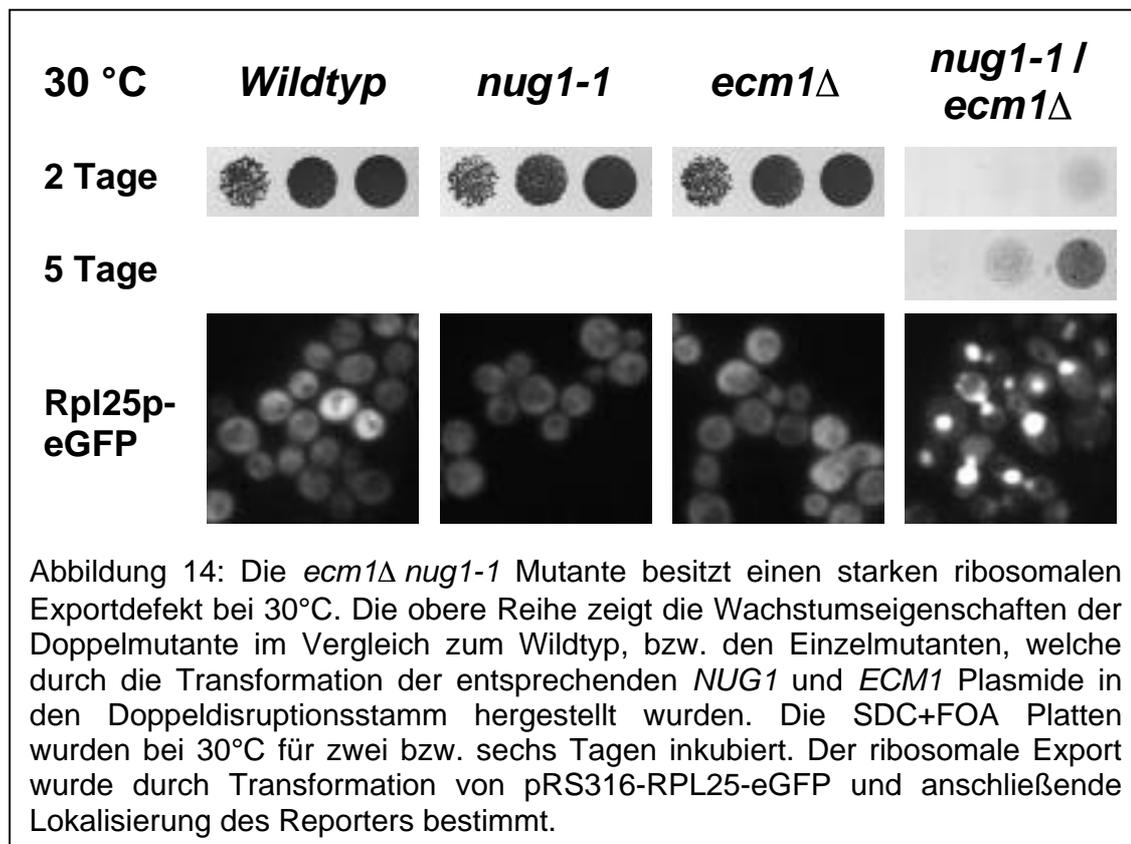
Wie vorher beschrieben, scheint Ecm1p eine Rolle im ribosomalen Export der großen Untereinheit zu spielen. Jedoch ist Ecm1p nicht essentiell für diesen Prozess. Um die Funktion von Ecm1p zu untermauern und essentielle 60S Exportfaktoren zu identifizieren, wurde ein weiterer synthetisch letaler Screen (siehe Material und Methoden 5.2.3, Abb. 23) mit dem *ecm1Δ* Stamm durchgeführt. In diesem sl-Screen wurden aus ca. 120.000 Kolonien SL147 und SL37 isoliert. Der sl-Phänotyp beider Kandidaten, rote Kolonienfarbe auf YPD-Platten, konnte durch Nichtwachstum auf 5'-FOA-haltigem Medium verifiziert werden (Abb. 13). Die in SL147 und SL37 mutierten Gene wurden durch Komplementation kloniert und durch anschließende DNA-Sequenzierung identifiziert. Es wurde beobachtet, daß der sl-Phänotyp von SL147 durch *RPL2a* komplementiert wurde (Abb. 13A).



*RPL2a* kodiert für das ribosomale Protein Rpl2ap, welches eine Komponente der 60S Untereinheit ist. Diese genetische Beziehung untermauert eine Funktion von Ecm1p bei der Biogenese der 60S ribosomalen Untereinheit (siehe Diskussion). Für die SL37 Mutante konnte gezeigt werden, daß der sl-Phänotyp durch ein uncharakterisiertes essentielles Gen *YER006w* (Winzeler et al., 1999; Ergebnisse 3.2.3 Abb. 17; Ergebnisse 3.2.5 Abb. 20) komplementiert wird (Abb. 13B). Aufgrund der nukleären Lokalisation des YER006w-eGFP Fusionsproteins (siehe Ergebnisse 3.2.4) und dem Vorhandensein eines charakteristischen GTPase Motivs in der Aminosäuresequenz von *YER006w* (siehe Ergebnisse 3.2.3) wurde dieses Gen *NUG1*, für nukleäre GTPase, genannt.

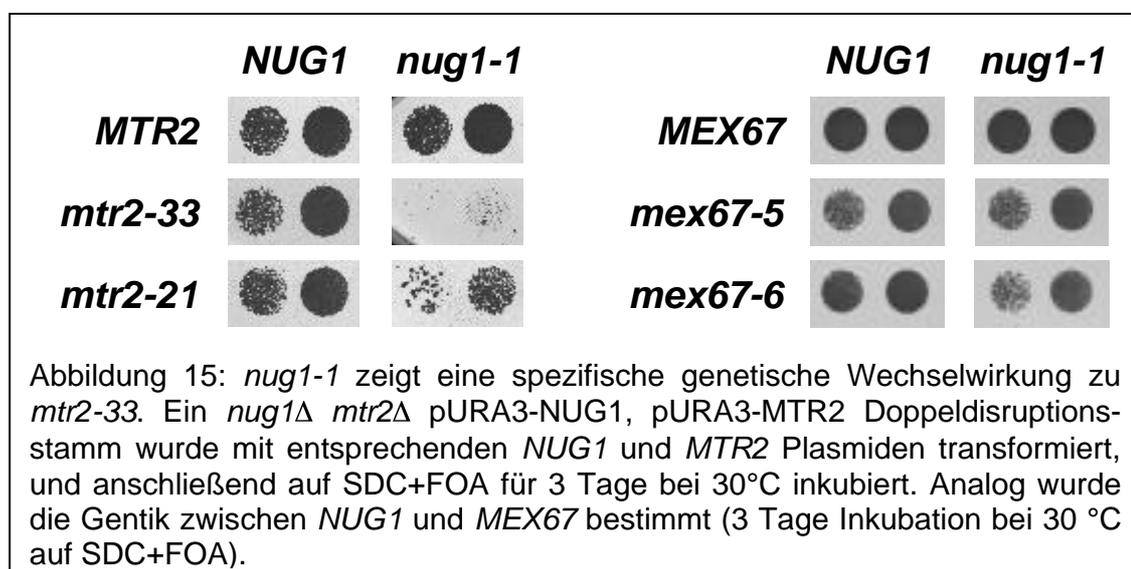
### 3.2.2 Die *nug1-1 ecm1* $\Delta$ Mutante zeigt einen ribosomalen Exportdefekt

Um die genetische Beziehung zwischen *ECM1* und *NUG1* unabhängig zu bestätigen, sollte der sl-Phänotyp von *ecm1* $\Delta$  *nug1-1* in einem *ecm1* $\Delta$  *nug1* $\Delta$  Doppeldisruptionsstamm getestet werden. Dazu wurde das mutierte *nug1-1* Gen (R420P) aus SL37 durch PCR amplifiziert, in ein Plasmid kloniert und in den *nug1* $\Delta$  *ecm1* $\Delta$  (pURA3-NUG1) Stamm transformiert. Abschließend wurde das Zellwachstum auf SDC+FOA analysiert. Als Kontrolle wurde der entsprechende Wildtypstamm und die Einzelmutanten benutzt. Es wurde beobachtet, daß die Kombination der *ecm1* $\Delta$  und *nug1-1* Mutation zu einem sehr langsamen Wachstumsphänotyp führt (Abb. 14), jedoch nicht zur Letalität, wie im genetischen Stammhintergrund von SL37, was vermutlich durch zusätzliche Mutationen im Genom von SL37 verursacht wird. Die genetische Interaktion zwischen *ECM1* und *NUG1* lässt vermuten, daß Nug1p ebenfalls eine Funktion im 60S Export besitzt.



Da die *nug1-1* Mutante alleine, keine Wachstumsdefekte im gesamten Temperaturbereich von 23°C bis 37°C zeigte (Abb. 14; eigene unveröffentlichte Daten), wurde der ribosomale Export in der Doppelmutante analysiert. Die *ecm1Δ nug1-1* Mutante zeigte eine starke Anhäufung des Rpl25p-eGFP Reporters im Zellkern (Abb. 14), während in den Einzelmutanten keine Defekte beobachtet wurden. Daraus kann geschlossen werden, daß der Wachstumsdefekt bei *ecm1Δ nug1-1* Zellen durch einen Defekt im Export bzw. in der Biogenese der großen ribosomalen Untereinheit verursacht wird und legt nahe, daß auch Nug1p bei diesem Prozess beteiligt ist.

Um diese Schlussfolgerung zu untermauern, sollte die genetische Wechselwirkung zwischen *mtr2-33* und *nug1-1* untersucht werden. Analog zu vorherigen Experimenten wurde ein Doppeldisruptionsstamm mit den entsprechenden Plasmiden transformiert und das Wachstum auf SDC+FOA analysiert. Hierbei wurde beobachtet, daß die *mtr2-33* Mutante, welche Defekt im ribosomalen Export zeigt, spezifisch mit der *nug1-1* Mutante interagiert (Abb. 15). Als Negativkontrolle wurde die mRNA-Exportmutante *mtr2-21* benutzt. Im analogen Experiment wurde die genetische Beziehung zwischen *nug1-1* und *mex67* Mutanten charakterisiert. In diesen Fällen wurden keinerlei synergistische Defekte beobachtet (Abb. 15).



Diese Ergebnisse bekräftigen die bisherigen Resultate aus Kapitel 3.1: Mtr2p und Ecm1p besitzen eine Funktion im ribosomalen Export. Diese Funktion von

Mtr2p ist unabhängig von der bisher bekannten Funktion im mRNA-Export und unabhängig von Mex67p (siehe Diskussion). Aufgrund der genetischen Beziehung zwischen *mtr2-33*, *ecm1Δ* und *nug1-1* ist es wahrscheinlich, daß auch Nug1p eine Rolle beim Export der großen ribosomalen Untereinheit spielt.

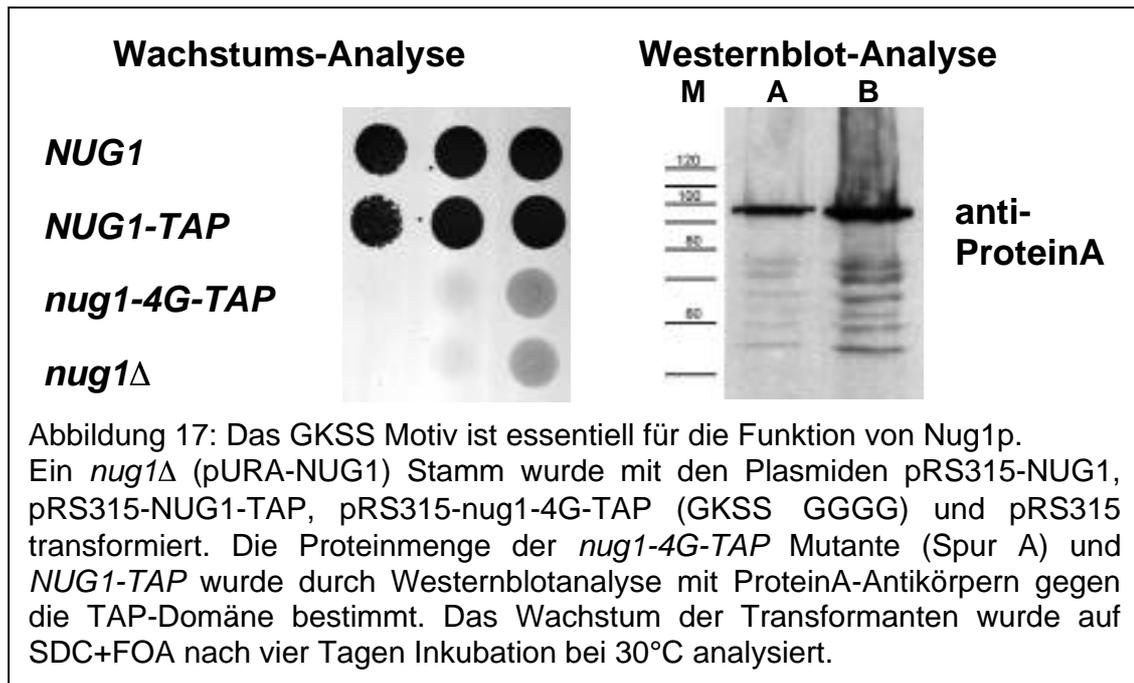
### 3.2.3 Nug1p ist evolutionär konserviert in eukaryontischen Zellen

Eine Datenbanksuche und Sequenzanalyse zeigte, daß Nug1p homologe Proteine in verschiedenen eukaryontischen Organismen, wie z.B. *D. melanogaster* (CG3983) *S. pombe* (Spbc26h8.08cp), *C. elegans* (K01C8.9), , und *H. sapiens* (FLJ10613) zu finden sind (Abb. 16). Dies spricht für eine evolutionär konservierte Funktion von Nug1p. Weiter existieren auch in *S. cerevisiae* Nug1p-Homologe, von denen Nug2p (YNR053c) die auffälligste Homologie aufweist (Abb. 16). Das *NUG2* Gen ist ebenfalls essentiell (Fromont-Racine et al., 1997; Ergebnisse 3.2.5 Abb. 19), besitzt ein Intron (Davis et al., 2000) und ist konserviert (*S. pombe* (Spac6f6.03cp), *C. elegans* (T19A6.2), *D. melanogaster* (CG6501) und *H. sapiens* (HUMAQUANTIG)). Der Sequenzvergleich von Nug1p und Nug2p ergab, daß beide Proteine ein sogenanntes p-Loop Motiv besitzen, welches charakteristisch für GTPasen ist. Dieses Motiv beinhaltet die fünf konservierten Sequenzbereiche, G1, G2, G3, G4 und G5 (Sprang et al., 1997). Die Aminosäuren dieses Motivs sind in Abbildung 16 gekennzeichnet. Eine Substitution der Aminosäuren GKSS (G1 Motiv) mit GGGG führte zur Letalität (*nug1-4G*, Abb. 17). Da diese *nug1-4G* Mutante in den Zellen exprimiert wird (Abb. 17), kann man schließen, daß dieses p-Loop Motiv essentiell ist für die Funktion von Nug1p. Die Frage nach der enzymatischen Aktivität und die mögliche Beteiligung von Cofaktoren, wie GTPasen aktivierende Proteine (GAP) oder GTP/GDP Austauschfaktoren (GEF), wird ein interessanter Aspekt zukünftiger Experimente sein.

### Nug1p Homologe

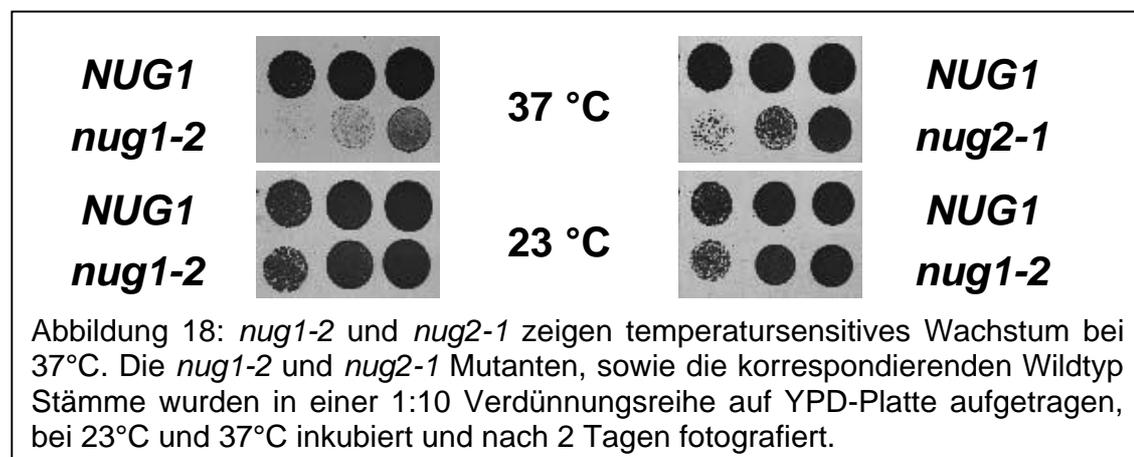
S.c. Nug1p	1	-----MRVRKQSRRTSTKLEKGIKKKASAHRRKKECKMAKIVTWRSFSSKDDPGTSPNFYVAKATLEELKAKMCDLEE
S.p. Nug1p	1	-----MVSLKQKSRRTTRLRSRIEKKAASKKQKADKKNPQWKSRIKRDPGTPNSFFPKDRTLAEIEQKRIREEE
C.e. Nug1p	1	----MAKYCLKTSKRVSCAKRYKIEKKVRDHNKVKKBAKNGTTN--KKEKTISSVPNSCPPEKBEILLVQAEQERIKIVR
D.m. Nug1p	1	---MALKRLKTKKSRLLGRLKHKIEKKVRDHNKERRAAKKNPKKGS--KOKLLOLPNIPCPEKDDILKEVBEAKQOEAE
h.s. Nug1p	1	1-----MKLRHKNKPPGEGSGHFKISWYPYQPAKQNGKKA--TSKRVPSAPHFVHPNDHANREAEELKAKVVEEM
S.c. Nug2p	1	GTGKKEKSRRLREGDTKDGNLRVGGENFYRDSKRVKFLNMYTSGKEIRNKKGNLRAASFQDSTIPDARVCPDRWFVGN
S.c. Nug1p	75	RELAKQORLEAKKAAKEQGVDAEMDEMIEDENGLAALVE-----SAQQAAAEY
S.p. Nug1p	75	KLARASGQVDAAMEEEDAVDENGLMI-----SKIAEAAQ
C.e. Nug1p	76	QEAAEBAAKIHRIEKRNKTPA-----NFESMV
D.m. Nug1p	78	RLARBAFKABREQNFKFTLES-----MVDAD
h.s. Nug1p	67	REKQQAAREQBRQKR-----TTESYC
S.c. Nug2p	81	RVTISQDALQHPFSALGETQKITYQVLLRRNKLPMSSLLEEKDADESPKARILDTESYADAFGPKAQRKRPLAASNLDLV
S.c. Nug1p	124	EGTPSNDADVRLDELDVIDY-----NIDFYGEDVEGESELEKSRKAYDKIFKSVLDASDVILYVLDARDPESTRSK
S.p. Nug1p	111	ASNPDEBEFVMEEDNLGEA-----PLLVDSESYEASVKADTSRKAYDKKFKVVEASDVILYVLDARDPESTRSK
C.e. Nug1p	104	AKASKQGTDFKVVASA-----AEHEKFNTLD--DKLIKAYASEVKKIWEIADVILQVLDARDPLGSRSKS
D.m. Nug1p	106	MRSTVHGIMHNDPAQDQ-----DEKKYKNAVTKEOSLKYTFKFKVVENADVLEVDARDPLGTRCNE
h.s. Nug1p	89	QDVLRRQDFDHKEEVL-----QELNMFQDDDEATRKAYVKEFKVVEYSDVILEVLDARDPLGRCFCFQ
S.c. Nug2p	161	KATNEDITKYBEKQVLDATLGLMGNQEDKENGWTSAAKEAIFSKGQSKRIINELYKVIDSDVIVHVLARDPLGTRCKS
S.c. Nug1p	196	VEEAVLQS--QKRLILLNKVDLIPPHVLEQVINYLKSSFPTIPFRASGAVNGTSFN-----RKLSTTTA
S.p. Nug1p	183	VERQVLAASAEKRLIFVINKIDLVPSEVKNQVWYTLRNFFPTIPMRSASGSGNSNKKH-----QS-----ASASSTI
C.e. Nug1p	168	VEDQVL---KGGKRLVLLNKIDLVPRENQKWEYLRGGQPTAFKASTQEQKSNIG---FNSALLNNTETSKCVGA
D.m. Nug1p	171	VERAVRGA-PGNKRLVVLNKRADLVPRENENNWKERRSGVTAFAKASTQDQANRIGRKL-REMKTEKAMQGSVCIGA
h.s. Nug1p	154	VEEAVLRA-QGNKKLVLVNLKIDLVPKEVWEKWDYLRNELPTVAFKASTQHQVKNLNCVSPVVDQASESLLKSKACFGA
S.c. Nug2p	241	VEEYKKET-PHKHLVYVNLKCDLVEVWAAAVWKHLSKERPTLAFHAS--ITNSFGKG-----
S.c. Nug1p	262	SALLESLKTYSNNSNKKRSIVVGV <b>IGIPNVGKS</b> SVINALLARRG-QGSKACPVGENEAG <b>VTTSLREKIDNKLKILDSPGI</b>
S.p. Nug1p	251	SNLKSLSKYSAKKRLKSLTVGV <b>IGIPNVGKS</b> SVINATVNRSANGRSAPCPAGN <b>VAGTTSLREVKLDNKLRLDSPGI</b>
C.e. Nug1p	241	DIYMKLALANYCRNKDKKTSIRVGV <b>IGIPNVGKS</b> SVINSLK-----RRKACVGNLPG <b>ITKELQEVLLKNTIRLDSPGI</b>
D.m. Nug1p	249	ELLMSMLGNYCRNKCHKTSIRVGV <b>IGIPNVGKS</b> SVINSLT-----RGRSCMVGSTPG <b>VTKSNQEVLLSKIKLDCPGI</b>
h.s. Nug1p	233	ENLMRVLGNYCRLGEVRIHIRVGV <b>IGLENVGKS</b> SLINSLK-----RSRACSVGAVPG <b>ITKFMQEVLLDKFIRLADPGI</b>
S.c. Nug2p	297	-SLIQLLRQFSQLHTRKQISVGF <b>IGIPNTGKS</b> SVINILR-----RKKVCOVAP <b>ITGKRVWQYITLMKRIFLDCPGI</b>
S.c. Nug1p	341	<b>CFPS</b> ENKKRSKVEHEAEALLNALPAKH <b>VDFE</b> YPAVLLMLVKRLAKSDEMTESEFKKLYEIPPIPANDADTFKHE <b>LHVAR</b>
S.p. Nug1p	331	<b>VFP</b> SDSKDD---LYRLVMLNVA <b>SSTKVDFE</b> VAVASYILOFLSRVPGQLERMFQRYEIPPLLNTSDID <b>ATDFVVAR</b>
C.e. Nug1p	315	ILVSKQDLDP---IE-VALKNAIRVDN <b>LDLDFIAP</b> VHAILLRCS---RETMLLYN <b>LADNSVDOFLAQVAR</b>
D.m. Nug1p	323	<b>VFT</b> SGGENS---H-AVLKNAQ <b>RVGDVDFE</b> ITAESVLKRAS-----KEYFCTMYDITN <b>DTBEFEAKKRA</b>
h.s. Nug1p	307	<b>VGP</b> NSEVG---TILRNCVHVQ <b>GLADDF</b> TPPETILQRCN-----LEESNYYG <b>VSGQITBEHFLTAVAR</b>
S.c. Nug2p	370	<b>VFP</b> SKDSE---EDILFRGVVR <b>VEHTDFE</b> EQYIPGVLRKQ-----VKHIERVY <b>ETSGKDATEHETVAR</b>
S.c. Nug1p	421	KRGRLEKGGIPNLASAGLSVLNDWRD <b>GKILG</b> VLPNTSAAASQDQONLSTNTGTQAP <b>PAANES</b> -----
S.p. Nug1p	407	KRGRLEKGGIPNLNAAANIVINDWHAGRIE <b>WAAE</b> PEVINEKNSSEVQD <b>TOIT</b> EWAK <b>BEFD</b> ND <b>F</b> -----
C.e. Nug1p	379	RIGKLR <b>RGAR</b> PDVNAAR <b>RVLND</b> WNTGKLR <b>YTH</b> PP <b>EQGT</b> AKEDI <b>VVPAE</b> VSV <b>QFS</b> KE <b>FD</b> DAIA <b>EEQN</b> Q <b>IVE</b> GL <b>P</b> -MES
D.m. Nug1p	385	RMGKFL <b>KKGV</b> PDVVAAR <b>SVLND</b> WNTGKIK <b>CTOP</b> PE-V <b>QEG</b> QSV <b>ISAS</b> IVH <b>SEAR</b> BE <b>FD</b> EN <b>FES</b> ME <b>TEI</b> LE <b>HC</b> A-V <b>K</b> T
h.s. Nug1p	368	RLGK <b>KKGG</b> LYSQ <b>QAA</b> AV <b>LAD</b> WVSGK <b>ISE</b> Y <b>IPPA</b> -- <b>TH</b> TL <b>PTLS</b> AE <b>IV</b> K <b>EM</b> TE <b>VE</b> DE <b>ED</b> TE <b>QAN</b> ED <b>TME</b> CL <b>AT</b> GES
S.c. Nug2p	433	K <b>QCR</b> LL <b>KG</b> GP <b>DES</b> CV <b>SK</b> QL <b>ND</b> NR <b>GK</b> IP <b>W</b> VL <b>PE</b> KE <b>GE</b> EP <b>K</b> KE <b>VE</b> KT <b>A</b> -----
S.c. Nug1p	487	-----TI <b>VS</b>
S.p. Nug1p	458	DI <b>IAPH</b> NSD-----EE <b>ED</b> DD <b>EM</b> ET <b>DV</b> NE <b>KQ</b> TV <b>TS</b> GR <b>KV</b> KG-----PT <b>KD</b> DD <b>KV</b> EP
C.e. Nug1p	463	DD <b>IME</b> IT <b>ST</b> GP <b>LE</b> IR <b>QPRE</b> AE <b>PAD</b> K <b>ITAS</b> L <b>VID</b> E <b>KE</b> K <b>PA</b> K <b>GR</b> K <b>R</b> -----L <b>DE</b> E <b>KE</b> K <b>VD</b>
D.m. Nug1p	446	DE <b>LL</b> GD <b>TD</b> PL <b>EM</b> E <b>IK</b> LL <b>HS</b> PM <b>TK</b> I <b>ADA</b> I <b>EN</b> KT <b>TV</b> Y <b>K</b> IG <b>DL</b> T <b>G</b> Y <b>CT</b> NP <b>NR</b> H <b>Q</b> M <b>G</b> W <b>AK</b> R <b>N</b> VD <b>HR</b> PK <b>S</b> NS <b>M</b> VD <b>VC</b> S <b>VD</b> RR <b>S</b> VL
S.c. Nug2p	491	E <b>WS</b> KE <b>FD</b> LD <b>GL</b> F <b>SS</b> D <b>K</b> A <b>IDA</b> S <b>Q</b> DT <b>ME</b> -----
S.p. Nug1p	506	E <b>S</b> AL <b>EG</b> NV <b>QL</b> N <b>KL</b> KT <b>A</b> IK <b>KQ</b> KK <b>S</b> KT <b>AN</b> RA <b>DK</b> L <b>S</b> DS <b>L</b> GN <b>ML</b> GG <b>D</b> AM <b>EM</b> -----
C.e. Nug1p	518	PS <b>LL</b> EE <b>NQ</b> SL <b>NK</b> Q <b>K</b> Q <b>M</b> Q <b>L</b> KK <b>Q</b> N <b>VR</b> NE <b>K</b> IK <b>SK</b> IT <b>D</b> VL <b>DS</b> F <b>SL</b> GP <b>SS</b> SK <b>A</b> E <b>K</b> Y <b>DF</b> DE <b>D</b> Y <b>VE</b>
D.m. Nug1p	526	QR <b>IM</b> ET <b>DP</b> L <b>Q</b> Q <b>QA</b> AS <b>AL</b> KN <b>KK</b> M <b>Q</b> R <b>AD</b> K <b>IA</b> SK <b>L</b> SD <b>MS</b> SA <b>LD</b> LS <b>GN</b> AD <b>D</b> GV <b>GD</b> -----
h.s. Nug1p	526	QR <b>IM</b> ET <b>DP</b> L <b>Q</b> Q <b>QA</b> AS <b>AL</b> KN <b>KK</b> M <b>Q</b> R <b>AD</b> K <b>IA</b> SK <b>L</b> SD <b>MS</b> SA <b>LD</b> LS <b>GN</b> AD <b>D</b> GV <b>GD</b> -----
S.c. Nug2p	526	QR <b>IM</b> ET <b>DP</b> L <b>Q</b> Q <b>QA</b> AS <b>AL</b> KN <b>KK</b> M <b>Q</b> R <b>AD</b> K <b>IA</b> SK <b>L</b> SD <b>MS</b> SA <b>LD</b> LS <b>GN</b> AD <b>D</b> GV <b>GD</b> -----

Abbildung 16: Nug1p ist konserviert in eukaryontischen Zellen und homolog zu Nug2p. Die Proteinsequenzen entstammen der EuGenes bzw. YPD Datenbank, der Sequenzvergleich wurde mit ClustalW1,8 durchgeführt und mit Boxshade 3.21 dargestellt. Die charakteristischen Bereich des P-Loop Motivs sind rot gekennzeichnet.



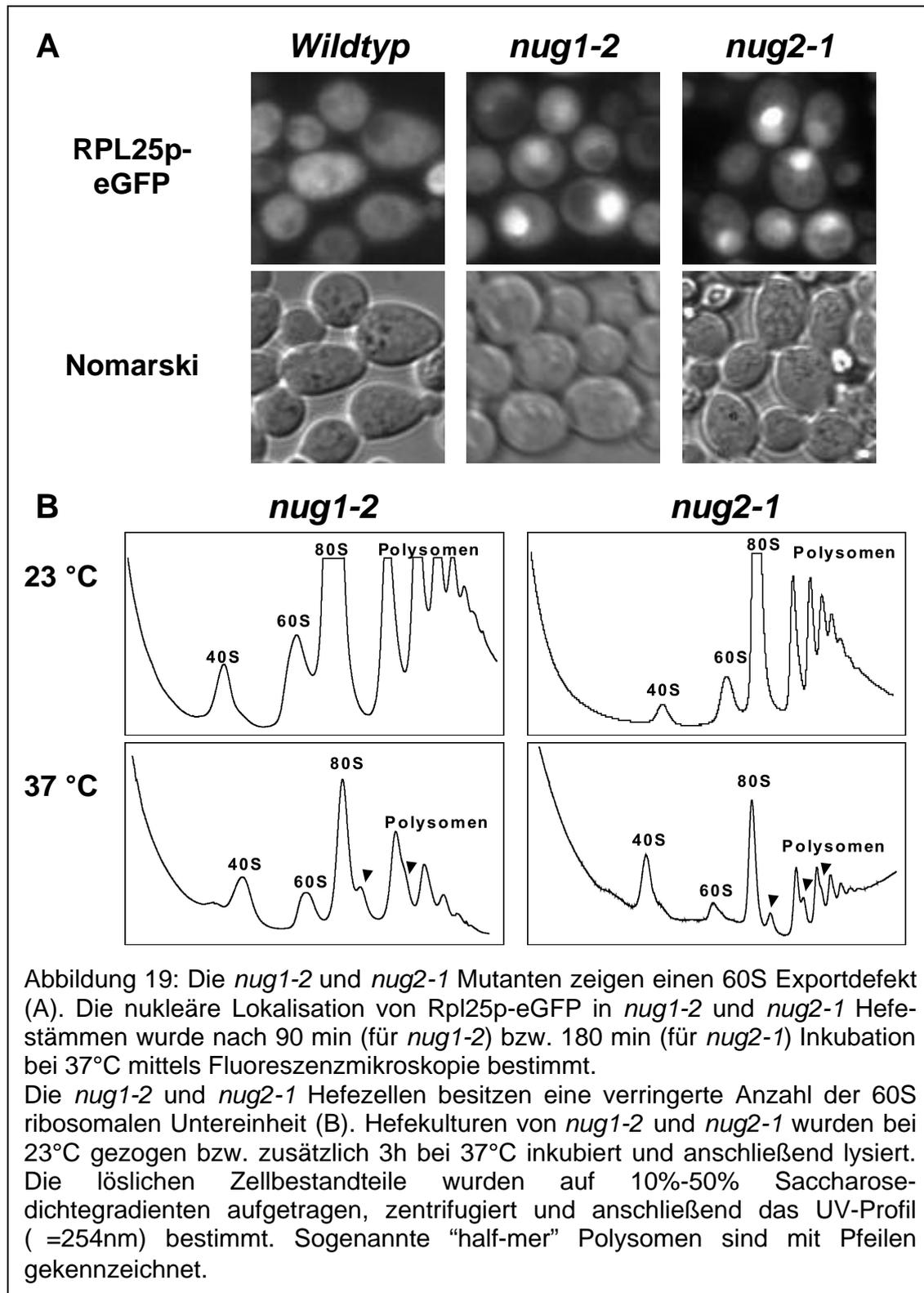
### 3.2.4 *nug1-2* und *nug2-1* Mutanten zeigen Defekte im 60S Export

Um die Frage nach einer Beteiligung von Nug1p und dem Hefehomolog Nug2p im ribosomalen Export zu beantworten, wurden *nug1* und *nug2* temperatursensitive (ts) Mutanten hergestellt (Methode siehe: Muhlrads et al., 1992; Santos-Rosa et al., 1998; Material und Methoden 5.1.2). Für beide Gene wurden ca. 5000 Mutanten auf einen temperatursensitiven (ts) Phänotyp untersucht und daraus die Mutanten *nug1-2* und *nug2-1* isoliert. Beide Mutanten zeigten ein verlangsamtes Zell-



wachstum bei 37°C (Abb. 18). Bei permissiver Temperatur (23°C / 30°C) war kein signifikanter Wachstumsdefekt zu beobachten (Abb. 18). Um die direkte Beteiligung von Nug1p und Nug2p bei der Biogenese bzw. dem Export des 60S Partikels zu zeigen, wurden die *nug1-2* und *nug2-1* Mutanten mit dem Rpl25p-eGFP Reporterplasmid transformiert und der ribosomale 60S-Export bei restriktiver Temperatur analysiert. In beiden Mutanten wurde eine Anhäufung des Rpl25p-eGFP Proteins im Zellkern beobachtet (Abb.19A). Um diesen ribosomalen 60S-Exportdefekt zu verifizieren, wurden die relativen Konzentrationen der kleinen (40S) und großen (60S) ribosomalen Untereinheiten sowie der Monoribosomen (80S) und Polyribosomen (Polysomen) der Mutanten analysiert (siehe Material und Methoden 5.3.2). Das Zellysate dieser Mutanten wurde über einen 10%-50% Saccharosedichtegradienten aufgetrennt und die Absorption ( $\lambda = 254\text{nm}$ ) der verschiedenen Fraktionen bestimmt. Die Zellen, welche bei 23°C gezogen wurden, zeigten ein normales Wildtypprofil, während man bei den Zellen, welche 3 h bei 37°C inkubiert wurden, eine deutliche Inversion des 60S zu 40S Verhältnisses beobachten konnte (Abb. 19B). Desweiteren konnte man beim 37°C Profil sogenannte "half-mer" Polysomen erkennen, welche Polysomen repräsentieren, die nur eine 40S Untereinheit an der Translationsinitiationsstelle der mRNA besitzen. Diese Defekte zeigen, daß die *nug1-2* und *nug2-1* Mutanten bei 37°C eine verringerte Anzahl der 60S ribosomalen Untereinheit im Vergleich zur 40S Untereinheit besitzen. Hieraus kann man schließen, daß Nug1p und Nug2p eine spezifische Funktion in der 60S Biogenese besitzen.

Um zu bestimmen, bei welchem Schritt die Ribosomenbiogenese in den *nug1-2* bzw. *nug2-1* Mutanten beeinträchtigt ist, wurde eine Northernblot-Analyse durchgeführt (Baßler et al., 2001). Diese ergab, daß die *nug1-2* Mutante nur sehr geringe Defekte in der rRNA Prozessierung aufweist. In der *nug2-1* Mutante konnte man eine verringerte Konzentration der 27SA und 27SB rRNA-Vorstufen sowie der 25S reifen RNA beobachten (Übersicht zur rRNA Biogenese in *S. cerevisiae* Einleitung 1.6 Abb. 5). Weiterhin wurde eine geringe Akkumulation der 6S rRNA Zwischenstufe und eine Reduktion der 5S rRNA beobachtet. Auch in einem Pulse/Chase Experiment wurden geringe Defekte bei der RNA Synthese beobachtet (Baßler et al., 2001). Diese milden Defekte bestätigen eine Rolle von

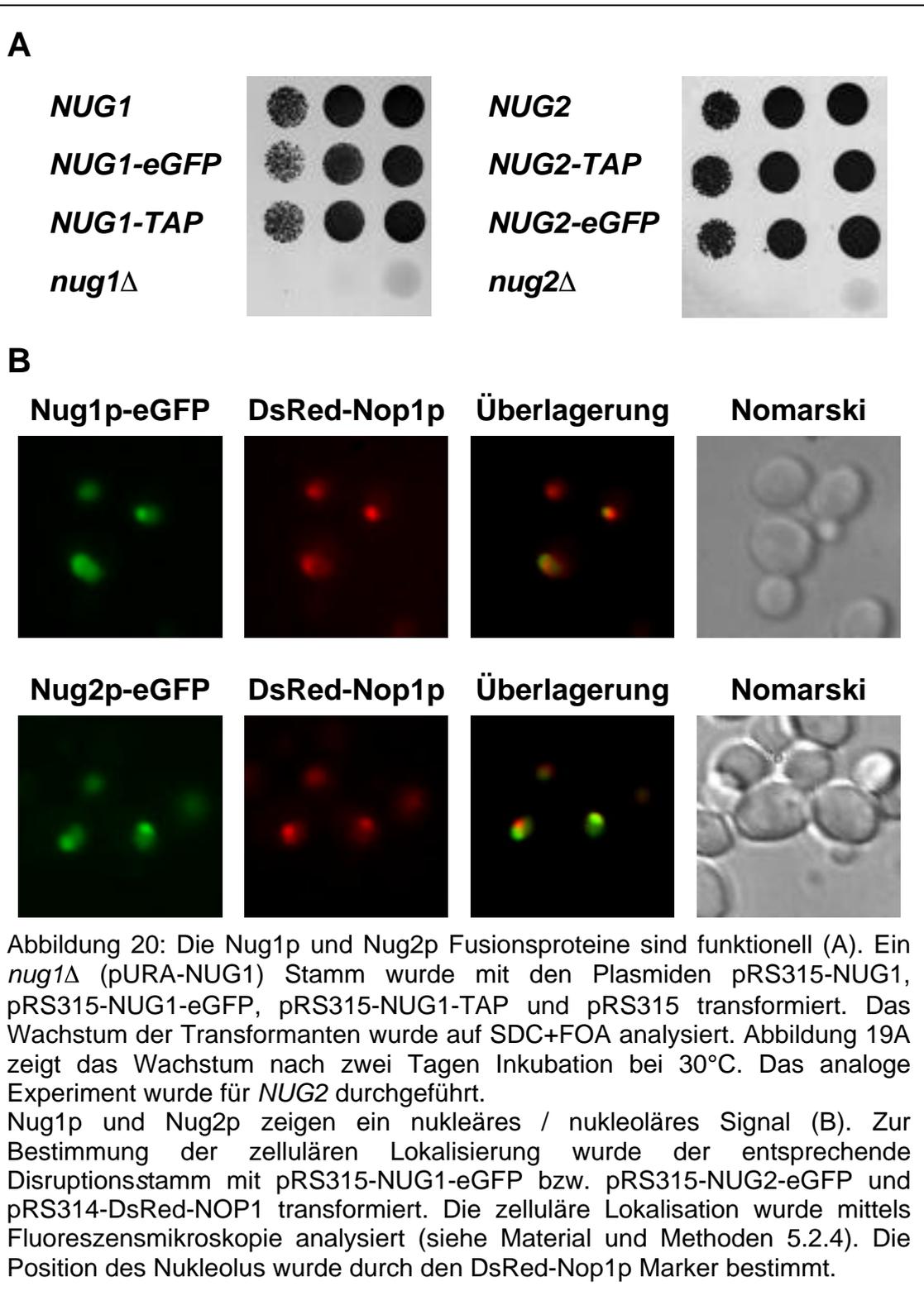


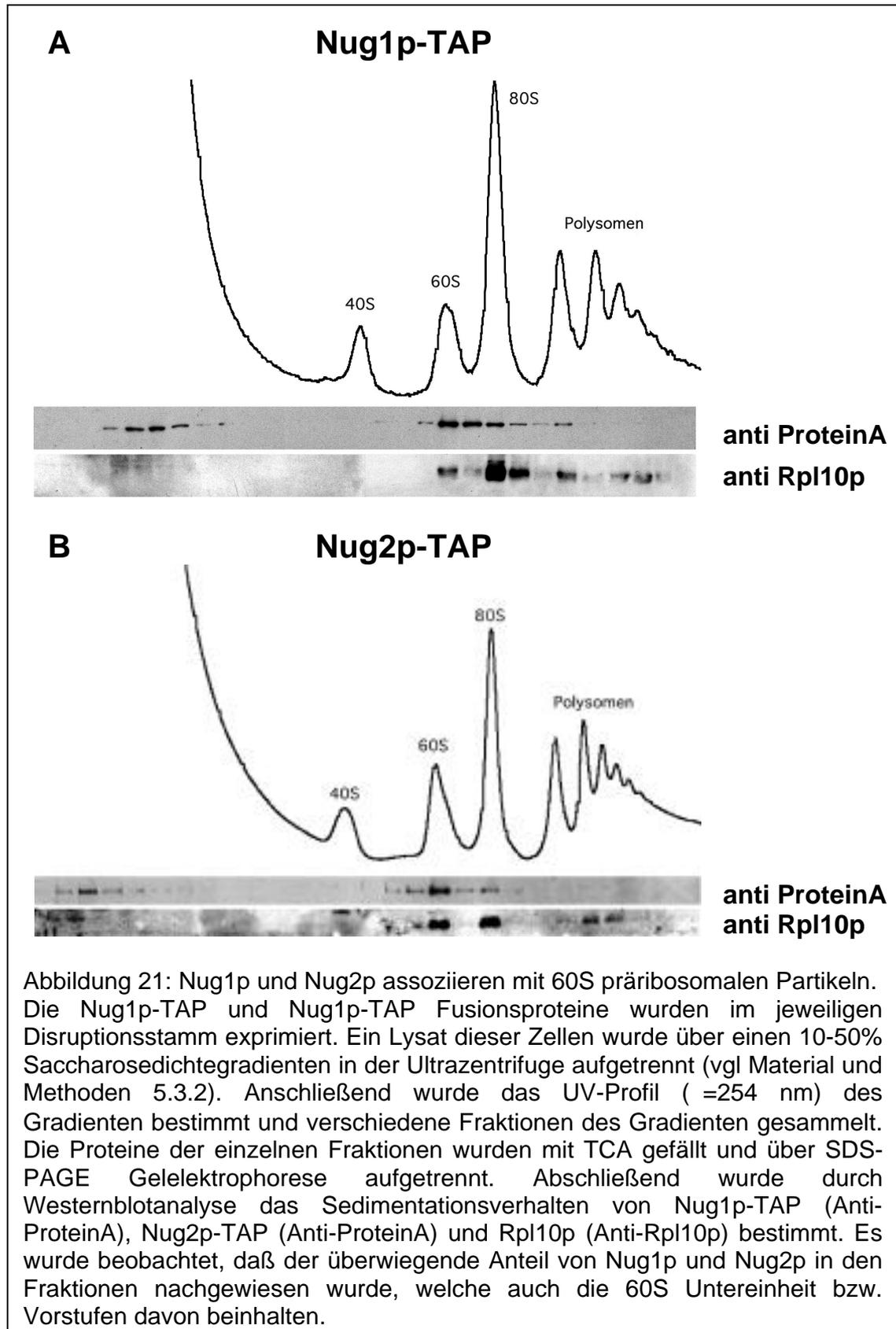
Nug1p und Nug2p auf einer späten Stufe der 60S Biogenese. Die starken Defekte im Export von Rpl25p-eGFP und im Ribosomen Profil legen jedoch nahe, daß Nug1p und Nug2p ihre zentrale Rolle im Export des ribosomalen 60S Partikels haben (siehe Diskussion).

### 3.2.5 Nug1p und Nug2p assoziieren mit 60S-präribosomalen Partikeln

Um zu analysieren, ob Nug1p und Nug2p mit prä-ribosomalen Partikeln *in vivo* assoziieren, wurde die zelluläre beider Proteine Lokalisierung bestimmt. Erreicht wurde dies durch die Herstellung von eGFP Fusionsproteinen (siehe Material und Methoden 5.1.2). Beide Fusionsproteine komplementieren vollständig den jeweiligen letalen Disruptionsstamm im gesamten Temperaturbereich von 23°C bis 37°C (Abb. 20A). Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde die *in vivo* Lokalisation von Nug1p-eGFP und Nug2p-eGFP in dem entsprechenden Disruptionsstamm bestimmt. Für beide Fusionsproteine wurde ein nukleäres / nukleoläres Signal beobachtet (Abb. 20B). Analog zu vorherigen Experimenten wurde die nukleoläre Lokalisation durch die Coexpression der nukleolären Markers DsRed-Nop1p bestätigt (Abb. 20B). Diese nukleäre/nukleoläre Lokalisation in exponentiell wachsenden Hefezellen entspricht der Erwartung für Proteine, die in der ribosomalen Biogenese bzw. im Export involviert sind.

Da die *nug1-2* und *nug2-1* Mutanten einen ribosomalen Exportdefekt, sowie eine verringerte Konzentration der 60S Untereinheit zeigen, sollte getestet werden, ob Nug1p und Nug2p mit ribosomalen Untereinheiten assoziiert sind. Dazu sollten mit Hilfe eines Saccharosedichtegradienten die Zellkomponenten aufgetrennt werden und durch Westernblot-Analyse bestimmt werden, in welchen Fraktionen sich Nug1p und Nug2p befinden. Da keine Antikörper zur Verfügung standen, wurden Nug1p-TAP bzw. Nug2p-TAP Fusionsproteine (siehe Ergebnisse 3.3) benutzt. Beide Fusionsproteine komplementieren den jeweiligen Disruptionsstamm (Abb. 20A) und können leicht mit ProteinA-Antikörpern nachgewiesen werden. Wenn man dieses Lokalisationsexperiment für Nug1p-TAP durchführt, beobachtet man,





daß sich Nug1p-TAP hauptsächlich in der Fraktion mit der 60S Untereinheit befindet (Abb. 21). Dieser Pool von Nug1p ist jedoch nicht scharf abgegrenzt zur 80S Fraktion, was bedeuten könnte, daß Nug1p auch mit größeren 66S Vorstufen assoziiert ist. Weiter findet man auch einen kleineren Teil in dem Bereich des Gradienten, wo sich lösliche Proteine befinden. Signifikant ist jedoch, daß kein Nug1p-TAP Fusionsprotein in den Fraktionen der 40S Untereinheit und der Polysomen zu finden war. Dieses Sedimentationsverhalten von Nug1p-TAP unterscheidet sich deutlich von dem des ribosomalen Protein Rpl10p, welches Teil der reifen 60S Untereinheit ist. Daher ist Rpl10p in den 60S, 80S, sowie polysomalen Fraktionen nachzuweisen.

Für Nug2-Tap wurden ähnliche Beobachtungen gemacht. Jedoch war die Lokalisation von Nug2p stärker auf die 60S Fraktion beschränkt und es wurde weniger Nug2p in den löslichen Fraktionen gefunden (Abb. 21B). Diese Ergebnisse unterstreichen, daß Nug1p und Nug2p eine Rolle bei der 60S Biogenese spielen, da beide mit 60S Präribosomen, aber nicht mit reifen 80S Ribosomen assoziieren. Diese Schlussfolgerung wird durch die nukleoläre / nukleäre Lokalisation von Nug1p und Nug2p in der Zelle unterstützt. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus Kapitel 3.2.3, ergibt sich, daß Nug1p und Nug2p bei der späten Biogenese und / oder beim nukleären Export des 60S Partikels beteiligt sind (siehe auch Diskussion).

### **3.3 Reinigung und Charakterisierung eines 60S prä-ribosomalen Partikels**

Um die Proteine zu identifizieren, welche biochemisch mit Nug1p interagieren, wurde die „Tandem Affinity Purification“ (TAP) Methode angewandt (Rigaut et al., 1999; Material und Methoden 5.3.1). Zu diesem Zweck wurde ein Nug1p-TAP Fusionsprotein hergestellt. Dieses Fusionsprotein besitzt den folgenden Aufbau: das Nug1p Protein wurde C-terminal mit dem Calmodulin bindenden Peptid (CBP) fusioniert, gefolgt von einer TEV-Protease-Schnittstelle und zwei ProteinA-

Domänen. Die Reinigung erfolgt über zwei Affinitätssäulen: zuerst wurden die ProteinA-Domänen an IgG Sepharose gebunden, danach folgte eine proteolytische Spaltung an der TEV-Schnittstelle, dann eine Bindung der CBP-Domäne an eine Calmodulinsäule, bevor abschließend Nug1p mit EGTA eluiert wurde (siehe Material und Methoden 5.3.1). Die so isolierten Proteine wurden über SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese aufgetrennt und anschließend mit Coomassieblau gefärbt. Für den Nug1p-Komplex wurde ein recht kompliziertes Bandenmuster beobachtet (Abb. 22A). Die Proteinbanden wurden einzeln ausgeschnitten und über Massenspektroskopie analysiert (Baßler et al., 2001). Die identifizierten Proteine sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die stärkste Coomassiebande wurde als Nug1p identifiziert. Weiter wurden im niedermolekularen Bereich (unter 30 kDa; siehe Abb. 22A) hauptsächlich ribosomale Proteine der großen Untereinheit, sogenannte L-Proteine, gefunden. Hervorzuheben ist hierbei, daß keine ribosomalen Proteine der kleinen Untereinheit (S-Proteine) vorhanden waren. Insgesamt wurden 30 L-Proteine identifiziert (Tabelle 2). Weiter wurden im hochmolekularen Bereich (über 50 kDa) überwiegend essentielle, nichtribosomale Proteine identifiziert (Tabelle 2). Insgesamt wurden 23 Proteine über Massenspektroskopie und Westernblot-Analyse (Abb. 22C) nachgewiesen, jedoch ist es wahrscheinlich, daß einige Proteine nicht identifiziert werden konnten, da ihre Konzentration zu gering war oder die entsprechende Coomassiebande von anderen Proteinen überlagert wurde. Die meisten dieser Proteine besitzen homologe Proteine in *Drosophila*, *C. elegans* und menschlichen Zellen. Einige der isolierten Faktoren waren bereits bzw. wurden parallel zu dieser Arbeit in ihrer Funktion in der 60S Biogenese charakterisiert. Zu dieser Gruppe gehören Nip7p (Zachin et al., 1997; Zachin und Goldfarb, 1999), Rlp7p (Dunbar et al., 2000), Nop2p (Hong et al., 1997), Tif6p (Si und Maitra, 1999; Basu et al., 2001), Spb1p (Kressler et al., 1999), Nop7p, Nsa3 (Harnpicharnchai et al., 2001), Erb1p (Pestov et al., 2001), sowie die RNA-Helikasen Has1p (De La Cruz et al., 1999) und Dbp10p (Burger et al., 2000). Weiter wurden vier der identifizierten Proteine im einem Screen für 60S Exportfaktoren gefunden und charakterisiert: Rix1p (Baßler et al., 2001), Rix3p (Noc2p) und Noc3p (Milkereit et al., 2001), sowie Rix9p (Rlp7p, O. Gadal submitted). Auch das Nug1p-homologe Nug2p (Bande #26)

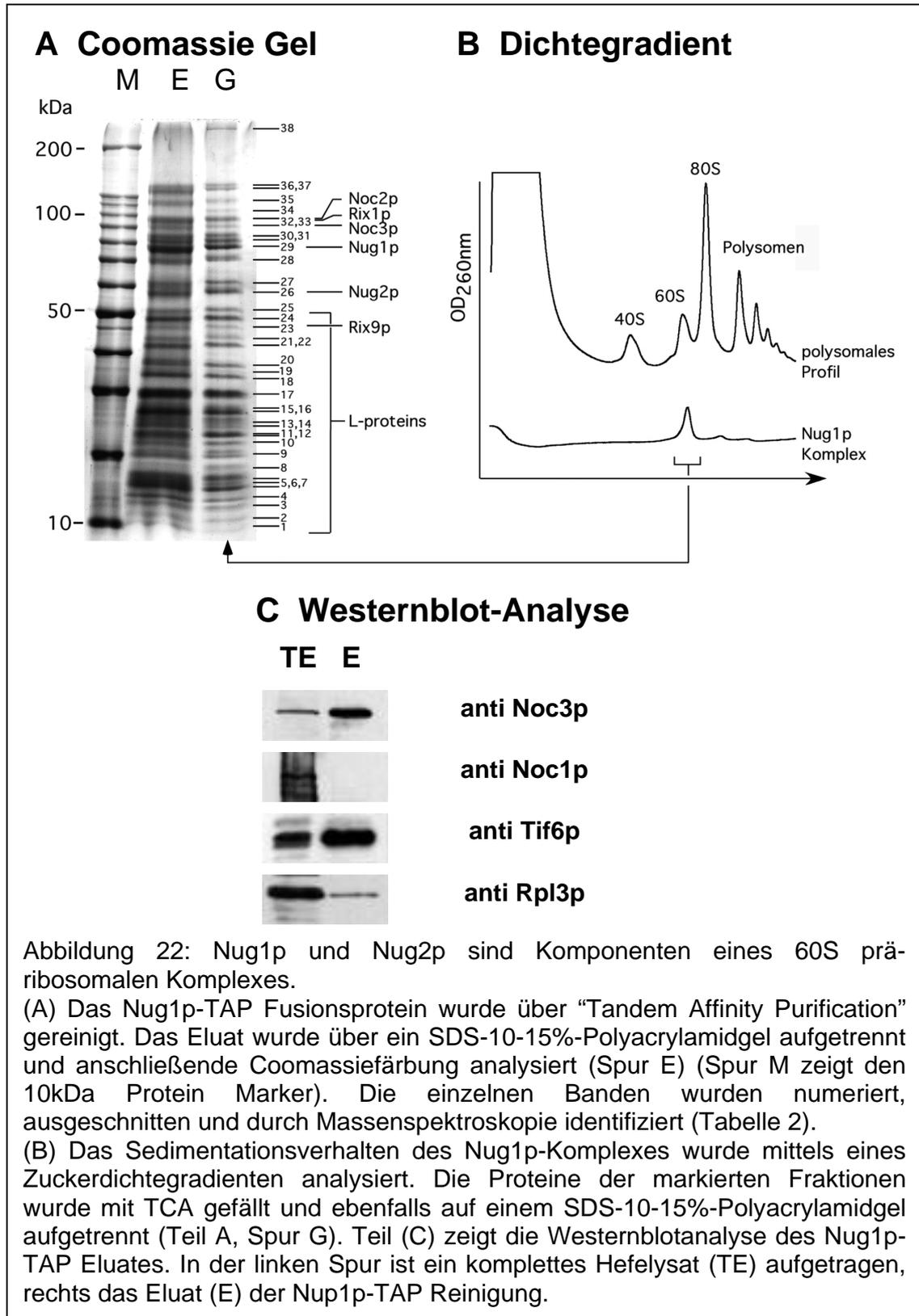


Tabelle 2: Identifizierte Proteine im Nug1p-TAP Eluat

Protein	Bande	NPC	Disruption	Lokalisation	Funktion / Defekte
Nip7p	9		Letal	Nukleus und Zytoplasma	Sedimentiert mit der freien 60S ribosomalen Untereinheit, Depletion erzeugt Anhäufung einer 27S rRNA Vorstufe, ts Mutante zeigt Half-mer Polysomen.
Tif6p (Cdc95p)	Western-blot		Letal	Nukleus und Zytoplasma	Sedimentiert mit der freien 60S ribosomalen Untereinheit, Depletion verursacht Verringerung der 60S Konzentration und zeigt Half-mer Polysomen.
Mrt4p / Dob1p	17		Lebensfähig		Funktion im mRNA-Turnover, benötigt für frühen Schritt im mRNA Abbau.
Kre32p	20	ja	Lebensfähig	Nukleus	Unbekannte Funktion
Rlp7p	23		Letal		<u>R</u> ibosomal <u>L</u> ike <u>P</u> rotein, kann Rpl7ap oder Rpl7bp funktionell nicht ersetzen, wird für die Biosynthese des 60S Partikels benötigt.
Nsa3p	25		Letal		Beteiligt in der Biogenese des 60S prä-ribosomalen Partikels.
Nug2p	26	ja	Letal	Nukleus und Nukleolus	<b>Erstmals in dieser Arbeit beschrieben.</b>
YCR072c	26		Letal		Besitzt 8 WD40 Repeats
Has1p	27	ja	Letal	Nukleus und Nukleolus	Besitzt ATP/GTP bindendes Motiv (p-Loop), gehört zur Familie der DEAD-Box RNA Helikasen.
YPL146c	28	ja	Letal	Nukleus und Nukleolus	Unbekannte Funktion
YDR101c	28		Letal		Unbekannte Funktion
Nug1p	29	ja	Letal	Nukleus und Nukleolus	<b>Erstmals in dieser Arbeit beschrieben.</b>
Nog1p	30	ja	Letal	Nukleus und Nukleolus	Besitzt eine GTP bindende Domäne.
Nop7p	31	ja	Letal	Nukleus, Zellkernmembran und Nukleolus	Beteiligt in der Biogenese des 60S prä-ribosomalen Partikels.
Noc3p	32		Letal	Nukleus und Nukleolus	Beteiligt im nukleolären / nukleären Transport 60S prä-ribosomalen Partikels.
Nop2	33		Letal	Nukleus und Nukleolus	Wird für die Biosynthese des 60S Partikels und die prä-RNA Prozessierung benötigt, Besitzt ATP/GTP bindendes Motiv (p-Loop).
Rix1p	33		Letal	Nukleus	Beteiligt beim Export der 60S Untereinheit
Noc2p	33	ja	Letal	Nukleus und Nukleolus	Beteiligt im nukleolären / nukleären Transport 60S prä-ribosomalen Partikels.
Sda1p	34		Letal	Nukleus	
Erb1p	35,36		Letal		Beteiligt in der Biogenese des 60S prä-ribosomalen Partikels.
Spb1p	36		Letal	Nukleus und Nukleolus	Beteiligt in der Biogenese des 60S prä-ribosomalen Partikels.
Dbp10p	37		Letal	Nukleus und Nukleolus	Besitzt ATP/GTP bindendes Motiv (p-Loop), gehört zur Familie der DEAD-Box RNA Helikasen, wird für die Biosynthese des 60S Partikels benötigt, besitzt ein NLS Signal.
YLR106c	38		Letal		Besitzt mehrere ATP/GTP bindende Motive (p-Loop)
Ribosomale L-Proteine	1-24	ja	Rpl1p (#14), Rpl2p (#17), Rpl3p (#24), Rpl4p (#21,22), Rpl5p (#18,19), Rpl6p (#10), Rpl7p (#14,15), Rpl8p (#17), Rpl9p (#11,13), Rpl11p (#9), Rpl12p (#8), Rpl13p (#14,15), Rpl14p (#5), Rpl15p (#11,12,15,16), Rpl16p (#11,12,13), Rpl18p (#11,12), Rpl19p (#13, 14), Rpl20p (#9,10), Rpl21p (#9), Rpl25p (#6), Rpl26p (#5), Rpl27p (#6,7), Rpl28p (#7), Rpl31p (#4), Rpl32p (#5), Rpl33p (#3), Rpl35p (#5), Rpl36p (#2,3), Rpl38p (#1), Rpl39p (#1)		

(Die Informationen in Tabelle 2 sind der YPD Datenbank (siehe Literatur 6.3 entnommen.)

konnte über Massenspektroskopie identifiziert werden. Interessanterweise wurden acht der nichtribosomalen Proteine (Nug1p, Nug2p, Noc2p, Kre32p, Has1p, YGR103w, YPL146c und Nog1p), zusammen mit dem Kernporenkomplex aufgereinigt (Rout et al., 2000; siehe Diskussion).

Um die Stabilität und das Sedimentationsverhalten des isolierten Komplexes zu analysieren, wurde das Eluat auf einen 10-50% Saccharosedichtegradienten aufgetragen (Abb.22B). Nach der Zentrifugation wurde das UV-Profil bestimmt. Hierbei wurde beobachtet, daß der Nug1p-Komplex ein ähnliches Sedimentationsverhalten wie die ribosomale 60S Unter-einheit zeigt (Abb. 22B). Der Nug1p-Komplex wurde aus dem Gradienten isoliert und parallel zu einem Eluat einer „normalen“ Aufreinigung (E) auf ein SDS-Gel aufgetragen (Spur G in Abb. 22A). Da beide Bandenmuster zueinander identisch waren, wurde gefolgert, daß die identifizierten Proteine stabil und spezifisch mit dem Nug1p-Komplex assoziiert sind.

Die Proteinzusammensetzung und das Sedimentationsverhalten des Nug1p-Komplexes lassen den Schluss zu, daß dieser ein prä-ribosomales Partikel repräsentiert. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde getestet, welche rRNA in dem Komplex vorhanden ist. Die RNA wurde extrahiert und durch Northernblot-Analyse bzw. „Primerextension“ charakterisiert (Baßler et al., 2001). Hierbei wurden signifikante Mengen an reifer 25S, 5.8S und 5S RNA sowie 27SB, 7S RNA-Vorstufen der 60S Untereinheit gefunden, jedoch nur Spuren an 18S bzw. keine 20S RNA, welche Bestandteil des 40S Komplexes sind (Übersicht zur rRNA Biogenese in *S. cerevisiae* siehe Einleitung 1.6 Abb. 5). Diese Daten zeigen, daß es sich bei dem isolierten Komplex um ein Gemisch sehr später Stufen des prä-ribosomalen 60S Komplexes handelt.

## 4. Diskussion und Ausblick

### 4.1 Repräsentiert der Nug1p-Komplex ein ribosomales Exportintermediat?

Der nukleäre Export der beiden ribosomalen Untereinheiten durch den Kernporenkomplex ins Zytoplasma ist bisher weitgehend unverstanden. Ein Problem bei der Aufklärung dieses Prozesses liegt in der engen Verknüpfung der Ribosomenbiogenese mit dem Exportprozess. Aufgrund der Überlappung beider Prozesse kann die Mutation eines Biogenesefaktors auch den Export beeinträchtigen, und umgekehrt. In der Vergangenheit wurden über genetische Ansätze zahlreiche Biogenesefaktoren identifiziert, jedoch erwies sich die Zuordnung von spezifischen Funktionen in der Ribosomenbiogenese als sehr schwierig.

Durch diese Arbeit konnte erstmals ein 60S prä-ribosomales Partikel gereinigt und charakterisiert werden. Interessanterweise besteht dieses Partikel, neben ribosomalen Proteinen und rRNA, aus 23 nichtribosomalen Proteinen. Ein Teil dieser Faktoren war bereits in ihrer Funktion bei der 60S Ribosomenbiogenese beschrieben, bzw. wurde parallel zu dieser Arbeit identifiziert und charakterisiert. Aufgrund der Präsenz von reifer 25S, 5S und 5.8S rRNA als auch 27S und 7S rRNA-Vorstufen ist zu vermuten, daß das gereinigte Partikel eine Mischung verschiedener 60S Zwischenstufen darstellt. Dies wird unterstützt durch das Sedimentationsverhalten des Nug1p-Komplexes.

Parallel zu dieser Arbeit konnten weitere prä-ribosomale Partikel über Nop7p-TAP und Nug2/Nog2p-TAP isoliert werden (Harnpicharnchai et al., 2001; Saveanu et al., 2001). Alle drei Komplexe repräsentieren ähnliche Biogenesestufen, da sie überwiegend die gleiche rRNA enthielten. Signifikante Unterschiede gab es jedoch in der Zusammensetzung der nichtribosomalen Proteine: Sowohl im Nop7p- als auch im Nug1p-Komplex wurden 23 dieser Faktoren identifiziert, jedoch waren nur etwa 50% der jeweiligen nichtribosomalen Proteine in beiden Komplexen enthalten. Innerhalb des Nug2p/Nog2p-Partikels konnten nur drei nichtribosomale Faktoren (Nug2p/Nog2p, Nog1p und Rlp24p) identifiziert werden. Diese

Unterschiede der prä-ribosomalen Partikel zeigen deutlich die Dynamik und Komplexität der Ribosomenbiogenese (siehe Warner, 2001).

Wenn man sich die Eigenschaften der nichtribosomalen Proteine des Nug1p-Komplexes anschaut, findet man sowohl zytoplasmatische, nukleäre und nukleoläre Faktoren (siehe Ergebnisse 3.3; Tabelle 2) als auch unterschiedliche Funktionen in der rRNA Prozessierung in entsprechenden Mutanten.

Beispielsweise besitzen Mutanten von Nip7p (Zachin et al., 1997; Zachin und Goldfabr, 1999), Tif6p (Basu et al., 2001) und Erb1p (Pestov et al., 2001) recht unspezifische und generelle rRNA Biogenesedefekte. Dagegen besitzt die größte Gruppe mit Nug2p/Nog2p (Baßler et al., 2001; Saveanu et al., 2001), Nop2p (Hong et al., 1997; 2001), Dbp10p (Burger et al., 2000) sehr spezifische Defekte bei der Prozessierung der 27S rRNA in 5.8S und 25S rRNA, was sich im Einklang mit der gereinigten rRNA im Nug1p Eluat befindet (Übersicht zur rRNA Biogenese siehe Einleitung 1.6 Abb. 5). Interessanterweise zeigen *nug1* und *rix1* Mutanten einen starken 60S Exportdefekt, jedoch keine Defekte in der RNA Prozessierung (Baßler et al., 2001). Dies spricht für eine Funktion bei einer sehr späten Stufe der 60S Biogenese bzw. bei dem Exportprozess.

Zwei Faktoren mit einer Rolle im ribosomalen Transportprozess sind Noc2p und Noc3p: Es wird diskutiert, daß die Noc-Proteine eine wichtige Rolle für den intranukleären Transport der Prä-Ribosomen besitzen (Milkereit et al., 2001): Noc2p bindet im Komplex mit Noc1p an das 90S Partikel im Nukleolus, während der weiteren Biogenese von 90S zum 66S Komplex wird Noc1p durch Noc3p ersetzt. Dieser Noc2p-Noc3p-Komplex ist Teil des 66S Partikels während der weiteren Prozessierung im Nukleoplasma und dem Export des 60S Ribosoms. Beide Komponenten des späten Noc-Komplexes konnten über Massenspektroskopie nachgewiesen werden. Weiter konnte durch Westernblot-Analyse gezeigt werden, daß Noc3p im Nug1p Eluat sehr stark angereichert wurde, Noc1p dagegen nicht vorhanden ist (Abb. 22C). Dies steht im Einklang mit dem Modell, daß der Nug1p-Komplex ein spätes 60S prä-ribosomales Partikel repräsentiert. Die beiden Proteine Rpl10p und Nmd3p, welche essentiell für den Xpo1p / RanGTP vermittelten 60S Export sind (Ho et al., 2000; Gadal et al., 2001b), konnten im Nug1p-Komplex nicht nachgewiesen werden. Nmd3p wirkt als Adapter

zwischen dem 60S Partikel/Rpl10p und dem Exportrezeptor Xpo1p. Das Fehlen dieser Faktoren könnte bedeuten, daß diese Faktoren noch nicht mit der 60S Vorstufe assoziiert sind oder unter den Bedingungen der Nug1p-Reinigung vom ribosomalen Komplex dissoziieren. Die letztere Version erscheint wahrscheinlicher, da die *rix5-1* Mutante (*rpl10-1*) signifikante rRNA Prozessierungsdefekte, wie beispielsweise eine Akkumulation von 35S und 27S rRNA zeigt (Gadal et al., 2001b). Weiter konnte Rpl10p als Komponente des Nop7p- und Nug2p/Nog2p-Komplexes identifiziert werden. Daraus kann geschlossen werden, daß Rpl10p bereits zu einem früheren Zeitpunkt Teil des prä-ribosomalen Komplexes ist.

Ein Hinweis dafür, daß der Nug1p-Komplex das ribosomale Exportsubstrat repräsentieren könnte, stammt von der Beobachtung, daß die ribosomalen Proteine und acht der identifizierten nichtribosomalen Proteine (Nug1p, Nug2p, Noc2p, Kre32p, Has1p, Nop7p, YPL146c und Nog1p), zusammen mit dem Kernporenkomplex cogereinigt wurden (Rout et al., 2000). Die Möglichkeit, daß diese acht Faktoren Verunreinigungen in der Kernporenreinigung darstellen, kann nicht ausgeschlossen werden. Es erscheint jedoch unwahrscheinlich, da Nug1p und Nug2p nicht sehr abundant sind und die Isolierung der Kernporen über mehrere Reinigungsschritte erfolgte. Weiter wurden in dieser Reinigung auch eine beträchtliche Anzahl Transportfaktoren, wie z.B. Mex67p, Imp , Imp , Kap123p, Kap122p gefunden. Daher ist es möglich, daß die acht nichtribosomalen Proteine Teil eines 60S Exportsubstrates sind, welches während der Translokation durch die Kernpore zusammen mit den Nukleoporinen aufgereinigt wurde. Ein wichtiger Aspekt zukünftiger Experimente ist die Bestimmung der nichtribosomalen Faktoren, die zwischen Zellkern und Zytoplasma hin- und herpendeln. Möglicherweise sind einige dieser Faktoren in der Lage direkt mit Nukleoporinen zu interagieren und so den ribosomalen Export zu vermitteln.

## 4.2 Welche Bedeutung haben GTPasen, insbesondere Nug1p für den ribosomalen Export?

Interessanterweise sind viele der nichtribosomalen Proteine des Nug1p-Komplexes essentielle GTPasen oder ATPasen, wie beispielweise die DEAD Box Helikasen Has1p und Dbp10p (De la Cruz et al., 1999), Nog1p, Nop2p sowie Nug1p und Nug2p. Deren Rolle in der Biogenese bzw. dem Export ist bisher unklar. Möglicherweise werden durch die GTP/ATP Hydrolyse verschiedene Schritte reguliert. Eventuell sind diese Faktoren für die Bereitstellung von zusätzlicher Energie nötig und induzieren Konformationsänderung des Prä-Ribosomes, um so den Export ins Zytoplasma zu ermöglichen.

Auch das größte bekannte Protein aus *S. cerevisiae* YLR106cp (4910 aa, 559kDa), welches sechs AAA<sup>+</sup> Motive besitzt, gehört zu dieser Gruppe von ATPasen. Diese ATPase-Domänen zeigen Homologie zu bakteriellen Chaperonen, die eine Rolle bei der Assemblierung oligomerer Komplexe spielen. Daher scheint es wahrscheinlich, daß YLR106cp eine Kette von kovalent verknüpften Chaperonen repräsentiert, welche essentiell für die 60S Biosynthese sind. Ein weiterer interessanter Aspekt zukünftiger Experimente ist daher die Analyse der Struktur von prä-ribosomalen Komplexen im Vergleich zu reifen 60S Untereinheiten. Es ist zu erwarten, daß die Größe und Form der prä-ribosomalen Partikel Aufschluss über die Biogenese und den nukleären Export geben.

Bisher ist Ran/Gsp1p (siehe Einleitung 1.3) die einzige GTPase, die direkt beim nukleozytoplasmatischen Transport (siehe Künzler und Hurt, 2001, Kuersten et al., 2001) und auch beim ribosomalen Export beteiligt ist (Moy et al., 1999; Ho et al., 2000; Gadal et al., 2001). Da Nug1p keine auffälligen rRNA Prozessierungsdefekte besitzt, genetisch mit dem Exportfaktor Mtr2p interagiert und mit der Kernpore reinigt, ist für Nug1p eine ähnliche Funktion denkbar, die sich auf den Export der großen ribosomalen Untereinheit beschränkt. Bisher ist noch nicht bekannt, ob die GTPase-Aktivität von Nug1p durch ein GTPase aktivierendes Proteine (GAP) stimuliert werden muss. Wenn ja, könnte die GTP Hydrolyse von Nug1p ein Exportsignal auslösen, indem Faktoren mit einem Retentionsignal vom

prä-ribosomalen Komplex entfernt werden oder Exportfaktoren zum prä-ribosomalen Komplex rekrutiert werden. Um die spezifische Funktion von Nug1p im 60S Export aufzuklären, muss zum einen die GTPase-Aktivität charakterisiert werden. Zum anderen müssen über genetische Screens oder biochemische Analysen direkte Interaktionspartner von Nug1p identifiziert werden.

### 4.3 Welche Rolle spielen Mtr2p und Ecm1p im ribosomalen Export?

Ein unerwartetes Ergebnis dieser Arbeit war, daß der mRNA-Exportfaktor Mtr2p (Kadowaki et al., 1994b; Santos-Rosa et al., 1998; Sträßer et al., 2000) beim ribosomalen 60S Export beteiligt ist. Es wurde beobachtet, daß die *mtr2-33* Mutante einen starken ribosomalen 60S Exportdefekt, jedoch keine Beeinträchtigung im Export von mRNA zeigt. Die allelspezifischen genetischen Interaktionen von *mtr2-33* zu *ecm1Δ*, *nmd3-2* und *nug1-1* unterstreichen eine Beteiligung beim ribosomalen Export der großen Untereinheit. Somit konnte erstmals gezeigt werden, daß Mtr2p eine Rolle im Export von Ribosomen ausübt. Bereits in früheren Experimenten wurde beobachtet, daß die *mtr2-1* Mutante (Kadowaki et al., 1994b) unter restriktiven Bedingungen den ribosomalen Reporter Rpl11p-GFP im Kern akkumuliert (Stage-Zimmermann et al., 2000). Hierbei blieb jedoch die Frage offen, ob dies ein primärer oder sekundärer Defekt ist, da *mtr2-1* auch einen starken Poly(A)<sup>+</sup> RNA-Exportdefekt zeigt (Kadowaki et al., 1994b).

Die Beobachtung, daß keine der *mex67* Mutanten ribosomale Exportdefekte aufweist, lässt schließen, daß die neue Funktion von Mtr2p unabhängig von Mex67p ist. Es ist nicht vollkommen auszuschließen, daß Mex67p doch beim ribosomalen Export beteiligt ist. Es wäre denkbar, daß lediglich noch keine geeignete *mex67* Mutante existiert, die einen 60S Exportdefekt aufweist. Interessanterweise befindet sich Mtr2p noch an der Kernpore, auch wenn Mex67p im Zytoplasma misslokalisiert ist (Santos-Rosa., 1998). Daher könnte eine Fraktion von Mtr2p eine Funktion an der Kernpore haben, die unabhängig von

Mex67p ist. Wie kann Mtr2p unabhängig von Mex67p mit der Kernpore interagieren? Eine interessante Beobachtung war in diesem Zusammenhang, daß für das funktionelle Mtr2p-Homolog in menschlichen Zellen NXT1 (Katahira et al., 1999) eine Funktion bei mehreren Exportprozessen diskutiert wird (Ossareh-Nazari et al., 2000; Black et al., 2001). NXT1, das vermutlich auch eine Mtr2p-ähnliche Faltung besitzt (Katahira et al., 1999; Suyama et al., 2000), hat eine ähnliche Struktur wie NTF2 (Fribourg et al., 2001). NTF2 ist in der Lage Homodimere zu bilden und direkt mit Nukleoporinrepeats zu interagieren (Bullock et al. 1996; Bayliss et al., 1999; Chaillan-Huntington et al., 2000). Möglicherweise besitzen auch NXT1 und Mtr2p diese Eigenschaften. So wurde eine direkte Interaktion zwischen NXT1 und dem Nukleoporin p62 gefunden, welche unabhängig vom Mex67p Homolog TAP ist (Levesque et al., 2001).

Welche spezifische Rolle Mtr2p beim Exportprozess der großen ribosomalen Untereinheit spielt bleibt jedoch offen. Um diese Frage zu klären, müssen zuerst die 60S Exportfaktoren identifiziert werden, die biochemisch mit Mtr2p interagieren und so die Bindung der ribosomalen Partikel zu Mtr2p und der Kernpore vermitteln.

Die Rolle von Ecm1p im ribosomalen Export bleibt ebenfalls unklar. Ecm1p konnte nicht als Komponente des gereinigten 60S prä-ribosomalen Komplexes identifiziert werden. Die ribosomalen Exportdefekte in den *mtr2-33 ecm1Δ* und *nug1-1 ecm1Δ* Mutante, sowie die spezifische genetische Interaktion zu *MTR2*, *NUG1* und *RPL2A* legen jedoch eine direkte Funktion in der Biogenese bzw. im Export des 60S Partikels nahe. Unterstützt wird dies durch die nukleäre / nukleoläre Lokalisation von Ecm1p. Aufgrund der engen genetischen Beziehung zwischen Ecm1p und Nug1p kann man annehmen, daß auch Ecm1p beim gleichen Prozess wie Nug1p beteiligt ist. Ob Ecm1p hierbei eine eventuelle Funktion als Cofaktor von Nug1p besitzt, muss durch weitere Experimente erst noch erforscht werden.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Molekularbiologische Methoden

#### 5.1.1 Allgemeine Methoden zur DNA Manipulierung

Allgemeine Methoden zur DNA Manipulierung wie Restriktionsverdau von Plasmiden, Ligation von DNA-Fragmenten, Polymerasekettenreaktionen, Auftrennung und Analyse von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese sowie Methoden mit *E. coli* wie Plasmidtransformation, Kultivierung, Herstellung elektrokompenter Zellen wurden nach Maniatis et al (1989) durchgeführt. Dabei wurde ausschließlich der *E. coli* Stamm DH5<sup>-</sup> (F<sup>-</sup> 80d (*lacZ*)M15) *recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17* (*r<sub>k</sub>-m<sub>k</sub>*+) *supE44 relA1 deoR* (*lacZYA-argF*) U169) benutzt. DNA Isolierung aus Agarosegele wurde mit dem Qiaquick Gelextractionkit (Qiagen,Hilden), DNA Isolierung aus *E. coli* mit dem QiaprepSpin MiniprepKit (Qiagen/Hilden) bzw. mit Nucleobond AX (Macherey-Nagel/Düren) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Restriktionsenzyme wurden von MBI (St. Leon-Rot) bezogen. Für PCR-Reaktionen wurde das Expand High Fidelity PCR System (Roche/Mannheim) benutzt. Oligonukleotide wurden von Interaktiva (Ulm) bezogen und Sequenzierungen wurden von der Firma Toplab (Martinsried) durchgeführt.

#### 5.1.2 Verwendete Plasmide

Die folgenden Plasmide existierten zu Beginn dieser Arbeit und wurden bereits an andere Stelle beschrieben und publiziert: pUN100-DsRed-NOP1, pRS314-DsRed-NOP1, pRS316-RPL25-eGFP, pRS315-RPL25-eGFP, pRS314-NMD3, pRS314-nmd3-2, pRS315-RPS20-eGFP (Gadal et al., 2001b), pRS315-MTR2, pRS315-mtr2-21, Yep13-MTR2 (Santos-Rosa et al., 1998), pRS314-MEX67, pRS314-mex67-5, pHT4467 (Segref et al., 1997), pRS314-mex67-6 (Sträßer und Hurt, 2000), pRS314, pRS315 (Sikorski und Hieter, 1989), pRS416-NUG2 (Euroscarf),

pBS1479 (Rigaut et al., 1999), ptf27 (Fiedler et al., 2001 submitted), pAT2 (Kochendörfer et al., 1999).

Folgende Plasmide wurden im Verlauf dieser Arbeit hergestellt und wurden folgendermaßen hergestellt: pHT4467 (*CEN6Δ*, *ADE3*, *URA3*): Das *PvuI* Fragment von pHT4467 wurde durch das *PvuI* Fragment von ptf27 (In pRS316 wurde das 24 bp *Swal/PmlI* Fragment in der *CEN6* Region deletiert. (*CEN6Δ*, *URA3*) ersetzt. pHT4467 -ECM1 (*CEN6Δ*, *ADE3*, *URA3*, *ECM1*): Das *ECM1* enthaltende 1.3 kbp *Apal/BamHI* Fragment von pRS315-ECM1 wurde in *Apal/BamHI* von pHT4467 kloniert. pHT4467 -MTR2 (*CEN6Δ*, *ADE3*, *URA3*, *MTR2*): Das *MTR2* enthaltende *SalI/XbaI* („blunt-end“) Fragment von pRS315-MTR2 wurde in *SalI/SmaI* von pHT4467 kloniert. pRS315-ECM1 (*CEN6Δ*, *LEU2*, *ECM1*): Das genomische 1.3 kbp *Apal/BamHI* *ECM1* Fragment aus pUN100-ECM1 (siehe Material und Methoden 5.2.3) wurde in *Apal/BamHI* von pRS315 kloniert. pRS314-ECM1 (*CEN6Δ*, *TRP1*, *ECM1*): Das 1.3 kbp *Apal/SpeI* *ECM1* Fragment aus pRS315-ECM1 wurde in *Apal/SpeI* von pRS314 kloniert. pRS314-MTR2 (*CEN6*, *TRP1*, *MTR2*): Das *SalI/XbaI* *MTR2* Fragment von Yep13-MTR2 wurde in *SalI/BclI* von pRS314 kloniert. pRS314-mtr2-21 (*CEN6*, *TRP1*, *mtr2-21*): Das 2.2 kbp *Apal/SacI* *mtr2-21* Fragment aus pRS315-mtr2-21 wurde in *Apal/SacI* von pRS314 kloniert. pRS315-mtr2-33 (*CEN6*, *LEU2*, *mtr2-33*): Das 2.2 kbp *Apal/SacI* *mtr2-33* Fragment aus pRS314-mtr2-33 (siehe Material und Methoden 5.1.3) wurde in *Apal/SacI* von pRS315 kloniert. pRS315-NUG1 (*CEN6*, *LEU2*, *NUG1*): Das 4.2 kbp *XhoI/SacI* *NUG1* Fragment aus pUN100-NUG1 wurde in *XhoI/SacI* von pRS315 kloniert. pRS316-NUG1 (*CEN6*, *URA3*, *NUG1*): Das 4.2 kbp *XhoI/SacI* *NUG1* Fragment aus pUN100-NUG1 (siehe Material und Methoden 5.2.3) wurde in *XhoI/SacI* von pRS316 kloniert. pRS315-NUG2 (*CEN6*, *LEU2*, *NUG2*): Das 2.7 kbp *XhoI/NotI* *NUG2* Fragment aus pRS416-NUG2 (Euroscarf) wurde in *XhoI/NotI* von pRS315 kloniert. pRS315-RPL2A (*CEN6*, *LEU2*, *RPL2A*) wurde in zwei Schritten kloniert: Das genomische Fragment *XhoI/NheI* Fragment (3.4 kbp) aus pUN100-RPL2A (siehe Material und Methoden 5.2.3) wurde in *XhoI/NheI* von pRS315 kloniert. Aus diesem resultierendem Plasmid pRS315-RPL29-YFR032c-RPL2A (*CEN6*, *LEU2*, *RPL29*, *YFR032c*, *RPL2A*) wurde

anschließend das *SacI* Fragment entfernt, was zu pRS315-RPL2A führt. pRS315-ECM1-eGFP (*CEN6*, *LEU2*, *ECM1-eGFP*, *tRPS20*): Der *ECM1* ORF wurde am C-terminalen Ende mit *eGFP* fusioniert. Hierzu wurde der *ECM1* ORF über PCR mit folgenden Oligonukleotiden amplifiziert: T<sub>5</sub>TCTAGATAATGACAAA ATAATAT TTGGGG and T<sub>5</sub>GGATCCTTCTTCAACATCGTCT GGCAG. Vorlage war hierbei pRS315-ECM1. Diese PCR ergibt ein Fragment mit authentischer 5'-UTR Promotorregion und Deletion des Stoppcodons. Das PCR Fragment wurde anschließend mit *XbaI/BamHI* verdaut und damit das *XbaI/BamHI RPS20* Fragment in pRS315-RPS20-eGFP ersetzt. Dies resultiert in einem *ECM1-eGFP* ORF mit *ECM1* Promotor und *RPS20* Terminator. pRS315-NUG1-eGFP (*CEN6*, *LEU2*, *NUG1-eGFP*, *tRPS20*): Analog zu pRS315-ECM1-eGFP wurde der *NUG1* ORF mit den Oligonukleotiden T<sub>5</sub>CCGCGGAGGAGCACGAACCACAAAGGA / T<sub>5</sub>GGATCC TTCCATCATTGTATCTTGATCTTT vom Plasmid pUN100-NUG1 amplifiziert. Das PCR Fragment wurde mit *BamHI/SacI* verdaut, um damit den *ECM1* ORF in pRS315-ECM1-eGFP zu ersetzen. pRS315-NUG2-eGFP (*CEN6*, *LEU2*, *NUG2-eGFP*, *tRPS20*): Dieses Plasmid wurde analog zu pRS315-NUG-TAP hergestellt. Hierbei wurde die Oligonukleotide T<sub>5</sub>CCGCGGCGTGGAGC AAAGTAAGATGAT ACA / T<sub>5</sub>CCATGGAT GCCGTCTTCTCAACTTCTTTCTT, das Plasmid pRS416-NUG2 und die Restriktionsenzyme *SacII/NcoI* benutzt. pRS315-ECM1-TAP (*CEN6*, *LEU2*, *ECM1-CBP-TEV-ProteinA-ProteinA*, *tADH1*): Das 1.1 kbp *BamHI/XhoI* Fragment von pRS315-ECM1-eGFP mit *eGFP* und *RPS20* Terminator wurde durch das 575 bp *BamHI/PstI* TAP Fragment aus pBS1479 und das 0.5 kbp *PstI/XhoI* Fragment, welches den *ADH1* Terminator enthält, ersetzt. pRS315-NUG1-TAP (*CEN6*, *LEU2*, *NUG1-CBP-TEV-ProteinA-ProteinA*, *tADH1*): Der *eGFP* ORF und der *RPS20* Terminator in pRS315-NUG1-eGFP wurde mit dem 1.1 kbp *BamHI/XhoI* Fragment mit *TAP* ORF und *ADH1* Terminator aus pRS315-ECM1-TAP ersetzt. Analog dazu wurde pRS315-NUG2-TAP (*CEN6*, *LEU2*, *NUG2-CBP-TEV-ProteinA-ProteinA*, *tADH1*) hergestellt.

Die Herstellung bzw. Isolierung der Plasmide pRS314-mtr2-33, pRS315-nug1-1, pRS315-nug1-2 und pRS315-nug2-1 ist in Kapitel 5.1.2 beschrieben, die der Plasmide pUN100-ECM1, pUN100-NUG1 und pUN100-RPL2A in Material und Methoden 5.3.2.

### 5.1.2 Herstellung und Isolierung der *mtr2-33*, *nug1-1*, *nug1-2* und *nug2-1* Mutanten

Die *mtr2-33* Mutante (pRS314-*mtr2-33* (*CEN6*, *TRP1*, *mtr2-33*)) wurde aus den Plasmiden pRS315-*mtr2-22* und pRS314-*MTR2* hergestellt. pRS315-*mtr2-22* wurde aus einer Kollektion von *MTR2*-Mutanten (Santos-Rosa et al., 1998) isoliert (Santos-Rosa, unveröffentlichte Daten). Das mutierte *PstI* Fragment von *mtr2-22* (E106G, R109G, D155G) wurde benutzt, um das *PstI* Wildtyp Fragment in pRS314-*MTR2* zu ersetzen. Dadurch wurde ein Teil der *mtr2-22* Mutationen in den *MTR2* Wildtyp ORF eingeführt. Die daraus resultierend *mtr2-33* Mutante wurde sequenziert und besitzt zwei Punktmutationen in der Aminosäuresequenz (E106G, R109G). Die *nug1-1* Mutante wurde durch PCR aus dem Hefestamm SL37 amplifiziert. Dazu wurden die Oligonukleotide T<sub>5</sub>CTGCAGCT GACAATGCT TCGTAAAACG und T<sub>5</sub>GGATCCTTCCATCATTGTATCTTGATCTT benutzt und in *SacII/PstI* von pRS314 kloniert. DNA Sequenzierung ergab eine Punktmutation (R420P) in der Aminosäuresequenz von Nug1p. Die *nug1-2* Mutante wurde mittels PCR Mutagenese und homologer Rekombination nach Muhlrads et al (1992) und Santos-Rosa et al (1998) hergestellt: das *NUG1* Gen mit den Oligonukleotiden T<sub>5</sub>CTGCAGCTGACAATGCTTCGTAAAACG und T<sub>5</sub>GGATCCTTCCATCATTGTATCTTGATCTT wurde unter mutagenen Bedingungen (Taq Polymerase (Gibco/Eggenstein), 2mM MgCl<sub>2</sub>, 10% DMSO, dGTP, dUTP, dCTG je 2,5 mM, 0,5 mM dATP) amplifiziert. Mittels Restriktionsverdau *XbaI/NdeI* wurde aus pRS315-*NUG1* der *NUG1* ORF entfernt und zusammen mit dem PCR-Fragment in den *NUG1* shuffle Stamm transformiert. Etwa 5000 Transformanten wurden auf SDC+FOA ausgestrichen und anschließend auf YPD bei 23°C und 37°C auf einen ts Phänotyp untersucht. Die Plasmide von ts Mutanten wurden isoliert, retransformiert und die Plasmidabhängigkeit des ts Phänotypes zu zeigen. DNA Sequenzierung von *nug1-2* ergab folgende Punktmutationen (K22R, L61S, Q81R, Q202R, T409A, L415S) in der Aminosäuresequenz von Nug1p. *nug2-1* wurde im Rahmen eines Praktikums von T. Leßmann (2001) analog zu *nug1-2* hergestellt. Benutzt wurden die Oligonukleotide T<sub>5</sub>CCGCGGCGTGGAGCAAAGTAAGATGATACA und T<sub>5</sub>CTG GAGCGTTTGAATGACTGGTATAATGA sowie die Enzyme *NotI* und *XhoI*.

## 5.2 Mikrobiologische Methoden für *S. cerevisiae*

### 5.2.1 Allgemeine Arbeitsmethoden

Hefestämme wurden nach Shermann (1991) kultiviert. Hierbei wurden folgende Medien benutzt:

YPD: 40 g Yeast Extract of autolyzed cells (Difco), 80 g BACTO Peptone (Difco), 80 g Glucose, 4 l H<sub>2</sub>O, pH 5.5

YPD + Geneticin: 200 mg Geneticin (Sigma) pro 1 l Medium.

YPD + Calcofluorweiß 20 mg Calcofluorweiß (Sigma) pro 1 l Medium, pH 6,5.

SDC-X: 27 g Yeast Nitrogen Base w/0 AA (Difco), 80 g Glucose, 3 g CSM-X (Qbiogene/Heidelberg), 4 l H<sub>2</sub>O, pH 5.5

SDC-XY: 13.5 g Yeast Nitrogen Base w/0 AA (Difco), 40 g Glucose, 1.5 g CSM-XY (QBio), 2 l H<sub>2</sub>O, pH 5.5.

Für feste Medien wurde pro 1 l Medium 20 g Agar (Becton&Dickinson/Heidelberg) zugegeben.

SDC+FOA-Platten: 2 g 5-FOA (SIGMA), 13.5 g Yeast Nitrogen Base w/0 AA (Difco), 40 g Glucose, 1.6 g CSM (Qbiogene/Heidelberg), 2 l H<sub>2</sub>O, 40 g Agar (FLUKA).

SDC-all-Platten: 27 g Yeast Nitrogen Base w/0 AA (Difco), 80 g Glucose, 2.2 g CSM-Ade-His-Leu-Lys-Trp-Ura (Qbiogene/Heidelberg), 4 l H<sub>2</sub>O, pH 5.5 (2M NaOH), Zugabe von 80 g Agar (FLUKA).

SPOR-Platten: 0.44 g Raffinose, 6 g KOAc, 2 l MP-H<sub>2</sub>O, 40 g Agar (FLUKA)

Zusammensetzung von CSM+all [mg/l]: Adenin 10, L-Arginin 50, L-Asparaginsäure 80, L-Histidin-HCl 20, L-Isoleucin 50, L-Leucin 100, L-Lysin-HCl 50, L-Methionin 20, L-Phenylalanin 50, L-Threonin 100, L-Tryptophan 50, L-Tyrosin 50, Uracil 20, Valin 140.

Hefetransformationen mit Plasmiden und DNA-Fragmenten wurde nach Ito et al (1983) durchgeführt. Isolierung genomischer DNA aus Hefe wurde mit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen/Hilden) nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Isolierung von Plasmiden wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt: Etwa 50 - 100  $\mu$ l Zellen frische Zellen wurden in 200  $\mu$ l Lysepuffer (Zusammensetzung: 10 ml 10xTE, 584 mg NaCl, 1 g SDS, 2 g Triton-X-100 auf 100 ml mit H<sub>2</sub>O auffüllen), 200  $\mu$ l Chloroform/Phenol/Amylalkohol-Lösung (50:49:1) und ca. 50  $\mu$ l Glasbeads resuspendiert und 3 min gevortext. Nach Zentrifugation (5 min, 14000 rpm) wurde 2  $\mu$ l der oberen wässrigen Phase elektrokompetente *E. coli* transformiert. Kreuzung von Hefestämmen (Erzeugen von Diploiden, Sporulation, Tetradenseparation und Tetradenanalyse) wurde nach Sherman (1989) durchgeführt. Herstellung sogenannter Doppelshuffle Stämme siehe Material und Methoden 5.2.3.

## 5.2.2 Verwendete Hefestämme

Die folgenden Hefestämme existierten zu Beginn dieser Arbeit bzw. wurden bereits an andere Stelle beschrieben und publiziert.

Hefestamm	Genotyp	Referenz
RS453	<i>MATa</i> und <i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>ura3</i> , <i>trp1</i> , <i>leu2</i> , <i>ade2</i> , <i>his3</i>	Hurt et al., 1999
<i>NMD3 shuffle</i>	<i>MATa</i> , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>lys2</i> , <i>ura3</i> , <i>nmd3::kanMX4</i> + <i>pRS316-NMD3 (ARS/CEN URA3 NMD3)</i>	Gadal et al., 2001b
<i>MTR2 shuffle</i>	<i>MATa</i> und <i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>ura3</i> , <i>trp1</i> , <i>leu2</i> , <i>ade2</i> , <i>his3</i> , <i>mtr2::HIS3</i> + <i>pRS316-MTR2 (ARS/CEN URA3 MTR2)</i>	Santos-Rosa et al., 1998
<i>MEX67 shuffle</i>	<i>MATa</i> und <i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>ura3</i> , <i>trp1</i> , <i>leu2</i> , <i>ade2</i> , <i>his3</i> , <i>mex67::HIS3</i> + <i>pRS316-MEX67 (ARS/CEN URA3 MEX67)</i>	Segref et al., 1997
ATY300 ( <i>sac1</i> $\Delta$ )	<i>MATa</i> , <i>his3</i> , <i>leu2::GAL1-lacZ</i> , <i>lys2</i> , <i>ura3</i> , <i>ade2</i> , <i>sac1::HIS3</i>	Kochendörfer et al., 1999
Y10348 ( <i>ecm1</i> $\Delta$ )	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>ura3</i> , <i>lys2</i> , <i>leu2</i> , <i>ecm1::kanMX4</i>	Euroscarf

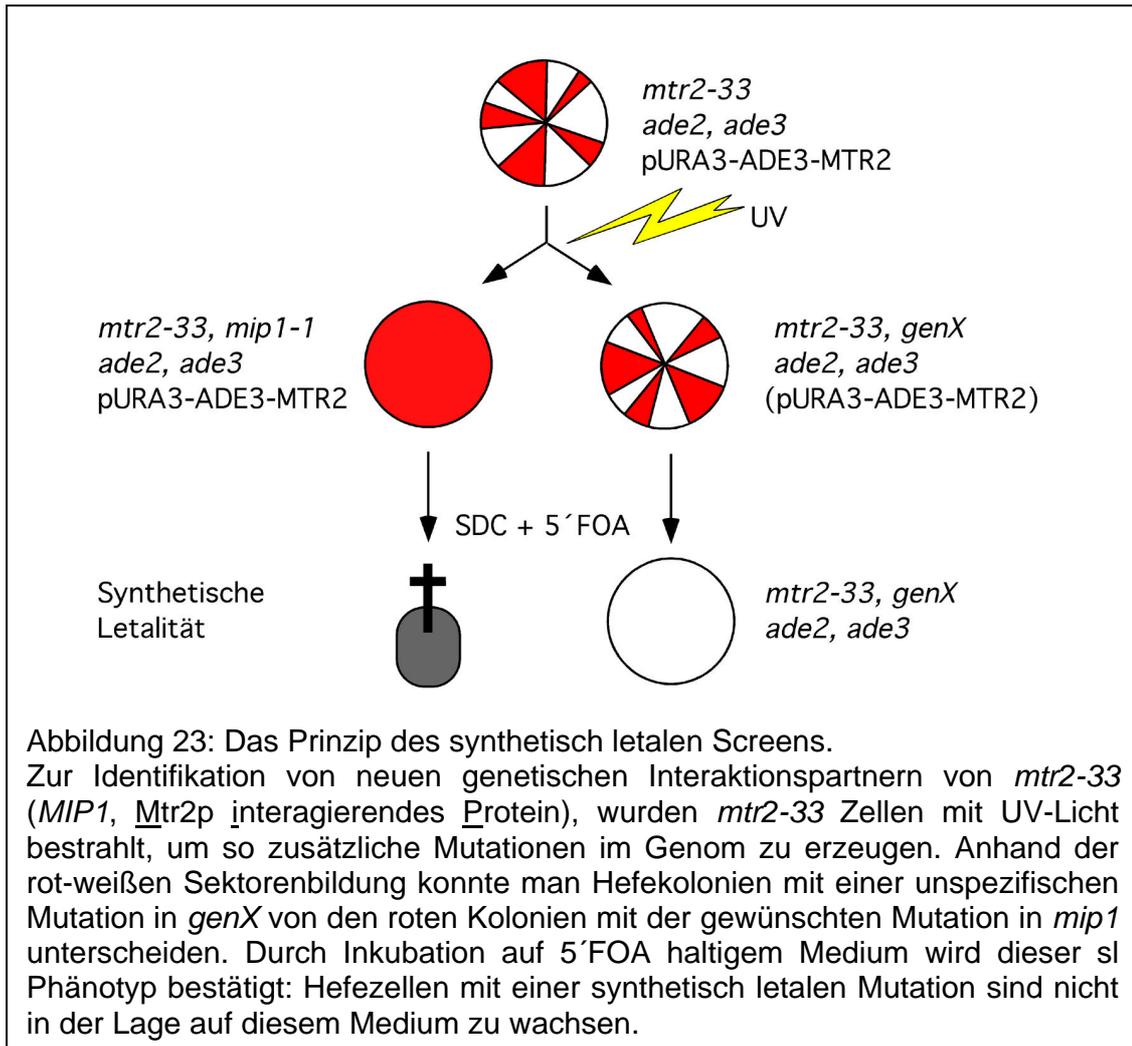
Die folgenden Hefestämme wurden im Verlauf dieser Arbeit hergestellt:

<b>Hefestamm</b>	<b>Genotype</b>
<i>MTR2sc</i>	<i>MATa, ura3, trp1, leu2, ade2, ade3, his3, mtr2::HIS3</i> +pHT4467- <i>MTR2</i> (ARS/CEN ADE3 URA3 <i>MTR2</i> ) +pRS314- <i>mtr2-33</i> (ARS/CEN TRP1 <i>mtr2-33</i> )
<i>SL178</i>	<i>MATa, ura3, trp1, leu2, ade2, ade3, his3, mtr2::HIS3, ecm1-1</i> +pHT4467- <i>MTR2</i> (ARS/CEN ADE3 URA3 <i>MTR2</i> ) +pRS314- <i>mtr2-33</i> (ARS/CEN TRP1 <i>mtr2-33</i> )
<i>ecm1Δ</i>	<i>MATa, ura3, leu2, trp1, ade2, ecm1::kanMX4</i>
<i>MTR2 shuffle / ecm1Δ</i>	<i>MATa, ura3, leu2, trp1, ade2, mtr2::HIS3, ecm1::kanMX4</i> +pRS316- <i>MTR2</i> (ARS/CEN URA3 <i>MTR2</i> )
<i>MEX67 shuffle / ecm1Δ</i>	<i>MATa, ura3, leu2, trp1, ade2, mex67::HIS3, ecm1::kanMX4</i> +pRS316- <i>Mex67</i> (ARS/CEN URA3 <i>MEX67</i> )
<i>YRA1 shuffle / ecm1Δ</i>	<i>MATa, ura3, leu2, trp1, ade2, mtr2::HIS3, ecm1::kanMX4</i> +pRS316- <i>YRA1</i> (ARS/CEN URA3 <i>YRA1</i> )
<i>MTR2/NMD3 double shuffle</i>	<i>MATa, his3, ura3, leu2, trp1, ade2, mtr2::HIS3, nmd3::kanMX4</i> +pRS316- <i>MTR2</i> (ARS/CEN URA3 <i>MTR2</i> ) +pRS316- <i>NMD3</i> (ARS/CEN URA3 <i>NMD3</i> )
<i>MEX67/NMD3 double shuffle</i>	<i>MATa, his3, ura3, leu2, trp1, ade2, LYS2, mex67::HIS3, nmd3::kanMX4</i> +pRS316- <i>MEX67</i> (ARS/CEN URA3 <i>MEX67</i> ) +pRS316- <i>NMD3</i> (ARS/CEN URA3 <i>NMD3</i> )
<i>ECM1 sc</i>	<i>MATα, ura3, leu2, trp1, ade2, ade3, ecm1::kanMX4</i> +pHT4467- <i>ECM1</i> (ARS/CEN ADE3 URA3 <i>ECM1</i> )
<i>SL37</i>	<i>MATα, ura3, leu2, trp1, ade2, ade3, ecm1::kanMX4, nug1-1</i> +pHT4467- <i>ECM1</i> (ARS/CEN ADE3 URA3 <i>ECM1</i> )
<i>SL147</i>	<i>MATα, ura3, leu2, trp1, ade2, ade3, ecm1::kanMX4 rpl2a-1</i> +pHT4467- <i>ECM1</i> (ARS/CEN ADE3 URA3 <i>ECM1</i> )
<i>NUG1 shuffle (TRP1)</i>	<i>MATa und MATα, ura3, TRP1, leu2, his3, lys2 nug1::kanMX4</i> +pRS316- <i>NUG1</i> (ARS/CEN URA3 <i>NUG1</i> )
<i>NUG1 shuffle</i>	<i>MATa, his3, ura3, leu2, trp1, ADE2, LYS2, nug1::kanMX4</i> +pRS316- <i>NUG1</i> (ARS/CEN URA3 <i>NUG1</i> )
<i>MTR2/NUG1 Doppelshuffle Stamm</i>	<i>MATα, his3, ura3, leu2, trp1, ADE2, LYS2, mtr2::HIS3, nmd3::kanMX4</i> +pRS316- <i>MTR2</i> (ARS/CEN URA3 <i>MTR2</i> ) +pRS316- <i>NUG1</i> (ARS/CEN URA3 <i>NUG1</i> )
<i>NUG1 shuffle / ecm1Δ</i>	<i>his3, ura3, leu2, trp1, ADE2, lys2 ecm1::kanMX4, nug1::kanMX4</i> +pRS316- <i>NUG1</i> (ARS/CEN URA3 <i>NUG1</i> )
<i>NUG1/MEX67 Doppelshuffle Stamm</i>	<i>MATα, his3, ura3, leu2, trp1, ade2, lys2 mex67::HIS3, nug1::kanMX4</i> +pRS316- <i>MEX67</i> (ARS/CEN URA3 <i>MEX67</i> ) +pRS316- <i>NUG1</i> (ARS/CEN URA3 <i>NUG1</i> )
<i>NUG2 shuffle (TRP1)</i>	<i>MATa und MATα, ura3, TRP1, leu2, his3, lys2 nug2::kanMX4</i> +pRS416- <i>NUG2</i> (ARS/CEN URA3 <i>NUG2</i> )
<i>NUG2 shuffle</i>	<i>MATα, ura3, trp1, leu2, his3, lys2 nug2::kanMX4</i> +pRS416- <i>NUG2</i> (ARS/CEN URA3 <i>NUG2</i> )

### 5.2.3 Bestimmung der genetischen Interaktion zweier Gene

**A. Direkte Analyse:** Die Disruptionsstämme der gewünschten Gene wurden gekreuzt. (Sherman 1989; Santos-Rosa et al., 1998). Zur Herstellung eines „Doppelshuffle-Stammes“ (bei zwei essentiellen Genen) wurde hierfür ein shuffle Stamm und ein Disruptionsstamm, komplementiert mit einer *ts* Mutante, benutzt (siehe Sträßer et al., 2000). Nach Sporulation und Tetradenanalyse wurde die Spore mit der gewünschten Doppeldisruption mit dem zur *ts* Mutante korrespondierenden pURA3 wt Gen transformiert und bei restriktiver Temperatur (37°C) selektioniert. Anschließend wurden die Transformanten auf Verlust des *ts* Mutanten selektioniert. Zur Analyse der genetischen Interaktion wurden diese Disruptionsstämme (komplementiert mit pURA3 Plasmiden) mit den gewünschten Mutanten transformiert und das Wachstum auf SDC+FOA analysiert. FOA ist toxisch für Zellen die *URA3* exprimieren und zwingt diese zum Verlust der Wildtyp-Plasmide. Daher zeigt Nichtwachstum auf SDC+FOA synthetische Letalität an.

**B. Suche nach genetisch interagierenden Genen (sl Screen):** Die synthetisch letalen Screens (Methode siehe Doye und Hurt, 1995) mit *mtr2-33* und *ecm1Δ* wurden nach Wimmer et al (1992) bzw. Segref et al (1997) durchgeführt. Synthetische Letalität bezeichnet den Zelltod aufgrund der Kombination zweier nicht letaler Mutationen. Zur Identifikation von neuen Faktoren, die genetisch mit *mtr2-33* interagieren, wurde der Hefestamm *MTR2sc* (*ade2*, *ade3*) mit UV-Licht (ca. 10% Überlebensrate) bestrahlt, um so synthetisch letale Mutation zu erzeugen. Um mit den gewünschten Mutanten arbeiten zu können, wurde der Hefestamm *MTR2sc* mit dem pURA3-ADE3-MTR2 Plasmid komplementiert. Der *ADE3* Marker ermöglicht beim sl-Screen die farbliche Unterscheidung (siehe Abb. 23) zwischen Mutanten, die das Plasmid verlieren können (nicht sl, rot-weiße-Sektorenbildung) und den gesuchten Mutanten, welche auf die Präsenz des Plasmids angewiesen sind (sl, rote Kolonienfarbe). Um die Suche nach roten sl Kandidaten zu erleichtern, wurde ein pURA3-ADE3-MTR2 Plasmid verwendet, welches eine Deletion von 24 bp im *CEN6*-Bereich besitzt (Fiedler et al., submitted, siehe Material und Methoden 5.1.2). Dadurch kann das Plasmid bei der



Zellteilung schneller verloren werden, was eine Unterscheidung zwischen roten roten sl Kandidaten und sektorierenden Zellen enorm erleichtert. Der sl-Phänotyp der roten Kolonien wurde durch Nichtwachstum auf SDC+FOA Platten bestätigt, da FOA toxisch für *URA3* exprimierende Zellen ist.

Analog wurde Screen mit der *ecm1Δ* Mutante durchgeführt. Positive sl-Kandidaten wurden mit einer Hefebibliothek (Wimmer et al., 1992; Segref et al., 1997) transformiert, um die mutierten Gene über Komplementation des sl-Phänotyps zu klonieren. Dadurch wurden die Plasmide pUN100-ECM1 bei SL178, pUN100-NUG1 bei SL37 und pUN100-RPL2A bei SL147 isoliert.

## 5.2.4 Lokalisierung von Proteinen in der Zelle

Zur Bestimmung der zellulären Lokalisation von Proteinen wurden entsprechende eGFP Fusionsproteine hergestellt. Die Lokalisierung in exponentiell wachsenden Zellen wurde mittels eines Zeiss Axioskops bestimmt. Für das GFP Signal wurde der Fluorescent Filter bzw. für das DsRed Signal der Rhodamin Filter benutzt. Bilder wurden mit einer Xillix Microimmager CCD Kamera aufgenommen und mit Improvision (Openlap) und Photoshop 4.01 prozessiert.

## 5.2.5 Analyse von RNA Exportdefekten in Hefemutanten

### A, Analyse des 60S ribosomalen Exportes mit dem Rpl25p-eGFP Fusionsprotein

Zur Analyse des Exportes der 60S ribosomalen Untereinheit wurde die Methode nach Hurt et al (1999) benutzt. Hierbei wird das Rpl25p-eGFP Fusionsprotein als Reporter für die 60S Untereinheit eingesetzt. Die experimentelle Durchführung erfolgte nach Gadad et al (2001a). Die entsprechenden Stämme wurden mit einem für Rpl25eGFP codierenden Plasmid transformiert und unter selektiven Bedingung bei permissiver Temperatur bis zur stationären Phase kultiviert (ca. 2-3 Tage bei 23 °C). Diese Zellen wurden zur Analyse des Exportdefektes in frisches vorgeheiztes Medium (restriktive Temperatur 37 °C) überführt. Nach entsprechender Inkubationszeit wurde die Lokalisation des Rpl25p-eGFP mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt.

### B, Analyse des mRNA-Exportes

Der Poly(A)<sup>+</sup> RNA-Export wurde mittels *in situ* Hybridisation nach Doye et al (1994) bzw. Santos-Rosa et al (1998) analysiert.

## 5.3 Biochemische Arbeitsmethoden

Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Page Gelelektrophorese, Anfärbung von Proteinen mit Coomassieblau und Westernblot-Analyse wurde nach Maniatis et al (1989) durchgeführt.

### 5.3.1 Aufreinigung von TAP-Fusionsproteinen

Die Aufreinigung von TAP Fusionsproteinen erfolgte nach Rigaut et al (1999) mit folgenden Modifikationen:

Puffer LB: 100 mM NaCl, 50 mM TrisHCl (pH 7,5), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,15 % NP40

Proteaseinhibitoren: „complete“ (Roche/Mannheim) 1 Tablette pro 50 ml

PMSF 0,3 ml 0,1 M PMSF in Isopropanol pro 50 ml

Elutionspuffer: 10 mM TrisHCl (pH 8,0), 5 mM EGTA

Hefekulturen: Der gewünschte Hefestamm wurde in 2 l YPD-Medium in 5 l Erlenmeyerkolben mit Schikanen bei 30°C gezogen. Bei OD<sub>600</sub> 3,5-4 wurden die Zellen geerntet, das Pellet wurde vor dem Einfrieren in N<sub>2(l)</sub> mit LB+complete +PMSF gewaschen und bei -80°C gelagert.

Zellyse: Das Zellpellet wurde bei 37 °C aufgetaut und mit LB+ complete+PMSF +1mM DTT auf ein Volumen von 25 ml aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde zusammen mit 25 ml Glassperlen (0,5 mm) in eine Kugelmühle gefüllt. Die Zellyse wurde mit folgenden Geräteeinstellungen durchgeführt: 4 min Rotational Speed 500 rpm, 1 min Pause, 2 Wiederholungen. Nach Abtrennung der Glasperlen wurde das Lysat bei 14000 rpm für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Glycerin versetzt bis zur Endkonzentration von 5 % und in N<sub>2(l)</sub> eingefroren und bei - 80°C gelagert.

Reinigung: Das Lysat wurde mit 0,5 ml IgG-Sepharose<sup>TM</sup> (Amersham Pharmacia Biotech AB) (mit LB-DTT gewaschen) bei 4 °C in einem 50 ml Falconröhrchen inkubiert. Anschließend wurde die IgG-Sepharose bei 3000 rpm 2 min abzentrifugiert und in ein Mobicol ( MoBiTec/Göttingen) transferiert. Das Mobicol wurde an eine 20 ml Spritze mit LUER-Lok geschraubt und die Sepharose mit 20 ml LB Puffer gewaschen. Anschließend wurde die TEV Spaltung mit 5 µl TEV-Protease (Invitrogen/Karlsruhe) in 0,15 ml LB bei 16°C für 1 – 2 h durchgeführt. Anschließend wurde das TEV Eluat in ein neues Mobicol mit Calmodulin Affinity Resin (Stratagene/Amsterdam) (gewaschen mit LB + 2 mM CaCl<sub>2</sub>) und 0,15 ml LB + 4 mM CaCl<sub>2</sub> überführt. Nach Inkubation von 1 h bei 4 °C wurde mit 5 ml LB + 2 mM CaCl<sub>2</sub> gewaschen. Anschließend mit 0,6 ml Elutionsbuffer bei 37 °C für 10 min inkubiert und eluiert. Die isolierten Proteine wurden mit TCA gefällt, in 1x

Laemmli-Puffer aufgenommen und über SDS-Page Gelelektrophorese analysiert.

### **5.3.2 RNA Profilanalyse / Sedimentationsanalyse mittels Saccharosedichtegradienten**

Zur Herstellung und Fraktionierung von 10 ml 10 – 50 % Saccharosedichtegradienten in Beckman Zentrifugenröhrchen (Polyallomer 14x95 mm für Rotor SW40) wurde ein ProTeam LC Gradienten System (Isco) nach Angaben des Herstellers benutzt.

Puffer A: 20 mM HepesKOH (pH 7,5), 10 mM KCl, 1 mM EGTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>  
(10% bzw. 50% Sacharoselösungen wurden in PufferA angesetzt.)

Eine Kultur von 500 ml der zu analysierenden Hefestämme wurden bei gewünschter Temperatur bis zu OD<sub>600</sub> 0,5 wachsen gelassen. Anschließend wurde 10 mg Cycloheximid zugegeben und für 30 min inkubiert und die Zellen abzentrifugiert. Das Hefepellet wurde mit 10 ml PufferA gewaschen und in N<sub>2</sub>l eingefroren und bei –20 °C gelagert. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 1,5 ml Glasperlen (0,5 mm) und 0,6 ml PufferA durch 4x 30 s Vortexen bei 4 °C. Das Lysat wurde 10 min bei 14000 rpm 4 °C zentrifugiert und ca. 200 bis 300 µl des Überstandes auf einen Gradienten aufgetragen. Die Auftrennung der Zellkomponenten erfolgte in einer Ultrazentrifuge (Beckman, Rotor SW40) bei 27000 rpm für 16 h bei 4 °C. Anschließend wurde das UV-Profil (λ = 254 nm) des Gradienten mit dem ProTeam LC Gradienten System (Isco) bestimmt und in 400 µl Volumen fraktioniert.

Zur Sedimentationsanalyse von Proteinen wurden die einzelnen Fraktionen mit TCA gefällt, durch SDS-PAGE Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Westernblot analysiert. Wenn keine Antikörper gegen das gewünschte Protein vorhanden waren, wurden TAP-Fusionsproteine und ProteinA Antikörper benutzt.

## 6. Literaturverzeichnis

### 6.1 Eigene Publikationen

Sträßler, K., Baßler, J., and Hurt, E.C. (2000). Binding of the Mex67p/Mtr2p heterodimer to FXFG, GLFG, and FG repeat nucleoporins is essential for nuclear mRNA export. *J. Cell Biol* 150, 695-706.

Baßler, J., Grandi, P., Gadai, O., Leßmann, T., Pefalski, E., Tollervey, D., Lechner J., and Hurt, E. (2001) Identification of a 60S pre-ribosomal particle that is closely linked to nuclear export. *Mol Cell* 8, 645-656.

### 6.2 Allgemeine Literatur

Aitchison, J. D., Blobel, G. and Rout, M. P., (1995). Nup120p: a yeast nucleoporin required for NPC distribution and mRNA transport. *J Cell Biol* 131, 1659-1675.

Allen, T. D., Cronshaw, J. M., Bagley, S., Kiseleva, E. and Goldberg, M. W., (2000). The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. *J Cell Sci* 113, 1651-1659.

Allmang, C., Kufel, J., Chanfreau, G., Mitchell, P., Petfalski, E. and Tollervey, D., (1999a). Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *Embo J* 18, 5399-5410.

Allmang, C., Petfalski, E., Podtelejnikov, A., Mann, M., Tollervey, D. and Mitchell, P., (1999b). The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3' --> 5' exonucleases. *Genes Dev* 13, 2148-2158.

Amberg, D. C., Goldstein, A. L. and Cole, C. N., (1992). Isolation and characterization of RAT1: an essential gene of *Saccharomyces cerevisiae* required for the efficient nucleocytoplasmic trafficking of mRNA. *Genes Dev* 6, 1173-1189.

Arts, G. J., Kuersten, S., Romby, P., Ehresmann, B. and Mattaj, I. W., (1998). The role of exportin-t in selective nuclear export of mature tRNAs. *Embo J* 17, 7430-7441.

- Bachi, A., Braun, I. C., Rodrigues, J. P., Pante, N., Ribbeck, K., von Kobbe, C., Kutay, U., Wilm, M., Gorlich, D., Carmo-Fonseca, M. and Izaurralde, E., (2000). The C-terminal domain of TAP interacts with the nuclear pore complex and promotes export of specific CTE-bearing RNA substrates. *RNA* 6, 136-158.
- Bailer, S. M., Balduf, C. and Hurt, E., (2001). The nsp1p carboxy-terminal domain is organized into functionally distinct coiled-coil regions required for assembly of nucleoporin subcomplexes and nucleocytoplasmic transport. *Mol Cell Biol* 21, 7944-7955.
- Bailer, S. M., Balduf, C., Katahira, J., Podtelejnikov, A., Rollenhagen, C., Mann, M., Pante, N. and Hurt, E., (2000). Nup116p associates with the Nup82p-Nsp1p-Nup159p nucleoporin complex. *J Biol Chem* 275, 23540-23548.
- Bailer, S. M., Siniosoglou, S., Podtelejnikov, A., Hellwig, A., Mann, M. and Hurt, E., (1998). Nup116p and nup100p are interchangeable through a conserved motif which constitutes a docking site for the mRNA transport factor gle2p. *Embo J* 17, 1107-1119.
- Bayliss, R., Ribbeck, K., Akin, D., Kent, H. M., Feldherr, C. M., Gorlich, D. and Stewart, M., (1999). Interaction between NTF2 and xFxFG-containing nucleoporins is required to mediate nuclear import of RanGDP. *J Mol Biol* 293, 579-593.
- Bear, J., Tan, W., Zolotukhin, A. S., Tabernero, C., Hudson, E. A. and Felber, B. K., (1999). Identification of novel import and export signals of human TAP, the protein that binds to the constitutive transport element of the type D retrovirus mRNAs. *Mol Cell Biol* 19, 6306-6317.
- Belgareh, N., Rabut, G., Bai, S. W., van Overbeek, M., Beaudouin, J., Daigle, N., Zatsepina, O. V., Pasteau, F., Labas, V., Fromont-Racine, M., Ellenberg, J. and Doye, V., (2001). An evolutionarily conserved NPC subcomplex, which redistributes in part to kinetochores in mammalian cells. *J Cell Biol* 154, 1147-1160.
- Belgareh, N., Snay-Hodge, C., Pasteau, F., Dagher, S., Cole, C. N. and Doye, V., (1998). Functional characterization of a Nup159p-containing nuclear pore subcomplex. *Mol Biol Cell* 9, 3475-3492.
- Bharathi, A., Ghosh, A., Whalen, W. A., Yoon, J. H., Pu, R., Dasso, M. and Dhar, R., (1997). The human RAE1 gene is a functional homologue of *Schizosaccharomyces pombe* rae1 gene involved in nuclear export of Poly(A)<sup>+</sup> RNA. *Gene* 198, 251-258.
- Birney, E., Kumar, S. and Krainer, A. R., (1993). Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. *Nucleic Acids Res* 21, 5803-5816.

- Black, B. E., Holaska, J. M., Levesque, L., Ossareh-Nazari, B., Gwizdek, C., Dargemont, C. and Paschal, B. M., (2001). NXT1 is necessary for the terminal step of Crm1-mediated nuclear export. *J Cell Biol* 152, 141-155.
- Black, B. E., Levesque, L., Holaska, J. M., Wood, T. C. and Paschal, B. M., (1999). Identification of an NTF2-related factor that binds Ran-GTP and regulates nuclear protein export. *Mol Cell Biol* 19, 8616-8624.
- Bogerd, A. M., Hoffman, J. A., Amberg, D. C., Fink, G. R. and Davis, L. I., (1994). nup1 mutants exhibit pleiotropic defects in nuclear pore complex function. *J Cell Biol* 127, 319-332.
- Braun, I. C., Herold, A., Rode, M., Conti, E. and Izaurralde, E., (2001). Overexpression of TAP/p15 heterodimers bypasses nuclear retention and stimulates nuclear mRNA export. *J Biol Chem* 276, 20536-20543.
- Braun, I. C., Rohrbach, E., Schmitt, C. and Izaurralde, E., (1999). TAP binds to the constitutive transport element (CTE) through a novel RNA-binding motif that is sufficient to promote CTE-dependent RNA export from the nucleus. *Embo J* 18, 1953-1965.
- Brodsky, A. S. and Silver, P. A., (2000). Pre-mRNA processing factors are required for nuclear export. *RNA* 6, 1737-1749.
- Brown, J. A., Bharathi, A., Ghosh, A., Whalen, W., Fitzgerald, E. and Dhar, R., (1995). A mutation in the *Schizosaccharomyces pombe* rae1 gene causes defects in poly(A)<sup>+</sup> RNA export and in the cytoskeleton. *J Biol Chem* 270, 7411-7419.
- Brown, J. D., Hann, B. C., Medzihradzky, K. F., Niwa, M., Burlingame, A. L. and Walter, P., (1994). Subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* signal recognition particle required for its functional expression. *Embo J* 13, 4390-4400.
- Bullock, T. L., Clarkson, W. D., Kent, H. M. and Stewart, M., (1996). The 1.6 angstroms resolution crystal structure of nuclear transport factor 2 (NTF2). *J Mol Biol* 260, 422-431.
- Burger, F., Daugeron, M. C. and Linder, P., (2000) Dbp10p, a putative RNA helicase from *Saccharomyces cerevisiae*, is required for ribosome biogenesis. *Nucleic Acids Res* 28, 2315-2323.
- Chaillan-Huntington, C., Braslavsky, C. V., Kuhlmann, J. and Stewart, M., (2000). Dissecting the interactions between NTF2, RanGDP, and the nucleoporin XFXFG repeats. *J Biol Chem* 275, 5874-5879.
- Clouse, K. N., Luo, M. J., Zhou, Z. and Reed, R., (2001). A Ran-independent pathway for export of spliced mRNA. *Nat Cell Biol* 3, 97-99.

- Conti, E. and Izaurralde, E., (2001). Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age. *Curr Opin Cell Biol* 13, 310-319.
- Custodio, N., Carmo-Fonseca, M., Geraghty, F., Pereira, H. S., Grosveld, F. and Antoniou, M., (1999). Inefficient processing impairs release of RNA from the site of transcription. *Embo J* 18, 2855-2866.
- Daneholt, B. (1999). Pre-mRNP particles: From gene to nuclear pore. *Curr.Biol.* 9, R412-R415.
- Davis, C. A., Grate, L., Spingola, M., Ares, M. (2000) Test of intron predictions reveals novel splice sites, alternatively spliced mRNA and new introns in meiotically regulated genes of yeast. *Nuc. Acid. Res.* 28, 1700-1706.
- Davis, L. I. and Fink, G. R., (1990). The NUP1 gene encodes an essential component of the yeast nuclear pore complex. *Cell* 61, 965-978.
- De Beus, E., Brockenbrough, J.S., Hong, B., and Aris, J.P. (1994). Yeast *NOP2* encodes an essential nucleolar protein with homology to a human proliferation marker. *J.Cell Biol.* 127, 1799-1813.
- De La Cruz, J., Kressler, D., and Linder, P. (1999) Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem Sci* 24, 192-198.
- Del Priore, V., Snay, C. A., Bahr, A. and Cole, C. N., (1996). The product of the *Saccharomyces cerevisiae* *RSS1* gene, identified as a high-copy suppressor of the *rat7-1* temperature-sensitive allele of the *RAT7/NUP159* nucleoporin, is required for efficient mRNA export. *Mol Biol Cell* 7, 1601-1621.
- Denning, D., Mykytka, B., Allen, N. P., Huang, L., Ai, B. and Rexach, M., (2001). The nucleoporin Nup60p functions as a Gsp1p-GTP-sensitive tether for Nup2p at the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 154, 937-950.
- Dilworth, D. J., Suprapto, A., Padovan, J. C., Chait, B. T., Wozniak, R. W., Rout, M. P. and Aitchison, J. D., (2001). Nup2p dynamically associates with the distal regions of the yeast nuclear pore complex. *J Cell Biol* 153, 1465-1478.
- Dockendorff, T. C., Heath, C. V., Goldstein, A. L., Snay, C. A. and Cole, C. N., (1997). C-terminal truncations of the yeast nucleoporin Nup145p produce a rapid temperature-conditional mRNA export defect and alterations to nuclear structure. *Mol Cell Biol* 17, 906-920.
- Doye, V. and Hurt, E. C., (1995). Genetic approaches to nuclear pore structure and function. *Trends Genet* 11, 235-241.
- Doye, V. and Hurt, E., (1997). From nucleoporins to nuclear pore complexes. *Curr Opin Cell Biol* 9, 401-411.

- Doye, V., Wepf, R., and Hurt, E.C. (1994). A novel nuclear pore protein Nup133p with distinct roles in poly (A)<sup>+</sup> RNA transport and nuclear pore distribution. *EMBO J.* 13, 6062-6075.
- Dunbar, D.A., Dragon, F., Lee, S.J., and Baserga, S.J. (2000). A nucleolar protein related to ribosomal protein L7 is required for an early step in large ribosomal subunit biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13027-13032.
- Fabre, E. and Hurt, E., (1997). Yeast genetics to dissect the nuclear pore complex and nucleocytoplasmic trafficking. *Annu Rev Genet* 31, 277-313.
- Fabre, E., Boelens, W. C., Wimmer, C., Mattaj, I. W. and Hurt, E. C., (1994). Nup145p is required for nuclear export of mRNA and binds homopolymeric RNA in vitro via a novel conserved motif. *Cell* 78, 275-289.
- Fahrenkrog, B., Stoffler, D. and Aebi, U., (2001). Nuclear pore complex architecture and functional dynamics. *Curr Top Microbiol Immunol* 259, 95-117.
- Fiedler, T. A., Karpova, T., Cooper, J., and Hegemann, J. H. (2001). A CPF1 synthetic lethal screen identifies a novel yeast gene involved in the integrity of the actin cytoskeleton. Submitted for publication.
- Fischer, U., Huber, J., Boelens, W. C., Mattaj, I. W. and Luhrmann, R., (1995). The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* 82, 475-483..
- Flach, J., Bossie, M., Vogel, J., Corbett, A., Jinks, T., Willins, D. A. and Silver, P. A., (1994). A yeast RNA-binding protein shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *Mol Cell Biol* 14, 8399-8407.
- Fontoura, B. M., Blobel, G. and Matunis, M. J., (1999). A conserved biogenesis pathway for nucleoporins: proteolytic processing of a 186-kilodalton precursor generates Nup98 and the novel nucleoporin, Nup96. *J Cell Biol* 144, 1097-1112.
- Fornierod, M., Ohno, M., Yoshida, M. and Mattaj, I. W., (1997). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 90, 1051-1060.
- Fribourg, S., Braun, I. C., Izaurralde, E. and Conti, E., (2001). Structural Basis for the Recognition of a Nucleoporin FG Repeat by the NTF2-like Domain of the TAP/p15 mRNA Nuclear Export Factor. *Mol Cell* 8, 645-656.
- Fromont-Racine, M., Rain, J.C., and Legrain, P. (1997) Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nat. Genet.* 16, 277-82.

- Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M. and Nishida, E., (1997). CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* 390, 308-311.
- Gadal, O., Strauß, D., Braspenning, J., Hoepfner, D., Petfalski, E., Philippsen, P., Tollervey, D., and Hurt, E.C. (2001a). A Nuclear AAA-type ATPase (Rix7p) is Required for Biogenesis and Nuclear Export of 60S Ribosomal Subunits. *EMBO J.* 20, 3695-3704.
- Gadal, O., Strauß, D., Kessler, J., Trumppower, B., Tollervey, D., and Hurt, E. (2001b). Nuclear export of 60S ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a NES-containing factor Nmd3p that associates with the large subunit protein Rpl10p. *Mol. Cell. Biol.* 21, 3405-3415.
- Galy, V., Olivo-Marin, J. C., Scherthan, H., Doye, V., Rascalou, N. and Nehrbass, U., (2000). Nuclear pore complexes in the organization of silent telomeric chromatin. *Nature* 403, 108-112.
- Gama-Carvalho, M. and Carmo-Fonseca, M., (2001). The rules and roles of nucleocytoplasmic shuttling proteins. *FEBS Lett* 498, 157-163.
- Gilbert, W., Siebel, C. W. and Guthrie, C., (2001). Phosphorylation by Sky1p promotes Npl3p shuttling and mRNA dissociation. *RNA* 7, 302-313.
- Goldberg, M. W. and Allen, T. D., (1995). Structural and functional organization of the nuclear envelope. *Curr Opin Cell Biol* 7, 301-309.
- Goldstein, A. L., Snay, C. A., Heath, C. V. and Cole, C. N., (1996). Pleiotropic nuclear defects associated with a conditional allele of the novel nucleoporin Rat9p/Nup85p. *Mol Biol Cell* 7, 917-934.
- Gorlich, D. and Kutay, U., (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 607-660.
- Gorsch, L. C., Dockendorff, T. C. and Cole, C. N., (1995). A conditional allele of the novel repeat-containing yeast nucleoporin RAT7/NUP159 causes both rapid cessation of mRNA export and reversible clustering of nuclear pore complexes. *J Cell Biol* 129, 939-955.
- Grandi, P., Schlaich, N., Tekotte, H. and Hurt, E. C., (1995). Functional interaction of Nic96p with a core nucleoporin complex consisting of Nsp1p, Nup49p and a novel protein Nup57p. *Embo J* 14, 76-87.
- Grosshans, H., Hurt, E. and Simos, G., (2000b). An aminoacylation-dependent nuclear tRNA export pathway in yeast. *Genes Dev* 14, 830-840.
- Grosshans, H., Simos, G. and Hurt, E., (2000a). Review: transport of tRNA out of the nucleus-direct channeling to the ribosome? *J Struct Biol* 129, 288-294.

- Grüter, P., Tabernero, C., von Kobbe, C., Schmitt, C., Saavedra, C., Bachi, A., Wilm, M., Felber, B. K. and Izaurralde, E., (1998). TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus. *Mol Cell* 1, 649-659.
- Guzik, B. W., Levesque, L., Prasad, S., Bor, Y. C., Black, B. E., Paschal, B. M., Rekosh, D. and Hammarskjold, M. L., (2001). NXT1 (p15) is a crucial cellular cofactor in TAP-dependent export of intron-containing RNA in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 21, 2545-2554.
- Harnpicharnchai, P., Jakovljevic, J., Horsey, E., Miles, T., Roman, J., Rout, M., Meagher, D., Imai, B., Guo, Y., Brame, C. J., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. and Woolford, J. L., (2001). Composition and functional characterization of yeast 66s ribosome assembly intermediates. *Mol Cell* 8, 505-515.
- Heath, C. V., Copeland, C. S., Amberg, D. C., Del Priore, V., Snyder, M. and Cole, C. N., (1995). Nuclear pore complex clustering and nuclear accumulation of poly(A)<sup>+</sup> RNA associated with mutation of the *Saccharomyces cerevisiae* RAT2/NUP120 gene. *J Cell Biol* 131, 1677-1697.
- Hellmuth, K., Lau, D. M., Bischoff, F. R., Kunzler, M., Hurt, E. and Simos, G., (1998). Yeast Los1p has properties of an exportin-like nucleocytoplasmic transport factor for tRNA. *Mol Cell Biol* 18, 6374-6386.
- Herold, A., Suyama, M., Rodrigues, J. P., Braun, I. C., Kutay, U., Carmo-Fonseca, M., Bork, P. and Izaurralde, E., (2000). TAP (NXF1) belongs to a multigene family of putative RNA export factors with a conserved modular architecture. *Mol Cell Biol* 20, 8996-9008.
- Heyer, W. D., Johnson, A. W., Reinhart, U. and Kolodner, R. D., (1995). Regulation and intracellular localization of *Saccharomyces cerevisiae* strand exchange protein 1 (Sep1/Xrn1/Kem1), a multifunctional exonuclease. *Mol Cell Biol* 15, 2728-2736.
- Ho, J.H., Kallstrom, G., and Johnson, A.W. (2000). Nmd3p is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit. *J. Cell. Biol.* 151, 1057-1066.
- Hodge, C. A., Colot, H. V., Stafford, P. and Cole, C. N., (1999). Rat8p/Dbp5p is a shuttling transport factor that interacts with Rat7p/Nup159p and Gle1p and suppresses the mRNA export defect of xpo1-1 cells. *Embo J* 18, 5778-5788.
- Hong, B., Brockenbrough, J.S., Wu, P., and Aris, J.P. (1997). Nop2p is required for pre-rRNA processing and 60S ribosome subunit synthesis in yeast. *Mol.Cell.Biol.* 17, 378-388.

- Hong, B., Wu, K., Brockenbrough, J. S., Wu, P. and Aris, J. P., (2001), Temperature sensitive *nop2* alleles defective in synthesis of 25S rRNA and large ribosomal subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 29, 2927-2937.
- Huang, Y. and Steitz, J. A., (2001). Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA. *Mol Cell* 7, 899-905.
- Hurt, E., Hannus, S., Schmelzl, B., Lau, D., Tollervey, D., and Simos, G. (1999). A novel In Vivo Assay Reveals Inhibition of Ribosomal Nuclear Export in Ran-Cycle and Nucleoporin Mutants. *J. Cell. Biol.* 144, 389-401.
- Hurt, E., Strasser, K., Segref, A., Bailer, S., Schlaich, N., Presutti, C., Tollervey, D. and Jansen, R., (2000). Mex67p mediates nuclear export of a variety of RNA polymerase II transcripts. *J Biol Chem* 275, 8361-8368.
- Hurwitz, M. E. and Blobel, G., (1995). NUP82 is an essential yeast nucleoporin required for poly(A)<sup>+</sup> RNA export. *J Cell Biol* 130, 1275-1281.
- Hurwitz, M. E., Strambio-de-Castillia, C. and Blobel, G., (1998). Two yeast nuclear pore complex proteins involved in mRNA export form a cytoplasmically oriented subcomplex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11241-11245.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153, 163-168
- Jensen, T. H., Boulay, J., Rosbash, M., Libri, D., (2001). The DECD box putative ATPase Sub2p is an early mRNA exportfactor. *Curr Biol* 11, 1711-1715.
- Kadowaki, T., Chen, S., Hitomi, M., Jacobs, E., Kumagai, C., Liang, S., Schneider, R., Singleton, D., Wisniewska, J. and Tartakoff, A. M., (1994a). Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mRNA transport-defective (*mtr*) mutants. *J Cell Biol* 126, 649-659.
- Kadowaki, T., Hitomi, M., Chen, S. and Tartakoff, A. M., (1994b). Nuclear mRNA accumulation causes nucleolar fragmentation in yeast *mtr2* mutant. *Mol Biol Cell* 5, 1253-1263.
- Kadowaki, T., Schneider, R., Hitomi, M. and Tartakoff, A. M., (1995). Mutations in nucleolar proteins lead to nucleolar accumulation of polyA<sup>+</sup> RNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 6, 1103-1110.
- Kadowaki, T., Zhao, Y. and Tartakoff, A. M., (1992). A conditional yeast mutant deficient in mRNA transport from nucleus to cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2312-2316.
- Kaffman, A. and O'Shea, E. K., (1999). Regulation of nuclear localization: a key to a door. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 291-339.

- Kang, Y. and Cullen, B. R., (1999). The human Tap protein is a nuclear mRNA export factor that contains novel RNA-binding and nucleocytoplasmic transport sequences. *Genes Dev* 13, 1126-1139.
- Kang, Y., Bogerd, H. P. and Cullen, B. R., (2000). Analysis of cellular factors that mediate nuclear export of RNAs bearing the Mason-Pfizer monkey virus constitutive transport element. *J Virol* 74, 5863-5871.
- Katahira, J., Sträßler, K., Podtelejnikov, A., Mann, M., Jung, J.J., and Hurt, E.C. (1999). The Mex67p-Mediated Nuclear mRNA Export Pathway is Conserved From Yeast to Human. *EMBO J.* 18, 2593-2609.
- Kochendörfer, K. U., Then, A. R., Kearns, B. G., Bankaitis, V. A. and Mayinger, P., (1999). Sac1p plays a crucial role in microsomal ATP transport, which is distinct from its function in Golgi phospholipid metabolism. *Embo J* 18, 1506-1515.
- Komeili, A. and O'Shea, E. K., (2001). New perspectives on nuclear transport. *Annu Rev Genet* 35, 341-364.
- Kosova, B., Pante, N., Rollenhagen, C., Podtelejnikov, A., Mann, M., Aebi, U. and Hurt, E., (2000). Mlp2p, a component of nuclear pore attached intranuclear filaments, associates with nic96p. *J Biol Chem* 275, 343-350.
- Kraemer, D. and Blobel, G., (1997). mRNA binding protein mrnp 41 localizes to both nucleus and cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9119-9124.
- Kraemer, D. M., Strambio-de-Castillia, C., Blobel, G. and Rout, M. P., (1995). The essential yeast nucleoporin NUP159 is located on the cytoplasmic side of the nuclear pore complex and serves in karyopherin-mediated binding of transport substrate. *J Biol Chem* 270, 19017-19021.
- Krecic, A. M. and Swanson, M. S., (1999). hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol* 11, 363-371.
- Kressler, D., Linder, P., and De La Cruz, J. (1999). Protein *trans*-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7897-7912.
- Kressler, D., Rojo, M., Linder, P. and Cruz, J., (1999), Spb1p is a putative methyltransferase required for 60S ribosomal subunit biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 27, 4598-4608.
- Kuersten, S., Ohno, M. and Mattaj, I. W., (2001). Nucleocytoplasmic transport: Ran, beta and beyond. *Trends Cell Biol* 11, 497-503.
- Künzler, M., Hurt, E., (2001). Targeting of Ran: Variation of a common theme ? *J Cell Sci* 114, 3233-3241.

- Lafontaine, D. and Tollervey, D., (1995). Trans-acting factors in yeast pre-rRNA and pre-snoRNA processing. *Biochem Cell Biol* 73, 803-812.
- Lafontaine, D. L. and Tollervey, D., (2001). The function and synthesis of ribosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 514-520.
- Le Hir, H., Gatfield, D., Izaurralde, E. and Moore, M. J., (2001). The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *Embo J* 20, 4987-4997.
- Le Hir, H., Izaurralde, E., Maquat, L. E. and Moore, M. J., (2000a). The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *Embo J* 19, 6860-6869.
- Le Hir, H., Moore, M. J. and Maquat, L. E., (2000b). Pre-mRNA splicing alters mRNP composition: evidence for stable association of proteins at exon-exon junctions. *Genes Dev* 14, 1098-1108.
- Lee, D. C. and Aitchison, J. D., (1999). Kap104p-mediated nuclear import. Nuclear localization signals in mRNA-binding proteins and the role of Ran and Rna. *J Biol Chem* 274, 29031-29037.
- Lee, M. S., Henry, M. and Silver, P. A., (1996). A protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm is an important mediator of RNA export. *Genes Dev* 10, 1233-1246.
- Legrain, P. and Rosbash, M., (1989). Some cis- and trans-acting mutants for splicing target pre-mRNA to the cytoplasm. *Cell* 57, 573-583.
- Lei, E. P., Krebber, H. and Silver, P. A., (2001). Messenger RNAs are recruited for nuclear export during transcription. *Genes Dev* 15, 1771-1782.
- Levesque, L., Guzik, B., Guan, T., Coyle, J., Black, B. E., Rekosh, D., Hammarskjold, M. L. and Paschal, B. M., (2001). RNA export mediated by TAP Involves NXT1-dependent interactions with the nuclear pore complex. *J Biol Chem* 28, 28.
- Li, O., Heath, C. V., Amberg, D. C., Dockendorff, T. C., Copeland, C. S., Snyder, M. and Cole, C. N., (1995). Mutation or deletion of the *Saccharomyces cerevisiae* RAT3/NUP133 gene causes temperature-dependent nuclear accumulation of poly(A)<sup>+</sup> RNA and constitutive clustering of nuclear pore complexes. *Mol Biol Cell* 6, 401-417.
- Liang, S., Hitomi, M., Hu, Y. H., Liu, Y. and Tartakoff, A. M., (1996). A DEAD-box-family protein is required for nucleocytoplasmic transport of yeast mRNA. *Mol Cell Biol* 16, 5139-5146.

- Liker, E., Fernandez, E., Izaurralde, E. and Conti, E., (2000). The structure of the mRNA export factor TAP reveals a cis arrangement of a non-canonical RNP domain and an LRR domain. *Embo J* 19, 5587-5598.
- Luo, M. J. and Reed, R., (1999). Splicing is required for rapid and efficient mRNA export in metazoans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14937-14942.
- Luo, M. L., Zhou, Z., Magni, K., Christoforides, C., Rappsilber, J., Mann, M. and Reed, R., (2001). Pre-mRNA splicing and mRNA export linked by direct interactions between UAP56 and Aly. *Nature* 413, 644-647.
- Lussier, M., White, A.M., Sheraton, J., Di Paolo, T., Treadwell, J., Southard, S.B., Horenstein, C.I., Chen-Weiner, J., Ram, A.F.J., Kapteyn, J.C., Roemer, T.W., Vo, D.H., Bondoc, D.C., Hall, J., Zhong, W.W., Sdicu, A.M., Davies, J., Klis, F.M., Robbins, P.W., and Bussey, H. (1997). Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 147, 435-450.
- Maniatis, T., Fritsch, E.T., and Sambrook, J. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Mattaj, I. W. and Englmeier, L., (1998). Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem* 67, 265-306.
- Michael, W. M., Choi, M. and Dreyfuss, G., (1995). A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature- dependent nuclear protein export pathway. *Cell* 83, 415-422.
- Michael, W. M., Eder, P. S. and Dreyfuss, G., (1997). The K nuclear shuttling domain: a novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein. *Embo J* 16, 3587-3598.
- Mili, S., Shu, H. J., Zhao, Y. and Pinol-Roma, S., (2001). Distinct RNP Complexes of Shuttling hnRNP Proteins with Pre-mRNA and mRNA: Candidate Intermediates in Formation and Export of mRNA. *Mol Cell Biol* 21, 7307-7319.
- Milkereit, P., Gadal, O., Podtelejnikov, A., Trumtel, S., Gas, N., Petfalski, E., Tollervey, D., Mann, M., Hurt, E., and Tschochner, H. (2001). Maturation of Pre-Ribosomes Requires Noc-Proteins and is Coupled to Transport from the Nucleolus to the Nucleoplasm. *Cell* 105, 499-509.
- Mingot, J. M., Kostka, S., Kraft, R., Hartmann, E. and Gorlich, D., (2001). Importin 13: a novel mediator of nuclear import and export. *Embo J* 20, 3685-3694.
- Moy, T.I. and Silver, P.A. (1999). Nuclear export of the small ribosomal subunit requires the Ran-GTPase cycle and certain nucleoporins. *Genes Dev.* 13, 2118-2133.

- Muhlrad, D., Hunter, R., and Parker, R. (1992). A rapid method for localized mutagenesis of yeast genes. *Yeast* 8, 79-82.
- Murphy, R. and Wentz, S. R., (1996). An RNA-export mediator with an essential nuclear export signal. *Nature* 383, 357-360.
- Murphy, R., Watkins, J. L. and Wentz, S. R., (1996). GLE2, a *Saccharomyces cerevisiae* homologue of the *Schizosaccharomyces pombe* export factor RAE1, is required for nuclear pore complex structure and function. *Mol Biol Cell* 7, 1921-1937.
- Nakielny, S. and Dreyfuss, G., (1996). The hnRNP C proteins contain a nuclear retention sequence that can override nuclear export signals. *J Cell Biol* 134, 1365-1373.
- Nakielny, S. and Dreyfuss, G., (1999). Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell* 99, 677-690.
- Neville, M. and Rosbash, M., (1999). The NES-Crm1p export pathway is not a major mRNA export route in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 18, 3746-3756.
- Ossareh-Nazari, B., Maison, C., Black, B. E., Levesque, L., Paschal, B. M. and Dargemont, C., (2000). RanGTP-binding protein NXT1 facilitates nuclear export of different classes of RNA in vitro. *Mol Cell Biol* 20, 4562-4571.
- Park, J. H., Jensen, B. C., Kifer, C. T., and Parsons, M. (2001). A novel nucleolar G-protein conserved in eukaryotes. *J. Cell Sci.* 114, 173-185.
- Pemberton, L. F., Blobel, G. and Rosenblum, J. S., (1998). Transport routes through the nuclear pore complex. *Curr Opin Cell Biol* 10, 392-399.
- Pemberton, L. F., Rosenblum, J. S. and Blobel, G., (1997). A distinct and parallel pathway for the nuclear import of an mRNA-binding protein. *J Cell Biol* 139, 1645-1653.
- Pemberton, L. F., Rosenblum, J. S. and Blobel, G., (1999). Nuclear import of the TATA-binding protein: mediation by the karyopherin Kap114p and a possible mechanism for intranuclear targeting. *J Cell Biol* 145, 1407-1417.
- Pemberton, L. F., Rout, M. P. and Blobel, G., (1995). Disruption of the nucleoporin gene NUP133 results in clustering of nuclear pore complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1187-1191.
- Pestov, D. G., Stockelman, M. G., Strezoska, Z. and Lau, L. F., (2001). ERB1, the yeast homolog of mammalian Bop1, is an essential gene required for maturation of the 25S and 5.8S ribosomal RNAs. *Nucleic Acids Res* 29, 3621-3630.

- Pollard, V. W. and Malim, M. H., (1998). The HIV-1 Rev protein. *Annu Rev Microbiol* 52, 491-532.
- Portman, D. S., O'Connor, J. P. and Dreyfuss, G., (1997). YRA1, an essential *Saccharomyces cerevisiae* gene, encodes a novel nuclear protein with RNA annealing activity. *Rna* 3, 527-537.
- Pritchard, C. E., Fornerod, M., Kasper, L. H. and van Deursen, J. M., (1999). RAE1 is a shuttling mRNA export factor that binds to a GLEBS-like NUP98 motif at the nuclear pore complex through multiple domains. *J Cell Biol* 145, 237-254.
- Reed, R. and Magni, K., (2001). A new view of mRNA export: separating the wheat from the chaff. *Nat Cell Biol* 3, E201-204.
- Reichelt, R., Holzenburg, A., Buhle, E. L., Jr., Jarnik, M., Engel, A. and Aebi, U., (1990). Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. *J Cell Biol* 110, 883-894.
- Ribbeck, K., Lipowsky, G., Kent, H. M., Stewart, M. and Gorlich, D., (1998). NTF2 mediates nuclear import of Ran. *Embo J* 17, 6587-6598.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Séraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature Biotech.* 17, 1030-1032.
- Rodrigues, J. P., Rode, M., Gatfield, D., Blencowe, B., Carmo-Fonseca, M. and Izaurralde, E., (2001). REF proteins mediate the export of spliced and unspliced mRNAs from the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1030-1035.
- Rotenberg, M.O., Moritz, M., and Woolford, J.L. Jr., (1988) Depletion of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal protein L16 causes a decrease in 60S ribosomal subunits and formation of half-mer polysomes. *Genes Dev.* 2, 160-172.
- Rout, M. P. and Aitchison, J. D., (2001). The nuclear pore complex as a transport machine. *J Biol Chem* 276, 16593-16596.
- Rout, M. P. and Blobel, G., (1993). Isolation of the yeast nuclear pore complex. *J Cell Biol* 123, 771-783.
- Rout, M.P., Aitchison, J.D., (2001). The Nuclear Pore Complex as a Transport Maschine. *J. Cell. Biol.* 276, 16593-16596.
- Rout, M.P., Aitchison, J.D., Suprpto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y., and Chait, B.T. (2000). The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J. Cell. Biol.* 148, 635-651.
- Ryan, K. J. and Wentz, S. R., (2000). The nuclear pore complex: a protein machine bridging the nucleus and cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol* 12, 361-371.

- Saavedra, C. A., Hammell, C. M., Heath, C. V. and Cole, C. N., (1997). Yeast heat shock mRNAs are exported through a distinct pathway defined by Rip1p. *Genes Dev* 11, 2845-2856.
- Santos-Rosa, H., Moreno, H., Simos, G., Segref, A., Fahrenkrog, B., Panté, N., and Hurt, E. (1998). Nuclear mRNA export requires complex formation between Mex67p and Mtr2p at the nuclear pores. *Mol.Cell.Biol.* 18, 6826-6838.
- Saveanu, C., Bienvenu, D., Namane, A., Gleizes, P. E., Gas, N., Jacquier, A. and Fromont-Racine, M., (2001). Nog2p, a putative GTPase associated with pre-60S subunits and required for late 60S maturation steps. *Embo J* 20, 6475-6484.
- Schlaich, N. L. and Hurt, E. C., (1995). Analysis of nucleocytoplasmic transport and nuclear envelope structure in yeast disrupted for the gene encoding the nuclear pore protein Nup1p. *Eur J Cell Biol* 67, 8-14.
- Schmitt, C., von Kobbe, C., Bachi, A., Pante, N., Rodrigues, J. P., Boscheron, C., Rigaut, G., Wilm, M., Seraphin, B., Carmo-Fonseca, M. and Izaurralde, E., (1999). Dbp5, a DEAD-box protein required for mRNA export, is recruited to the cytoplasmic fibrils of nuclear pore complex via a conserved interaction with CAN/Nup159p. *Embo J* 18, 4332-4347.
- Schmitt, I. and Gerace, L., (2001). In vitro analysis of nuclear transport mediated by the C-terminal shuttle domain of tap. *J Biol Chem* 10, 10.
- Schneiter, R. and Kohlwein, S. D., (1997). Organelle structure, function, and inheritance in yeast: a role for fatty acid synthesis? *Cell* 88, 431-434.
- Segref, A., Sharma, K., Doye, V., Hellwig, A., Huber, J., Lührmann, R., and Hurt, E.C. (1997). Mex67p which is an Essential Factor for Nuclear mRNA Export Binds to Both Poly(A)<sup>+</sup> RNA and Nuclear Pores. *EMBO J.* 16, 3256-3271.
- Senger, B., Simos, G., Bischoff, F. R., Podtelejnikov, A., Mann, M. and Hurt, E., (1998). Mtr10p functions as a nuclear import receptor for the mRNA-binding protein Npl3p. *Embo J* 17, 2196-2207.
- Shen, E. C., Henry, M. F., Weiss, V. H., Valentini, S. R., Silver, P. A. and Lee, M. S., (1998). Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins. *Genes Dev* 12, 679-691.
- Sherman, F., (1991) Getting started with yeast. *Methods Enzymol* 194, 3-21.
- Si, K. and Maitra, U., (1999), The *Saccharomyces cerevisiae* homologue of mammalian translation initiation factor 6 does not function as a translation initiation factor. *Mol Cell Biol* 19, 1416-1426.

- Sikorski, R.S. and Hieter, R. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.
- Simos, G. and Hurt, E., (1999). Transfer RNA biogenesis: A visa to leave the nucleus. *Curr Biol* 9, R238-241.
- Simos, G., (1999). Nuclear Export of tRNA. *Protoplasma* 209, 173-180.
- Singleton, D. R., Chen, S., Hitomi, M., Kumagai, C. and Tartakoff, A. M., (1995). A yeast protein that bidirectionally affects nucleocytoplasmic transport. *J Cell Sci* 108, 265-272.
- Siniossoglou, S., Lutzmann, M., Santos-Rosa, H., Leonard, K., Mueller, S., Aebi, U. and Hurt, E., (2000). Structure and assembly of the Nup84p complex. *J Cell Biol* 149, 41-54.
- Siniossoglou, S., Wimmer, C., Rieger, M., Doye, V., Tekotte, H., Weise, C., Emig, S., Segref, A. and Hurt, E. C., (1996). A novel complex of nucleoporins, which includes Sec13p and a Sec13p homolog, is essential for normal nuclear pores. *Cell* 84, 265-275.
- Snay-Hodge, C. A., Colot, H. V., Goldstein, A. L. and Cole, C. N., (1998). Dbp5p/Rat8p is a yeast nuclear pore-associated DEAD-box protein essential for RNA export. *Embo J* 17, 2663-2676.
- Sprang, S.R. (1997). G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Ann. Rev. Biochem.* 66, 639-678.
- Stade, K., Ford, C. S., Guthrie, C. and Weis, K., (1997). Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* 90, 1041-1050.
- Stage-Zimmermann, T., Schmidt, U., and Silver, P.A. (2000). Factors affecting nuclear export of the 60S subunits in vivo. *Mol. Biol. Cell.* 11, 3777-3789.
- Stewart, M., Baker, R. P., Bayliss, R., Clayton, L., Grant, R. P., Littlewood, T. and Matsuura, Y., (2001). Molecular mechanism of translocation through nuclear pore complexes during nuclear protein import. *FEBS Lett* 498, 145-149.
- Stoffler, D., Fahrenkrog, B. and Aebi, U., (1999). The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 11, 391-401.
- Strahm, Y., Fahrenkrog, B., Zenklusen, D., Rychner, E., Kantor, J., Rosbach, M. and Stutz, F., (1999). The RNA export factor Gle1p is located on the cytoplasmic fibrils of the NPC and physically interacts with the FG-nucleoporin Rip1p, the DEAD-box protein Rat8p/Dbp5p and a new protein Ymr 255p. *Embo J* 18, 5761-5777.

- Sträßer, K. and Hurt, E., (1999). Nuclear RNA export in yeast. *FEBS Lett* 452, 77-81.
- Sträßer, K. and Hurt, E., (2001). Splicing factor Sub2p is required for nuclear mRNA export through its interaction with Yra1p. *Nature* 413, 648-652.
- Sträßer, K. and Hurt, E.C. (2000). Yra1p, a Conserved Nuclear RNA Binding Protein, Interacts Directly with Mex67p and is Required for mRNA Export. *EMBO J.*19, 410-420.
- Sträßer, K., Baßler, J., and Hurt, E.C. (2000). Binding of the Mex67p/Mtr2p heterodimer to FXFG, GLFG, and FG repeat nucleoporins is essential for nuclear mRNA export. *J. Cell Biol* 150, 695-706.
- Strawn, L. A., Shen, T. and Wentz, S. R., (2001). The GLFG regions of Nup116p and Nup100p serve as binding sites for both Kap95p and Mex67p at the nuclear pore complex. *J Biol Chem* 276, 6445-6452.
- Stutz, F. and Rosbash, M., (1998). Nuclear RNA export. *Genes Dev* 12, 3303-3319.
- Stutz, F., Bachi, A., Doerks, T., Braun, I. C., Seraphin, B., Wilm, M., Bork, P. and Izaurralde, E., (2000). REF, an evolutionary conserved family of hnRNP-like proteins, interacts with TAP/Mex67p and participates in mRNA nuclear export. *Rna* 6, 638-650.
- Suyama, M., Doerks, T., Braun, I. C., Sattler, M., Izaurralde, E. and Bork, P., (2000). Prediction of structural domains of TAP reveals details of its interaction with p15 and nucleoporins. *EMBO Rep* 1, 53-58.
- Tan, W., Zolotukhin, A. S., Bear, J., Patenaude, D. J. and Felber, B. K., (2000). The mRNA export in *Caenorhabditis elegans* is mediated by Ce-NXF-1, an ortholog of human TAP/NXF and *Saccharomyces cerevisiae* Mex67p. *Rna* 6, 1762-1772.
- Teixeira, M. T., Siniosoglou, S., Podtelejnikov, S., Benichou, J. C., Mann, M., Dujon, B., Hurt, E. and Fabre, E., (1997). Two functionally distinct domains generated by in vivo cleavage of Nup145p: a novel biogenesis pathway for nucleoporins. *Embo J* 16, 5086-5097.
- Tseng, S. S., Weaver, P. L., Liu, Y., Hitomi, M., Tartakoff, A. M. and Chang, T. H., (1998). Dbp5p, a cytosolic RNA helicase, is required for poly(A)<sup>+</sup> RNA export. *Embo J* 17, 2651-2662.
- Ullman, K. S., Powers, M. A. and Forbes, D. J., (1997). Nuclear export receptors: from importin to exportin. *Cell* 90, 967-970.

- Vainberg, I. E., Dower, K. and Rosbash, M., (2000). Nuclear export of heat shock and non-heat-shock mRNA occurs via similar pathways. *Mol Cell Biol* 20, 3996-4005.
- van Hoof, A., Lennertz, P. and Parker, R., (2000). Yeast exosome mutants accumulate 3'-extended polyadenylated forms of U4 small nuclear RNA and small nucleolar RNAs. *Mol Cell Biol* 20, 441-452.
- Vasu, S. K. and Forbes, D. J., (2001). Nuclear pores and nuclear assembly. *Curr Opin Cell Biol* 13, 363-375.
- Venema, J. and Tollervey, D. (1999). Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu.Rev.Genet.* 33, 261-311.
- Warner, J. R., (1990). The nucleolus and ribosome formation. *Curr Opin Cell Biol* 2, 521-527.
- Warner, J. R., (2001). Nascent ribosomes. *Cell* 107, 133-136.
- Wente, S. R. and Blobel, G., (1993). A temperature-sensitive NUP116 null mutant forms a nuclear envelope seal over the yeast nuclear pore complex thereby blocking nucleocytoplasmic traffic. *J Cell Biol* 123, 275-284.
- Wente, S. R., (2000). Gatekeepers of the nucleus. *Science* 288, 1374-1377.
- Wilson, S. M., Datar, K. V., Paddy, M. R., Swedlow, J. R. and Swanson, M. S., (1994). Characterization of nuclear polyadenylated RNA-binding proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 127, 1173-1184.
- Wimmer, C., Doye, V., Grandi, P., Nehrbass, U., and Hurt, E. (1992). A new subclass of nucleoporins that functionally interacts with nuclear pore protein NSP1. *EMBO J.* 11, 5051-5061.
- Winzeler, E. A., Shoemaker, D. D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J. D., Bussey, H., Chu, A. M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S. W., El Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S. H., Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J. H., Jones, T., Laub, M., Liao, and H., Davis, R. W. (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* 285 (5429): 901-6.
- Wodrich, H. and Krausslich, H. G., (2001). Nucleocytoplasmic RNA transport in retroviral replication. *Results Probl Cell Differ* 34, 197-217.
- Wolin, S. L. and Matera, A. G., (1999). The trials and travels of tRNA. *Genes Dev* 13, 1-10.
- Yan, C., Leibowitz, N. and Melese, T., (1997). A role for the divergent actin gene, ACT2, in nuclear pore structure and function. *Embo J* 16, 3572-3586.

- Yang, Q., Rout, M. P. and Akey, C. W., (1998). Three-dimensional architecture of the isolated yeast nuclear pore complex: functional and evolutionary implications. *Mol Cell* 1, 223-234.
- Yoon, J. H., Love, D. C., Guhathakurta, A., Hanover, J. A. and Dhar, R., (2000). Mex67p of *Schizosaccharomyces pombe* interacts with Rae1p in mediating mRNA export. *Mol Cell Biol* 20, 8767-8782.
- Yoshida, K. and Blobel, G., (2001). The karyopherin Kap142p/Msn5p mediates nuclear import and nuclear export of different cargo proteins. *J Cell Biol* 152, 729-740.
- Zanchin, N. I. and Goldfarb, D. S., (1999). Nip7p interacts with Nop8p, an essential nucleolar protein required for 60S ribosome biogenesis, and the exosome subunit Rrp43p. *Mol Cell Biol*, 19, 1518-1525.
- Zanchin, N.I.T., Roberts, P., DeSilva, A., Sherman, F., and Goldfarb, D.S. (1997). *Saccharomyces cerevisiae* Nip7p is required for efficient 60S ribosome subunit biogenesis. *Mol Cell Biol* 17, 5001-5015.
- Zenklusen, D. and Stutz, F., (2001). Nuclear export of mRNA. *FEBS Lett* 498, 150-156
- Zenklusen, D., Vinciguerra, P., Strahm, Y. and Stutz, F., (2001). The yeast hnRNP-Like proteins Yra1p and Yra2p participate in mRNA export through interaction with Mex67p. *Mol Cell Biol* 21, 4219-4232.
- Zhou, Z., Luo, M. J., Straesser, K., Katahira, J., Hurt, E. and Reed, R., (2000). The protein Aly links pre-messenger-RNA splicing to nuclear export in metazoans. *Nature* 407, 401-405.

## 6.3 Datenbanken und Programme

- ClustalW 1,8: <http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multi-align/multi-align.html>
- Boxshade 3.21: [http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)
- EuGenes Datenbank: <http://iubio.bio.indiana.edu:8089/>
- SGD Datenbank: <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>
- YPD Datenbank: <http://www.proteome.com/databases/index.html>

## 7 Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäure(n) (amino acid(s))
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
bzw.	beziehungsweise
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
C.e.	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CBC	Kappen-bindender Komplex (cap binding complex)
CBP	Calmodulin bindendes Peptid
d	Tage (days)
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
D.m.	<i>Drosophila melanogaster</i>
Da	Dalton
DAPI	4'-6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DTT	Dithiothreitol
E	Eluat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Ecm1p	Extra Zelluläre Mutante, 1. Mutante
ETS	external transcribed spacer
5'-FOA	5'-Fluorotic Acid
FT	Durchfluß (flow through)
g	Normfallbeschleunigung
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	Guaninnukleotid Austausch Faktor (guanine nucleotide exchange factor)
GFP /	grün-fluoreszierendes Protein /
eGFP	verbessertes grün-fluoreszierendes Protein (enhanced)
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTPase	Guanosin-5'-triphosphatase
h	Stunde
h.s.	<i>Homo sapiens</i>
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
hnRNP	heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein-Partikel
ITS	internal transcribed spacer
Kap	Karyopherin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB-Puffer	Lysepuffer (Lysis buffer)

M	Marker
MDa	Megadalton
Mex67p	mRNA Exportfaktor von 67 kDa
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
mRNP	mRNA enthaltendes Ribonukleoprotein Partikel
MTR	mRNA Transport
Mtr2p	mRNA Transport, zweite Mutante
NES	nukleäre Export-Sequenz (nuclear export sequence)
NLS	nukleäre Lokalisierungs-Sequenz (nuclear localisation sequence)
NPC	nukleärer Kernporenkomplex (nuclear pore complex)
NRM	Nukleoporin-RNA-Bindungsmotiv (nucleoporin RNA binding motif)
Ntf2p	Nukleärer Transportfaktor
Nug1p	Nukleäre GTPase, 1. charakterisiertes Protein
Nug2p	Nukleäre GTPase, 2. charakterisiertes Protein
Nup	Nukleoporin / Kernporenprotein
NXF	nukleärer Export Faktor
NXT	NTF2 verwandter Export Faktor
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster (open reading frame)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Ran	Ras-verwandtes nukleäres Protein (Ras-related nuclear protein)
RAT	<u>R</u> ibonucleic <u>A</u> cid <u>T</u> rafficking
RIX	Ribosomale Exportmutante / <u>R</u> ibosomen <u>E</u> xport
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNP	Ribonukleoprotein Partikel
REF	<u>R</u> NA und <u>E</u> xportfaktor bindende Proteine
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
RRE	Rev Response Element
rRNA	ribosomale RNA
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
S.c.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
S.p.	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SDC	Glukose-haltiges Medium für Hefe
SDS	Natriumdodecylsulfat
Shuffle Stamm	Disruptionsstamm komplementiert mit einem pURA3-WT Plasmid
sl	synthetisch letal / synthetische Letalität
snoRNA	kleine nukleoläre RNA (small nucleolar RNA)
TAP	Tandem Affinity Purification

---

TCA	Trichloressigsäure
TE	Total Extrakt (Zelllysate)
TEV	tobacco etch virus
tRNA	Transfer-RNA
ts	Temperatur-sensitiv
U	unit
UTR	Untranslated region
wt	Wildtyp
WW	Wechselwirkung
YPD	Glukose-haltiges Vollmedium für Hefe
YPG	Galaktose-haltiges Vollmedium für Hefe
µl	Mikroliter
µM	mikromolar

### Termini tecnici

Häufig in Laborjargon verwendete Fachausdrücke wie Screen, Assay, Repeats, Inkubation, etc. wurden nicht übersetzt und ohne Anführungszeichen in dieser Arbeit benutzt.