

---

# INAUGURAL – DISSERTATION

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

vorgelegt von  
Diplom-Chemiker Andreas Benedict Braunwarth  
aus Heidelberg

Tag der mündlichen Prüfung \_\_\_\_\_

---

Thema:

**Identifizierung und Charakterisierung eines  
neuen Modulators des RanGTPase-Zyklus**

**Gutachter:**

**Prof. Dr. Ed Hurt  
Prof. Dr. Friedrich Marks**

## Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Meinen Eltern danke ich für ihre unermüdliche Unterstützung in jeder erdenklichen Weise und dafür, daß sie mir diese Ausbildung überhaupt erst ermöglicht haben.

Meinen Betreuern Professor Dr. Ed Hurt und Dr. Markus Künzler danke ich für zahlreiche konstruktive Diskussionen, die guten Arbeitsbedingungen sowie für die interessante Themenstellung.

Herrn Professor Dr. Friedrich Marks danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Frau Dr. Micheline Fromont-Racine (Institute Pasteur, Paris) danke ich für die Möglichkeit, in ihrer Arbeitsgruppe die Zwei-Hybrid-Durchmusterung durchführen zu können, sowie für die Analyse der positiven Klone. Frau Siau Wei Bai in der Arbeitsgruppe von Frau Professor Dr. Valérie Doye (Institute Curie, Paris) sowie Herrn Dr. Hans-Peter Schmitz in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Peter Philippsen (Biozentrum, Basel) danke ich für die Analyse der YRB30-Homologen in *S. pombe* bzw. *A. gossypii*. Herrn Dr. Ralf Bischoff (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) danke ich für die Quantifizierung der Aktivitätsänderung des GTPase-Zyklus durch Yrb30p.

Meinen Freunden und Arbeitskollegen möchte ich Dank sagen für moralische Unterstützung, kameradschaftlichen Umgang und für ihre stete Hilfsbereitschaft. Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Cora Walter sowie Denise Lau, Thomas Gerstberger und Dr. Katja Strässer, die mir nicht nur in der Zeit des Zusammenschreibens dieser Arbeit durch zahlreiche liebevolle Gespräche, viele fachliche Diskussionen und gute Vorschläge sehr geholfen haben.

# Inhalt

<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>2</b>
1.1 Die Kompartimentalisierung eukaryontischer Zellen erfordert einen aktiven Transport.....	2
1.2 Struktur der Kernporen .....	2
1.3 Die Familie der Karyopherine und ihre Rolle als Rezeptoren eines aktiven, gerichteten Kerntransports.....	5
1.4 Der GTPase-Zyklus und die Rolle von Ran beim nukleozytoplasmatischen Transport.....	8
1.5 Energetik des gerichteten Transports.....	12
1.6 Export von tRNA.....	13
1.7 Export von mRNA.....	13
1.8 Export von rRNA .....	15
1.9 Ran-unabhängige Kerntransportprozesse .....	16
1.10 Ran - seine bisher bekannten Bindungspartner und deren zelluläre Funktion ..	16
1.10.1 RanBP1, RanBP2/Nup358, RanBP3/Yrb2p, Nup50/Nup2p .....	18
1.10.2 RanGAP1 (Rna1p).....	20
1.10.3 RCC1 (Prp20p).....	22
1.10.4 NTF2.....	23
1.10.5 NXT1/p15 .....	25
1.10.6 Nup358/RanBP2, Nup153 .....	26
1.10.7 Mog1 .....	27
1.10.8 Dis3.....	29
1.10.9 RanBPM .....	29
1.11 Regulation unterschiedlicher zellulärer Prozesse durch Ran .....	30
1.11.1 Allgemeine Betrachtungen.....	30
1.11.2 In der Metaphase stimuliert Ran die Ausbildung von Mikrotubuli und Spindeln ...	32
1.11.3 In der Telophase reguliert Ran die Ausbildung der Kernmembran .....	35
1.11.4 Indirekte Beeinflussung anderer zellulärer Prozesse durch Ran.....	37
<b>2 ZIEL DER ARBEIT .....</b>	<b>38</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>39</b>
3.1 Molekularbiologische Methoden.....	39
3.1.1 Allgemeine Methoden zur DNA-Manipulation.....	39
3.1.2 Verwendete Plasmide .....	40
3.2 Mikrobiologische Methoden .....	44
3.2.1 Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> .....	44
3.2.1.1 <i>Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen aus E. coli</i> .....	44
3.2.1.2 <i>Aufreinigung von His<sub>6</sub>-Fusionsproteinen aus E. coli</i> .....	45
3.2.1.3 <i>Aufreinigung und Beladung von His<sub>6</sub>-Gsp1 aus E. coli</i> .....	45

3.2.2	Arbeiten mit <i>S. cerevisiae</i> .....	46
3.2.2.1	Medien zur Hefezüchtung / Hefezüchtung .....	46
3.2.2.2	Verwendete Hefestämme.....	47
3.2.2.3	Wachstumsanalyse von Hefezellen.....	51
3.2.2.4	Test auf Defekte im invasiven Wachstum .....	51
3.2.2.5	Lokalisierung von Proteinen mithilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie.....	52
3.2.2.6	In situ-Hybridisierung von poly(A) <sup>+</sup> RNA.....	53
3.2.2.7	Aufreinigung von ProtA-Fusionsproteinen aus Hefe.....	53
3.2.2.8	Aufreinigung von einem TAP-Fusionsprotein.....	54
3.2.2.9	<i>S. cerevisiae</i> -Gesamtproteinextrakte.....	55
3.2.2.10	Synthetisch-letale Durchmusterung des Genoms mit der $\Delta$ yrb30-Mutante .....	56
3.2.2.11	Zwei-Hybrid-Screen mit unterschiedlichen Hefe-Ran-Mutanten .....	56
3.3	Biochemische Methoden .....	58
3.3.1	In-vitro Bindungsstudien zur Bestimmung von Protein-Protein-Interaktionen.....	58
3.3.2	Bindungsstudien mit Hefeextrakt.....	58
3.3.3	Detektion von Yrb30p innerhalb eines Saccharose-Dichtegradienten .....	59
3.3.4	Quantitative Messung des RanGEF-vermittelten Guanin-nukleotid-Austauschs, der RanGAP-vermittelten GTP-Hydrolyse sowie der intrinsischen GTP- Hydrolyseaktivität.....	60
3.4	Immunologische Methoden.....	60
3.4.1	Erzeugung von $\alpha$ -Yrb30p Antikörpern .....	60
3.4.2	Immunoblot.....	61
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>62</b>
4.1	Aufreinigung von ProtA-Gsp1p aus <i>S. cerevisiae</i> .....	62
4.2	Durchmusterung des Hefegenoms nach neuen Ran-bindenden Proteinen mittels der Zwei-Hybrid-Technik.....	65
4.3	Aufreinigung der potentiellen neuen Ran-bindenden Proteine aus Hefe .....	68
4.4	In vitro-Bindungsstudien zum Test einer direkten Interaktion der Kandidaten mit Gsp1p.....	72
4.4.1	Aufreinigung von GST-Yrb30p und His-Yrb30p .....	72
4.4.2	Yrb30p interagiert in vitro direkt und spezifisch mit Gsp1pGTP .....	73
4.5	Yrb30p interagiert nicht mit anderen GTPasen, außer mit Ran .....	75
4.6	Bestimmung der Ran-Bindedomäne (RBD) auf Yrb30p.....	76
4.7	Charakterisierung der Bindungsstelle von Yrb30p auf RanGTP .....	78
4.7.1	Yrb1p und Yrb30p konkurrieren um die Bindungsstelle auf Ran.....	78
4.7.2	Yrb30p kann trimere Komplexe mit Ran und Karyopherinen bilden .....	80
4.7.3	Der trimere Komplex aus dem Exportin Xpo1p, Gsp1p und Yrb30p unterscheidet sich von dem analogen Komplex mit Yrb1p .....	81
4.8	Beeinflussung des RanGTPase-Zyklus durch Yrb30p .....	83
4.9	Lokalisation von Yrb30p .....	85
4.9.1	Unter Wildtypbedingungen lokalisiert Yrb30p ausschließlich im Zytoplasma .....	85
4.9.2	Yrb30p wird durch Xpo1p vermittelt exportiert .....	87
4.9.3	Die im C-Terminus lokalisierte NES von Yrb30p ist auch in einem heterologen Kontext funktionell.....	94
4.9.4	Eine N-terminal deletierte Yrb30p-Mutante pendelt zwischen Kern und Zytoplasma hin und her .....	99
4.10	Die RanGTP-Bindung im Export-Komplex unterscheidet sich von der direkten Ran-Bindung .....	100

4.11	Analyse genetischer Beziehungen von YRB30 mit anderen Komponenten der Hefe .....	101
4.11.1	YRB30 ist nicht essentiell für vegetatives Wachstum unter verschiedenen Bedingungen und für verschiedene Prozesse (inklusive nukleozytoplasmatischem Transport) .....	101
4.11.1.1	<i>Verschiedene Transportfaktoren zeigen in Kombination mit der Deletion von YRB30 keinen Wachstumsdefekt</i> .....	101
4.11.1.2	<i>Die Überexpression von Yrb30p supprimiert partiell die Toxizität der Gsp1pG21V-Mutante</i> .....	103
4.11.1.3	<i>Überprüfung von Sensitivitäten auf bestimmte Zellgifte bzw. Wachstum unter speziellen Bedingungen</i> .....	104
4.11.1.4	<i>Überprüfung Hefe-spezifischer Funktionen</i> .....	105
4.11.1.5	<i>Überprüfung von Transportdefekten in <math>\Delta</math>yrb30-Zellen mithilfe verschiedener Reporterproteine</i> .....	106
4.12	Durchmusterung des Genoms auf synthetisch letale Beziehungen von YRB30 mit verschiedenen Transportmutanten ('SL-Screen') .....	109
4.13	Durchmusterung des Hefegenoms nach weiteren Bindungspartnern von Yrb30p mittels der Zwei-Hybrid-Technik .....	109
4.14	Biochemische Versuche zur Identifizierung von Proteinen, die mit Yrb30p interagieren .....	110
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>113</b>
5.1	Yrb30p ist ein neuer Modulator des RanGTPase-Zyklus .....	113
5.2	Yrb30p pendelt möglicherweise zwischen Kern und Zytoplasma .....	114
5.3	Yrb30p übt möglicherweise eine Pilz-spezifische Funktion aus .....	115
5.4	Ausblick .....	118
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>119</b>
<b>7</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>134</b>
<b>8</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>135</b>
<b>9</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>136</b>

## Zusammenfassung

Der kleinen GTPase Ran kommt in interphasischen Zellen eine zentrale Rolle beim Transport von Molekülen durch die Kernmembran zu. In höheren eukaryontischen Zellen zerfällt während der Prometaphase der Mitose die Kernmembran. Es konnte neuerdings gezeigt werden, daß Ran auch in mitotischen Zellen eine wichtige regulatorische Funktion, nämlich bei der Ausbildung von Spindeln sowie in der Telophase bei der Neubildung der Kernmembran, übernimmt. Ob Ran auch in einfachen Eukaryonten weitere direkte Funktionen ausübt, ist bislang unklar.

Um neue Bindungspartner von Ran in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* zu identifizieren, wurde eine Zwei-Hybrid-Durchmusterung des Hefegenoms unter Verwendung des Hefehomologen von Ran, Gsp1p, als Beute durchgeführt. Dabei konnte ein bislang uncharakterisiertes Protein (Yrb30p), kodiert durch den ORF YGL164C, als neues mit Ran interagierendes Protein identifiziert werden. Dieses nichtessentielle Protein interagiert spezifisch mit der GTP-gebundenen Form von Ran, weist jedoch keinerlei Sequenzähnlichkeiten mit anderen RanGTP-bindenden Proteinen auf. Es konkurriert mit dem Ran-bindenden Protein Hefe-RanBP1 (Yrb1p) um die Bindung an RanGTP und besitzt wie Yrb1p die Fähigkeit mit RanGTP und einigen Karyopherinen trimere Komplexe zu bilden. Im Gegensatz zu Yrb1p, welches als Koaktivator der RanGAP1(Rna1)-vermittelten GTP-Hydrolyse von Ran fungiert, inhibiert Yrb30p die Hydrolyse und ist in dieser Hinsicht den Karyopherinen ähnlich. Obwohl das Protein unter Normalbedingungen im Zytoplasma lokalisiert, konnte eine funktionelle nukleäre Export-Sequenz (NES) im C-Terminus von Yrb30p nachgewiesen werden. Die Lokalisation verschiedener Mutanten weist darauf hin, daß Yrb30p zwischen Kern und Zytoplasma hin- und herpendelt und neben einem Xpo1-abhängigen Export noch ein alternativer Exportweg existiert.

Weder die Überproduktion des Proteins noch die Deletion des *YRB30* ORFs führt alleine bzw. in Kombination mit verschiedenen Mutanten des RanGTPase-Zyklus zu einem erkennbaren Wachstumsdefekt. Diese Resultate sowie die Tatsache, daß Homologe nur in anderen Pilzen identifiziert werden konnten, deuten darauf hin, daß Yrb30p ein Modulator des RanGTPase-Zyklus ist, der möglicherweise auf das Pilzreich beschränkt ist.

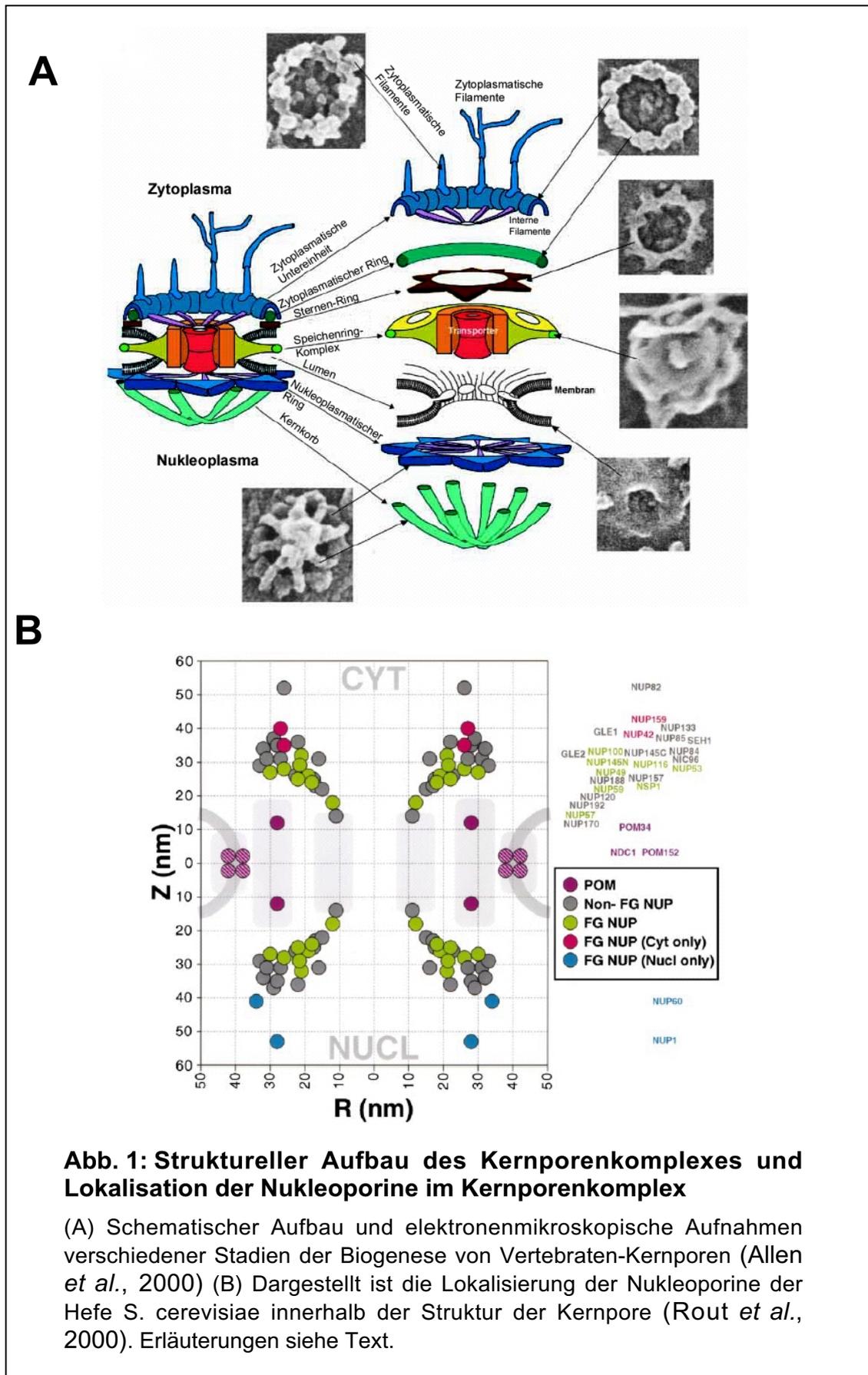
# 1 Einleitung

## 1.1 Die Kompartimentalisierung eukaryontischer Zellen erfordert einen aktiven Transport

Die meisten biochemischen Prozesse prokaryontischer Zellen laufen in einem einzigen zellulären Kompartiment ab. Eukaryontische Zellen dagegen zeichnen sich durch eine ausgesprochene Kompartimentalisierung aus. So teilt die Kernmembran die Zelle in ein nukleäres Kompartiment für die Lagerung und Transkription der Erbinformation, sowie ein zytoplasmatisches Kompartiment für deren Translation. Durch diese Kompartimentalisierung können metabolische Prozesse weitaus besser reguliert werden, jedoch erfordert deren Aufrechterhaltung einen effektiven Stoffaustausch zwischen Kern und Zytoplasma. Verschiedene Transportsubstrate, wie z. B. Boten-RNAs (mRNAs), Transfer-RNAs (tRNAs), ribosomale Untereinheiten und snRNA müssen aus dem Kern ins Zytoplasma transportiert werden. Umgekehrt müssen viele Proteine mit einer Funktion im Kern aus dem Zytoplasma in den Kern importiert werden. Einige Proteine wandern zwischen Kern und Zytoplasma hin und her. Dieser 'Shuttling'-Mechanismus wird manchmal zur Regulation in Form von Sequestrierung des betreffenden Proteins im Zytoplasma oder Nukleoplasma genutzt. Alle Transportprozesse finden ausschließlich durch Kernporenkomplexe (NPCs, nuclear pore complexes) statt, die in die den Kern umhüllende Doppelmembran eingebettet sind.

## 1.2 Struktur der Kernporen

Kernporen sind makromolekulare Komplexe, die aus vielen verschiedenen Kernporenproteinen, den sogenannten Nukleoporinen (NUPs) aufgebaut sind. In der Hefe *S. cerevisiae* sind diese Komplexe aus etwa 30 Nukleoporinen aufgebaut und besitzen ein Molekulargewicht von ca. 60 MDa. In höheren Eukaryonten bilden ebenfalls etwa 30 Proteine einen ca. 120 MDa großen Kernporenkomplex (Cronshaw *et al.*, 2002). Die Struktur von Kernporen wurde mittels Elektronenmikroskopie (EM) bis zu einer Auflösung von 25 Angström ermittelt (Abb. 1A).



Kernporen besitzen eine achtfache Rotationssymmetrie um einen zentralen Kanal. Der zentrale Kanal besteht aus dem Speichenring, welcher auf der zytoplasmatischen Seite mit einem Ring verbunden ist, von dem acht in das Zytoplasma hineinreichende Fibrillen ausgehen. Eine ähnliche Ringstruktur existiert auf nukleärer Seite, diese geht jedoch in eine den Kanal verengende korbähnliche Struktur über. Es gibt Hinweise, daß die Kernpore mit nukleären Filamenten (Galy *et al.*, 2000; Kosova *et al.*, 2000) und dem zytoplasmatischen Zytoskelett verbunden ist (Yan *et al.*, 1997), was für den Transport von Transportsubstraten zur Kernpore bzw. von ihr weg von Bedeutung sein kann.

Interessanterweise besitzen Kernporen aus Hefe und Vertebraten nicht nur die gleiche Grundstruktur, sondern sind – von wenigen Ausnahmen abgesehen – auch aus den gleichen Subkomplexen aufgebaut (Vasu und Forbes, 2001), was für evolutionär konservierte Transportmechanismen spricht.

Durch genetische Analysen (Fabre und Hurt, 1997) und biochemische Aufreinigungen von Kernporenkomplexen (Siniossoglou *et al.*, 1996; Rout und Aitchison, 2001) konnten die 30 Nukleoporine der Hefe *S. cerevisiae* identifiziert werden. Neben rein strukturellen Aufgaben üben Nukleoporine auch direkte Funktionen bei der Translokation der Transportsubstrate aus. Viele Nukleoporine besitzen Wiederholungen (Repeats) bestimmter hydrophober Aminosäurereste (FXFG-, GLFG- und FG-Repeats). Es wurde gezeigt, daß diese Domänen Transportfaktoren als Bindungsstelle dienen (Bayliss *et al.*, 2000; Quimby *et al.*, 2001; Rout und Aitchison, 2001) (siehe auch nächstes Kapitel).

Eine Lokalisation der Nukleoporine (siehe Abb. 1B, (Rout *et al.*, 2000)) ergab im wesentlichen eine symmetrische Verteilung der meisten Nukleoporine bezüglich der Kernmembran-Ebene, trotz der unterschiedlichen Morphologie der zytoplasmatischen und der nukleären Seite der Pore. Die asymmetrische Verteilung bestimmter Nukleoporine könnte beim gerichteten Transport eine Rolle spielen (Denning *et al.*, 2001).

Durch den ca. 9 nm großen inneren Kanal der Kernporenkomplexe können Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa passiv hindurch

diffundieren. Um jedoch die erforderliche Effizienz des Transports (bis zu 1000 Transportsubstraten pro Sekunde pro Kernpore; (Ribbeck und Görlich, 2001)). zu gewährleisten, werden oft auch solche Substrate, die theoretisch klein genug wären um passiv die Kernpore zu durchdringen, aktiv unter Energieverbrauch durch die Pore transportiert (Rout *et al.*, 1997; Schlenstedt *et al.*, 1997). Bei grösseren Substraten, wie z. B. ribosomalen Untereinheiten, nimmt man an, dass sich die Kernpore beim Transportvorgang öffnet, so daß Moleküle bis zu einem Durchmesser von 25 nm hindurch transportiert werden können (Feldherr *et al.*, 1984).

### **1.3 Die Familie der Karyopherine und ihre Rolle als Rezeptoren eines aktiven, gerichteten Kerntransports**

Proteine und andere Makromoleküle werden durch nukleäre Lokalisierungssequenzen (NLS) bzw. nukleäre Exportsignale (NES) über die Kernmembran in das entsprechende Kompartiment gelenkt. Verantwortlich für die Erkennung dieser Signalsequenzen und den gerichteten Transport ist die Proteinfamilie der Karyopherine. Je nach Transportrichtung unterscheidet man zwischen Importinen und Exportinen (siehe auch Abb. 2). Die Bindung der Karyopherine an ihr Substrat erfolgt entweder direkt oder indirekt über Adaptoren. Ein viel studierter Adaptor ist  $\alpha$ -Karyopherin (Importin- $\alpha$ ), der Rezeptor für das klassische nukleäre Lokalisations-Signal, das sich durch eine Anhäufung von basischen Aminosäureresten auszeichnet. Importin- $\alpha$  bindet dabei mit seiner N-terminalen Importin- $\beta$ -bindenden (IBB)-Domäne an Importin- $\beta$  (Görlich *et al.*, 1995; Weis *et al.*, 1995), was zur Bildung von heterotrimeren Importkomplexen führt. Ein weiteres Beispiel für einen Adaptor für Importin  $\beta$  ist Snurportin, das reife Spleiss U snRNPs im Zytoplasma erkennt (Huber *et al.*, 1998; Huber *et al.*, 2002).

In *S. cerevisiae* umfasst die Familie der Karyopherine 14 Mitglieder (siehe Tabelle 1) (Adam, 1999). Dabei dienen 10 als Importrezeptoren (Importine), 3 als Exportrezeptoren (Exportine) und ein Karyopherin (Msn5p/Kap142p) kann sowohl als Import-, als auch als Exportrezeptor fungieren (Yoshida und Blobel, 2001). Interessanterweise sind nur 4 dieser Karyopherine essentiell

(Kap95p, Pse1p, Cse1p, Xpo1p). Der Mensch besitzt mehr als 20 verschiedene  $\beta$ -Karyopherine (Mattaj und Englmeier, 1998; Görlich und Kutay, 1999; Mingot *et al.*, 2001).

**Tabelle 1: Übersicht über die Transportrezeptoren der Importin- $\beta$ -Familie der Hefe *Saccharomyces cerevisiae***

Importin	alternativer Name	Substrat
Kap95	Rsl1p / Imp $\beta$	NLS enthaltene Proteine (vermittelt über Imp $\alpha$ als Adaptor an Kap95)
Kap104	Transportin	mRNA bindende Proteine Nab2p, Hrp1p, Nab4p
Kap108	Sxm1p	Lhp1p, Rpl11p, Rpl31p
Kap111p	Mtr10p	Npl3p
Kap114p	HRC1004p	TATA-bindende Proteine Tbp1p
Kap119p	Nmd5p	Hog1p, TFIIS (evtl. am Export der großen ribosomalen Untereinheit beteiligt)
Kap120p	Lph2p	bislang unbekannt (evtl. am Export der großen ribosomalen Untereinheit beteiligt)
Kap121p	Pse1p	ribosomale Proteine, Pho4p, Yra1p, Yra2p, Spo12p, Yap1p, Ste12p
Kap122p	<i>Pdr6p</i>	Toa1p-Toa2p-Komplex
Kap123p	Yrb4p	ribosomale Proteine
Kap142p	Msn5p	trimeres Replikationsprotein A (RPA)
Exportin	alternativer Name	Substrat
Kap124	Xpo1p, Crm1p, Exportin 1	NES enthaltene Proteine
	Cse1p	Srp1 (Importin $\alpha$ )
	Los1p	tRNA
Kap142p	Msn5p	phosphoryliertes Pho4p und Far1p, Ste5p, Mig1p, Msn2p

nach Görlich und Kutay (1999), aktualisiert nach Blondel *et al.* (1999), Mahanty *et al.* (1999), Titov und Blobel (1999), Yoshida und Blobel (2001), Leslie *et al.* (2002)

Der scheinbare Widerspruch, daß nicht-essentielle Transportfaktoren essentielle Substrate transportieren, läßt sich dadurch erklären, daß ein essentielles Substrat von mehr als einem (nichtessentiellen) Karyopherin transportiert werden kann (Rout *et al.*, 1997; Morehouse *et al.*, 1999; Pemberton *et al.*, 1999; Titov und Blobel, 1999).

Neben der spezifischen Affinität für ihr jeweiliges Substrat besitzen die Karyopherine auch eine deutliche Affinität für die hydrophoben Repeats von Nukleoporinen. Diese Affinität ist die Voraussetzung dafür, daß die Karyopherine ständig zwischen Zytoplasma und Kern hin- und herwandern (Hurt, 1996; Askjaer *et al.*, 1999; Seedorf *et al.*, 1999).

So wurde postuliert, daß Nukleoporenkomplexe nicht einfach starre Kanäle sind, sondern selektiv mit Transportrezeptoren aufgrund deren stark hydrophoben Oberfläche interagieren (Ribbeck und Görlich, 2002). Gegenwärtig werden in der Literatur unterschiedliche Modelle für diese Selektivität für Transportrezeptoren (einschließlich NTF2) diskutiert. So wird zum einen eine Anhäufung von FG-Repeats im Innern des Kernporenkomplexes dafür verantwortlich gemacht (Ribbeck und Görlich, 2001). Ein sequenzielles Binden und Ablösen der Transportkomplexe an verschiedene Nukleoporine entlang der Pore aufgrund eines zunehmenden Affinitätsgradienten könnte neben dem Ran-Gradienten (siehe Kapitel 1.4) die Direktionalität des Transportprozesses bestimmen (Ben-Efraim und Gerace, 2001). Rout *et al.* postuliert ein Einfangen und eine anschließende Durchschleußung von Transportrezeptoren durch Filamente sowie ein Entfernen von inerten Molekülen durch diese Filamente (Rout *et al.*, 2000), während Macara von einem Netzwerk FG-Repeats enthaltender Filamente ausgeht, die den aktiven Transport von Transportrezeptoren erleichtern (Macara, 2001).

Experimente in zellfreien Systemen haben gezeigt, daß diese Affinität von Karyopherinen zu Nukleoporinen die Ausbildung einer Kernmembran in Zell-extrakten induzieren kann, was besonders im Zusammenhang mit der durch Importin  $\beta$  vermittelten regulatorischen Rolle von Ran bei der Neubildung der Kernmembran in der Telophase (siehe Kapitel 1.11.3) interessant ist (Zhang *et al.*, 2002).

Vor kurzem wurde Importinen eine zusätzliche, sehr interessante Funktion zugeschrieben, nämlich als zytoplasmatisches Chaperon, das die Aggregation stark basischer Proteine (wie z. B. ribosomale Proteine oder Histone) mit zytoplasmatischen Polyanionen wie z. B. RNA verhindert (Jäkel *et al.*, 2002). Die Importine binden an die basischen Sequenzbereiche, halten die Proteine im Zytoplasma löslich und ermöglichen gleichzeitig deren Import in den Kern.

Das gemeinsame Kennzeichen der  $\beta$ -Karyopherine ist eine etwa 150 Aminosäuren umfassende, relativ konservierte N-terminale RanGTP-Bindungsdomäne (Görlich und Kutay, 1999). Die weniger konservierte C-terminale Domäne dient zur Interaktion mit den Transportsubstraten und den Nukleoporinen. Die Kristallstruktur zweier Importrezeptoren weist eine konservierte Struktur auf, in der die innere Seite des Bogens an RanGTP bzw. das Substrat bindet, während die äußere Seite mit den Repeats der Nukleoporine interagiert (Bayliss *et al.*, 2000). Die RanGTP-Bindung spielt eine entscheidende Bedeutung für die Direktionalität des Kerntransports, indem sie die Bindung bzw. Ablösung des Transportsubstrates und der Nukleoporine vom Karyopherin moduliert (siehe Abb.2).

#### **1.4 Der GTPase-Zyklus und die Rolle von Ran beim nukleozytoplasmatischen Transport**

Ein zentraler löslicher Faktor des nukleozytoplasmatischen Transports ist die zur Superfamilie der Ras-ähnlichen kleinen GTP-bindenden Proteine (G-Proteine) gehörende kleine, vorwiegend nukleäre Ras-ähnliche Guanosin-triphosphatase (GTPase) Ran (Azuma und Dasso, 2000) (Gsp1p/Gsp2p in *S. cerevisiae*, siehe auch Kapitel 1.11).

Unterschiedliche Bindungspartner der GTP- bzw. GDP-gebundenen Form von Ran ermöglichen eine regulatorische Rolle dieses Proteins. Da Ran selbst nur eine sehr niedrige intrinsische Nukleotidhydrolyse- und Austauschaktivität besitzt, benötigt das Durchlaufen eines RanGTPase-Zyklus zusätzliche Hilfsenzyme, die eine schnelle und effektive Steuerung gewährleisten.

Der Ran-Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor RanGEF (RCC1 – regulator of chromosome condensation, Prp20p in *S. cerevisiae*) ist ein ausschließlich nukleäres Protein, welches an Chromatin bindet. Der RanGEF wandelt die GDP-gebundene Form in die GTP-gebundene Form um (Bischoff und Ponstingl, 1991). Es konnte gezeigt werden, daß RCC1 vorwiegend durch die Histone H2A und H2B an die DNA gebunden vorliegt (Nemergut *et al.*, 2001). Zusätzlich hierzu wurde jedoch auch ein geringerer Anteil mit Lokalisation am Nukleoporenkomplex nachgewiesen (Fontoura *et al.*, 2000).

Im Gegensatz hierzu befindet sich das Ran-spezifische GTPase-aktivierende Protein RanGAP (RanGAP1, Rna1 in *S. cerevisiae*) praktisch ausschließlich im Zytoplasma (Matunis *et al.*, 1996), geringe Mengen wurden jedoch auch im Kern nachgewiesen (Traglia *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1999). RanGAP aktiviert die Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP (Bischoff *et al.*, 1994) und wird dabei durch das zytoplasmatische RanGTP-bindende Protein RanBP1 (Yrb1 in *S. cerevisiae*, yeast Ran-binding protein 1) unterstützt (Bischoff und Ponstingl, 1995; Schlenstedt *et al.*, 1995).

Aufgrund der unterschiedlichen zellulären Verteilung dieser Enzyme kommt es zu einer kompartmentellen Trennung von GTP-Hydrolyse und Guanin-Nukleotid-Austausch. Daher liegt Ran im Zytoplasma überwiegend als RanGDP, im Kern jedoch in der GTP-gebundenen Form vor. Diese asymmetrische Verteilung der GTP- bzw. GDP-gebundenen Form von Ran über die Kernmembran hinweg erfordert zum Durchlaufen eines GTPase-Zyklus ein Pendeln von Ran zwischen Kern und Zytoplasma und ermöglicht dadurch überhaupt erst einen gerichteten Transport. Der Ran-Gradient aufgrund der unterschiedlichen subzellulären Lokalisation der Regulatoren ist daher ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal der beiden Kompartimente und dient der Zelle als Marker für eine nukleäre bzw. zytoplasmatische Identität.

Nukleozytoplasmatischer Transport wird ermöglicht aufgrund des unterschiedlichen Bindungsverhaltens der GTP- bzw. GDP-gebundenen Form. So bilden sich trimere Exportkomplexe aus Exportin, Ran und Substrat (Cargo) nur in Gegenwart von Ran-GTP, also ausschließlich im Zellkern. Nach Transport des Komplexes ins Zytoplasma wird RanGTP durch RanGAP und den Koaktivator RanBP1 (Yrb1p) hydrolysiert zu RanGDP, wodurch der trimere Exportkomplex in seine Einzelkomponenten zerfällt. Das freie Exportin wird dann alleine wieder in den Kern reimportiert. Msn5, das auch als Importrezeptor fungieren kann, wird zum Teil auch substratgebunden zurück in den Kern gebracht.

Importkomplexe aus Importrezeptor (Importin  $\beta$ ) und Substrat bilden sich hingegen nur in Abwesenheit von RanGTP, also im Zytoplasma. Nach Transport des Komplexes in den Zellkern bindet RanGTP an den Importrezeptor

und bewirkt die Dissoziation des Komplexes d.h. Freisetzung des Substrates.  $\beta$ -Importine werden dann, möglicherweise gebunden an RanGTP, wieder in das Zytoplasma zurück gebracht. Importin- $\alpha$  benötigt das Exportin CAS (Cse1p in *S. cerevisiae*) und RanGTP, um ins Zytoplasma zurückzukehren (Kutay *et al.*, 1997).

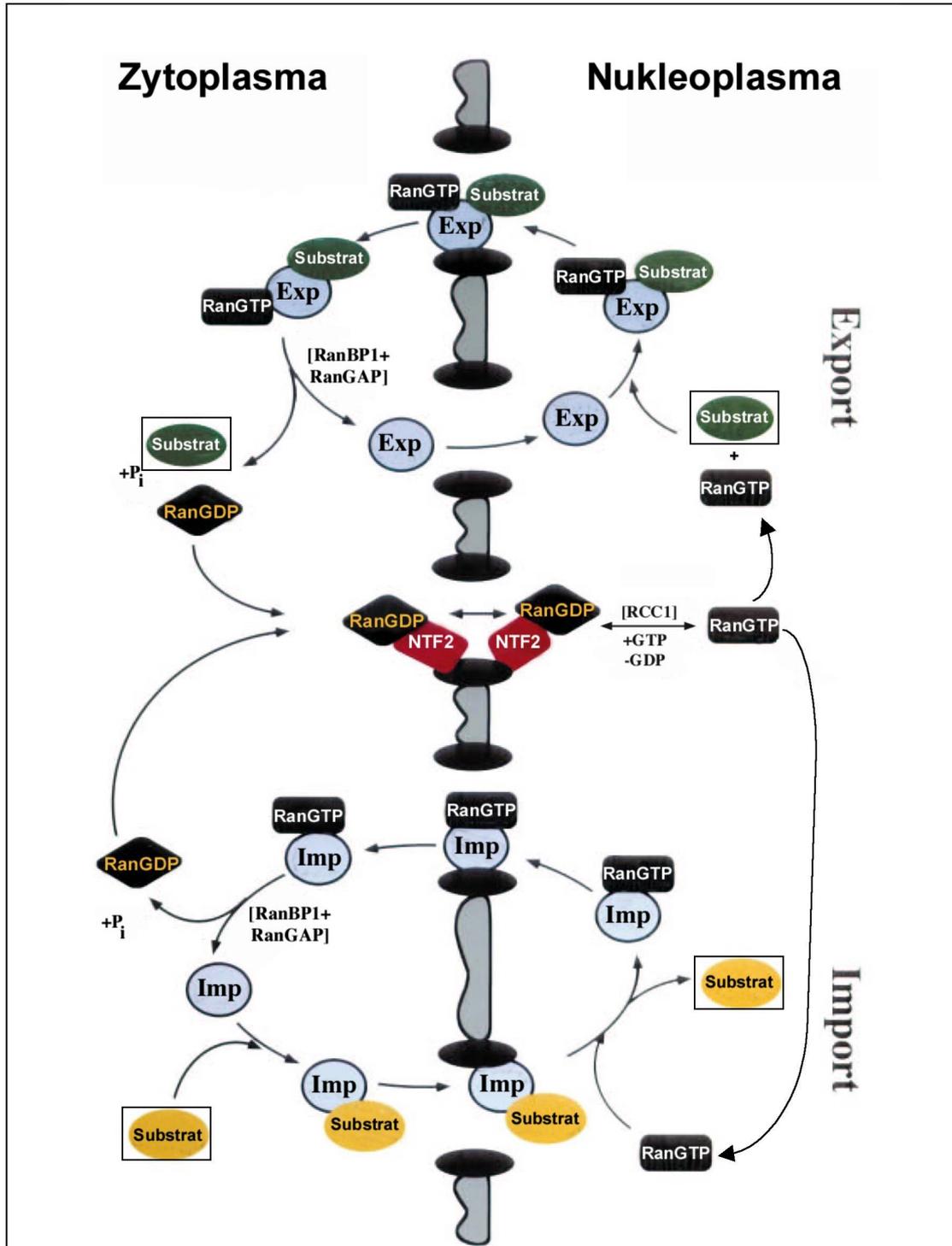
Zur Aufrechterhaltung des Transports vom Kern ins Zytoplasma ist es erforderlich, daß mitexportiertes Ran (RanGTP) wieder in den Kern re-importiert wird. Diese Aufgabe erfüllt der Nukleäre Transportfaktor 2 (Ntf2).

Neben den Hauptregulatoren des Ran-Zyklus - RanGEF, RanGAP, RanBP1 (Yrb1p), Ntf2 und den Karyopherinen - können jedoch auch andere Faktoren teilweise regulatorische Funktionen übernehmen. So wurde z.B. gezeigt, daß zur Dissoziation der Importkomplexe mRNA bindener Proteine wie Npl3p, Nab2p und Hrp1p neben RanGTP auch RNA benötigt wird (Senger *et al.*, 1998; Lee und Aitchison, 1999).

Ebenso wird Tbp1p – ein Transkriptionsfaktor (TA-TA-Box-bindendes Protein)-erst durch Anwesenheit TATA-Box enthaltender DNA von seinem Importin (Kap114p) losgelöst (Pemberton *et al.*, 1999).

So ist zu vermuten, daß auch noch andere Import- und Export-Substrate nicht direkt nach aktivem Transport durch die Kernpore dissoziieren, sondern bis zu ihrem Bestimmungsort als stabiler Komplex transportiert werden.

Ähnliche Mechanismen sind grundsätzlich auch für den nukleären Export denkbar, d.h. daß RanGAP Kofaktoren für die Dissoziation von Exportkomplexen benötigt. Ein solcher Kofaktor, allerdings ein ziemlich ubiquitärer, ist RanBP1 (siehe Kapitel 1.10.1).



**Abb. 2: Nukleozytoplasmatischer Transport**

Modell des gerichteten aktiven Transports durch die Kernmembran (modifiziert nach Görlich und Kutay, 1999). Dargestellt ist der Import und Export von Transportsubstraten sowie die Rückführung der beteiligten Karyopherine in ihr jeweiliges Ausgangskompartiment. Ran wird durch den nukleären Transportfaktor 2 (NTF2) zurück in den Kern transportiert. Proteine mit einer klassischen NLS benötigen als Importrezeptor sowohl Importin  $\alpha$  als auch Importin  $\beta$ . Für nähere Erläuterungen siehe Text.

## 1.5 Energetik des gerichteten Transports

Da nukleozytoplasmatischer Transport auch entgegen eines Konzentrationsgradienten stattfindet, wird Energie für den Transport benötigt. Übereinstimmend mit dieser Annahme konnte durch *in vivo* sowie *in vitro* Importstudien gezeigt werden, daß sowohl Nukleotide benötigt werden, als auch die GTP Hydrolyse von Ran für den Import NLS-haltiger Proteine funktionell sein muß (Yaseen und Blobel, 1999a).

Der Prozeß der Translokation selbst benötigt jedoch entgegen früheren Vermutungen keine Energie (Adam, 1999; Englmeier *et al.*, 1999; Ribbeck und Görlich, 2001). Allerdings wird sowohl für den Export von Proteinen durch Exportrezeptoren als auch für das Recycling der Importfaktoren je ein RanGTP-Molekül aus dem Kern ins Zytoplasma transportiert und dort im einzig belegbaren energieverbrauchenden Schritt des Ran-Zyklus, der Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP, hydrolysiert. Ohne Hydrolyse von GTP findet nur eine Runde des Imports bzw. Exports statt, ohne Rückführung von Ran in den Kern kommt der Transport langfristig zum Erliegen. Damit es nicht zu einer solchen Depletion von nukleärem Ran kommt, muss der Rücktransport des Importrezeptors von Ran Ran-unabhängig erfolgen (nicht im Komplex mit RanGTP wie die Karyopherine). Diese Funktion übernimmt der nukleäre Transportfaktor 2 (NTF2, p10, siehe Kapitel 1.11.5)). So wurde gezeigt, daß NTF2 sowohl in permeabilisierten Zell-Systemen (Ribbeck *et al.*, 1998; Steggerda *et al.*, 2000), als auch *in vivo* (Quimby *et al.*, 2000) als Importrezeptor für Ran wirkt.

Oft ist es für den Transport von z. B. großen mRNPs durch die Kernpore erforderlich, daß diese erst unter ATP oder GTP Verbrauch von Helikasen wie z. B. Dbp5p entwunden werden (Görlich und Kutay, 1999; Schmitt *et al.*, 1999). Auch für den Export der großen ribosomalen Untereinheiten wird vermutlich zusätzliche Energie benötigt.

## 1.6 Export von tRNA

Das Hefeprotein Los1p und sein Ortholog in höheren Eukaryonten Exportin-t gehören zur Importin- $\beta$ -Proteinfamilie und vermitteln den Export von tRNA (Arts *et al.*, 1998a; Hellmuth *et al.*, 1998; Kutay *et al.*, 1998) aus dem Kern. Dabei bindet das Exportin im Komplex mit RanGTP direkt an tRNA. Der trimere Komplex wird durch Interaktion mit Nukleoporinen exportiert und im Zytoplasma durch Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP in seine Einzelkomponenten dissoziiert. Allerdings findet Export der RNA nur statt, wenn die tRNA die notwendigen Prozessierungen im Kern, wie Ausbildung der korrekten Tertiärstruktur (Tobian *et al.*, 1985), Modifizierung ihrer Enden und bestimmter Basen und Anhängen eines 3'-CCA-Endes durchlaufen hat. Exportin-t bindet zwar auch ungespleißte tRNA, deren Export wird jedoch, vermutlich aufgrund Interaktion mit anderen im Kern lokalisierten Proteinen, verhindert (Arts *et al.*, 1998b; Lipowski *et al.*, 1999).

Da Los1p nicht essentiell ist (Hurt *et al.*, 1987), muß noch ein anderer tRNA Exportweg existieren. Grosshans *et al.* (2000) konnten zeigen, daß die Disruption von *LOS1* nur zu einem geringen Exportdefekt intronloser tRNA führt. Interessanterweise führen Mutationen im Translationsfaktor EF1-A zur Akkumulation aller tRNAs im Kern, wohingegen Störung der Translation, z. B. durch Zugabe von Cycloheximid, zu keiner Akkumulation von tRNA führt. Dies läßt vermuten, daß EF1A an einem Los1p unabhängigen tRNA-Exportweg beteiligt ist. Wie gezeigt werden konnte, ist für dessen Funktionalität eine Aminoacylierung der zu exportierenden tRNA notwendig (Lund und Dahlberg, 1998; Sarkar *et al.*, 1999; Grosshans *et al.*, 2000a; Grosshans *et al.*, 2000b).

## 1.7 Export von mRNA

mRNA wird assoziiert mit hnRNP-Proteinen (Proteinen des heterogenen nukleären Ribonukleoprotein-Partikels) als sogenannter mRNA enthaltender Ribonuleoprotein-Komplex (mRNP) exportiert. Bereits während der Transkription binden eine Vielzahl von Proteinen an die Vorläufer-mRNA. Einige davon sind auch bei der Prozessierung der RNA beteiligt. So wird der Export ungepleißter mRNA verhindert, damit im Zytoplasma keine aberanten

Proteine synthetisiert werden (Legrain und Rosbash, 1989). Der Export von mRNA wird hingegen durch die 3'-Polyadenylierung sowie das Anhängen einer 5'-m<sup>7</sup>G-Kappe stimuliert (Izaurralde *et al.*, 1992). Manche hnRNP-Proteine sind nur für die korrekte Prozessierung der mRNA erforderlich und werden vor dem Export von der mRNA wieder abgelöst. Einige hnRNP-Proteine (wie z. B. hnRNP A1 bzw. Npl3p) pendeln jedoch zwischen Kern und Zytoplasma hin und her und man nimmt an, daß sie zusammen mit mRNA den mRNP-Exportkomplex bilden. Ob diese Proteine auch eine aktive Funktion beim Export ausüben, ist jedoch noch unklar.

Mittels Durchmusterung einer Kollektion temperatursensitiver Hefemutanten auf Defekte im mRNA-Export konnten einige für den mRNA-Export essentielle Proteine identifiziert werden. Die identifizierten Gene kodieren für Nukleoporine, hnRNP-Proteine (bzw. RNA modifizierende Proteine) sowie für Karyopherine und andere Faktoren des Ran-Zyklus.

Genetische Screens ausgehend von der Exportmutante *nup85ΔN/rat9* (ribonucleic acid trafficking) führten dann zur Identifizierung von Mex67p (Segref *et al.*, 1997) und dessen Bindungspartner Mtr2p (Kadowaki *et al.*, 1994; Santos-Rosa *et al.*, 1998). Der Komplex dieser beiden Proteine spielt eine zentrale Rolle im Export von mRNA in *S. cerevisiae*. Neben der Bindung an mRNA interagiert der Komplex auch direkt mit der Kernpore (Santos-Rosa *et al.*, 1998; Strässer *et al.*, 2000). In Vertebraten wird die Rolle von Mex67p von TAP übernommen, NXT1 (p15) entspricht funktionell Mtr2 (Katahira *et al.*, 1999).

Weder für Mex67p noch für Mtr2p konnte bisher eine Interaktion mit Ran nachgewiesen werden. Der Einfluß des Ran-Zyklus in diesem Prozess ist umstritten. Vermutlich spielt Ran indirekt eine Rolle, da ein funktionierendes RanGTPase-System, für den aktiven Import von Proteinen, die an der korrekten Reifung der mRNA sowie deren Export beteiligt sind, für den Export von mRNA absolut notwendig ist.

## 1.8 Export von rRNA

Der Export von rRNA ähnelt in gewisser Weise dem Export von mRNA. Dieser ist jedoch in direkter Weise von Ran abhängig. Ribosomale RNA der beiden ribosomalen Untereinheiten assembliert zuerst im Nukleolus mit ca. 80 verschiedenen ribosomalen und vielen nichtribosomalen Proteinen. Anschließend erfolgen viele RNA-Prozessierungsschritte, während derer sich die Zusammensetzung und Lokalisation des Vorläufer-RNP-Komplexes (Vorläufer-Ribonukleoproteinpartikel) ständig ändert. So wandert dieser Komplex durch bislang unbekannte Mechanismen vom Nukleolus durch den Zellkern zur Kernpore und reift auf seinem Weg. Der Export der unterschiedlich prozessierten 40S und 60S ribosomalen Untereinheiten erfolgt dann vermutlich getrennt (Warner, 1990). In Studien wurde als visueller Marker für die 60S-Untereinheit ein eGFP-Fusionsprotein des ribosomalen Proteins RPL25p herangezogen und auf diese Weise der ribosomale Export der großen Untereinheit verfolgt (Hurt *et al.*, 1999; Gadal *et al.*, 2001b). Der Export der kleinen Untereinheit wurde verfolgt, indem ein *in situ* Hybridisierungsverfahren gegen die 5' ITS (Interne transkriptierte Spacerregion) der 18S rRNA angewendet wurde (Moy und Silver, 1999). Die Analyse des Exports beider Untereinheiten zeigte, daß durch einen gestörten Ran-Zyklus ebenso wie durch Mutationen in bestimmten Nucleoporinen, der Export von rRNA beeinträchtigt wird (Hurt *et al.*, 1999; Moy und Silver, 1999), der Export von rRNA also durch Ran gesteuert werden kann.

Die Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen (Rix-Faktoren; Ribosomen Export), die bei der Biogenese, dem intranukleären Transport und/oder dem Export der großen Untereinheit beteiligt sind, brachte viele neue Erkenntnisse (Gadal *et al.*, 2001a; Gadal *et al.*, 2001b; Milkereit *et al.*, 2001). Einer der hierdurch identifizierten Rix-Faktoren ist Rix5p, welches mit Rpl10p identisch ist. Dieses Protein interagiert mit dem essentiellen Protein Nmd3p und dieses wiederum über NES-Sequenzen mit dem Exportfaktor Xpo1p (Ho *et al.*, 2000; Gadal *et al.*, 2001b). Man vermutet daher, daß der Export der ribosomalen 60S Untereinheit über einen klassischen Exportkomplex aus Xpo1p-RanGTP-Nmd3p vermittelt wird. Da der 60S-Partikel jedoch sehr groß ist, bleibt nicht auszuschließen, daß noch andere Faktoren,

wie z.B. Energie liefernde ATP- oder GTPasen, für die Translokation der großen Untereinheit erforderlich sind.

## 1.9 Ran-unabhängige Kerntransportprozesse

So wie der mRNA-Export *in vitro* unabhängig von Ran ist, kann auch Karyopherin-vermittelter Kerntransport, zumindest im *in vitro*-System, unabhängig von Ran sein (Takizawa *et al.*, 1999; Hetzer und Mattaj, 2000; Clouse *et al.*, 2001). In diesen Fällen müssen als Alternative zum RanGTP-vermittelten Mechanismus alternative Mechanismen ausgebildet sein, um die Bildung und Dissoziation von Import und Exportkomplexen zu gewährleisten. So ist z.B. zur Dissoziation eines Transportkomplexes eine direkte Modifikation des Substrates im jeweiligen Zielkompartiment denkbar.

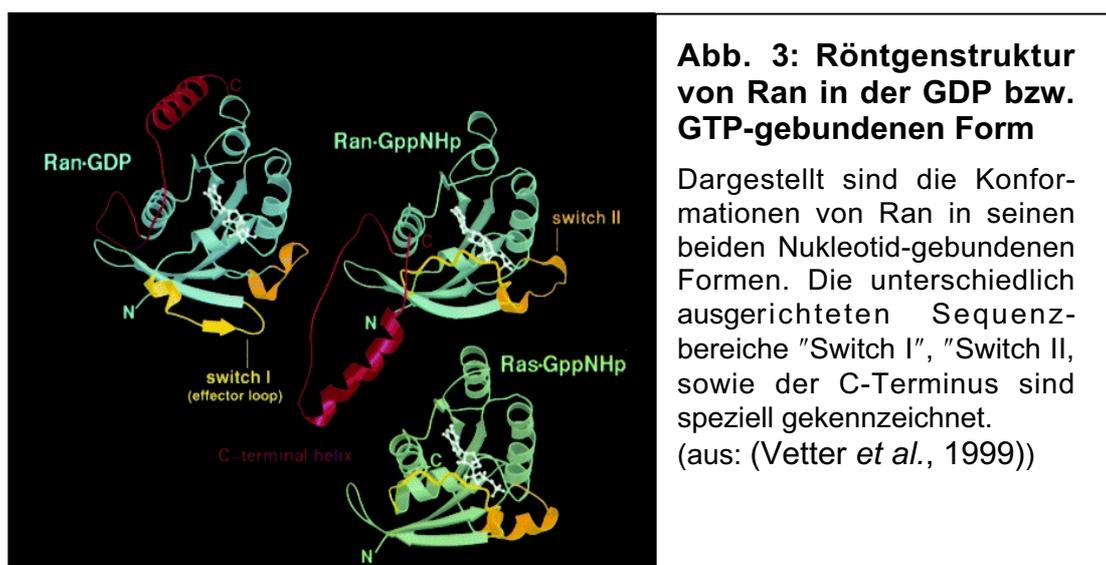
So konnte für den Import des Cyclins B1-Cdc2 in *in vitro* Studien gezeigt werden, daß der Import dieses Proteins zwar den Importrezeptor Importin  $\beta$  benötigt, nicht jedoch Ran. Im Gegensatz zum klassischen durch Importin  $\beta$  vermittelten Import NLS-haltiger Proteine, wird Ran nach erfolgter Translokation also nicht für die Ablösung von Cyclin B1-Cdc2 von Importin  $\beta$  im Kern benötigt. In Übereinstimmung hiermit inhibiert die hydrolysedefiziente RanQ69L-Mutante aufgrund Dissoziation der Importkomplexe im Zytoplasma nur den Import NLS-haltiger Proteine, nicht jedoch den Import von Cyclin B1-Cdc2 (Takizawa *et al.*, 1999).

## 1.10 Ran - seine bisher bekannten Bindungspartner und deren zelluläre Funktion

Während beim Menschen, der Hefe *S. pombe* und in vielen anderen Organismen das essentielle Ran von einem einzigen Gen codiert wird, existieren in anderen, wie z. B. der Hefe *S. cerevisiae* oder in Tomaten, zwei bzw. mehrere Ran-verwandte Gene, die jedoch eine sehr hohe Homologie untereinander aufweisen (GSP1 bzw. GSP2 in *S. cerevisiae* mit 98 % Sequenzidentität). In *S. cerevisiae* ist nur GSP1 essentiell. Funktionelle

Unterschiede von GSP1 und dem fast identischen GSP2 sind bislang unbekannt (Belhumeur *et al.*, 1993; Moore und Blobel, 1993).

Als molekularer Schalter (GTP- bzw. GDP-gebunden) kann diese kleine GTPase zentrale zelluläre Funktionen regulieren. Die Grundlage für diese regulatorische Funktion ist die unterschiedliche Konformation der GTP- bzw. GDP-gebundenen Form von Ran, die eine ähnliche Grundstruktur wie andere Mitglieder der Ras-Superfamilie aufweist (siehe auch Abb. 3).



Beim Vergleich der Konformationen der Nukleotid-gebundenen Formen fallen zwei hochflexible Regionen auf, die nahen Kontakt zum  $\gamma$ -Phosphat des GTP besitzen. Diese als "Switch I" bzw. "Switch II" bezeichneten Regionen ändern ihre Ausrichtung je nach Art des gebundenen Nukleotids (Vetter *et al.*, 1999). Die Ausrichtung der sogenannten "Switch I"-Region legt fest, ob es zur Interaktion von Effektoren mit Ran kommt. So verhindert z.B. die Ausrichtung der "Switch I"-Region in der GTP-gebundenen Form sterisch die Interaktion mit NTF2. Hingegen ist für die RanGAP-vermittelte Hydrolyse von RanGTP die korrekte Ausrichtung bestimmter Aminosäurereste essentiell (insbesondere eines katalytischen Glutamin-Restes: Q69 in Ran), die sich in der "Switch II"-Region befinden.

Ein Überblick über bisher bekannte Ran-bindende Proteine ist in der folgenden Tabelle dargestellt. Nähere Einzelheiten hierzu finden sich in den nachstehenden Kapiteln.

**Tabelle 2: Bekannte Ran-bindende Proteine, deren Bindungsspezifität, Lokalisation und zelluläre Funktion**

Protein / Proteinklasse	Bindungsspezifität	<u>Experimenteller Beweis<sup>2</sup></u>	<u>Lokalisation unter Wildtypbedingungen</u>	Funktion
Karyopherine	RanGTP	in vitro Bindung	Kern, Zytoplasma, Kernpore	Export von RanGTP und Substrat als trimerer Exportkomplex, Import von Substrat siehe Kapitel 1.3
RanBP1-Familie: • RanBP1; • RanBP2 (Nup358);  • RanBP3 (Yrb2p) • Nup50 (Nup2p)	• RanGTP • RanGTP, RanGDP • RanGTP • RanGTP	in vitro Bindung	• Zytoplasma • zytoplasmatische Seite der Kernpore • Kern • Kern	Aktivierung der GTP-Hydrolyse (RanBP1), Struktureller Bestandteil des Kernporenkomplexes bzw. Beteiligung beim Export von Proteinen
RanGAP (Rna1p)	RanGTP	in vitro Bindung	Zytoplasma + Kernpore	RanGAP
RCC1 (Prp20p)	RanGDP, RanGTP, nukleotidfreies Ran	in vitro Bindung	Kern + Kernpore	RanGEF
NTF2	RanGDP	in vitro Bindung	Kernpore	Import von RanGDP
NXT1/p15	RanGTP	in vitro Bindung	Kern + Kernpore	Export
Nup358/RanBP2; Nup153	RanGDP	in vitro Bindung	zytoplasmatische (Nup358) bzw. nukleäre (Nup153) Seite der Kernpore	Strukturelle Bestandteile des Kernporenkomplexes
Mog1 (Mog1p)	RanGDP, RanGTP, nukleotidfreies Ran	in vitro Bindung	Kern	Nukleotid-Austausch von Ran bzw. Ablösung von RanGDP von seinem Import-Rezeptor NTF2
Dis3 (Dis3p)	RanGDP, RanGTP, nukleotidfreies Ran	in vitro Bindung	Kern	Prozessierung und Abbau von RNA im Kern
RanBPM	RanGTP	Zwei-Hybrid Interaktion	Zentrosome	Mitose

nach: (Künzler und Hurt, 2001) und (Macara, 2001) sowie (Oki und Nishimoto, 2000; Steggerda und Paschal, 2000)

### 1.10.1 RanBP1, RanBP2/Nup358, RanBP3/Yrb2p, Nup50/Nup2p

Zur RanBP1-Familie gehören die Proteine RanBP1, RanBP2/Nup358 (siehe 1.10.6), RanBP3 (bzw. Yrb2p) sowie Nup50 (bzw. Nup2p), die alle eine mit der "Switch I"- Region von Ran interagierende, konservierte Ran-Bindungs-Domäne aufweisen.

Sowohl das menschliche RanBP1, als auch das *S. cerevisiae* Homologe Yrb1p pendeln zwischen Kern und Zytoplasma, lokalisieren unter Wildtyp-Bedingungen aber ausschließlich im Zytoplasma (Künzler *et al.*, 2000; Plafker und Macara, 2000). In beiden Fällen ist der Export von Crm1 abhängig. Während RanBP1 jedoch eine Leucin-reiche NES im C-Terminus besitzt,

deren Export durch Leptomycin-B blockiert werden kann, benötigt Yrb1p praktisch die gesamte Ran-Bindedomäne um exportiert zu werden und sein Export kann auch nicht durch Leptomycin-B inhibiert werden. Der Grund für diese Unterschiedlichkeit ist ebenso unklar, wie die genaue Funktion von RanBP1 bzw. Yrb1p im Kern (vgl. mögliche Funktion im Komplex mit Mog1, Kapitel 1.10.7). Die Hauptfunktion dieser Proteine scheint jedoch bei der Dissoziation von Exportkomplexen und Rückführung von Importrezeptoren ins Zytoplasma zu liegen. So konnte eine koaktivierende Funktion von RanBP1 bei der Hydrolyse und eine inhibitorische Funktion beim Nukleotidaustausch von Ran nachgewiesen werden (Bischoff *et al.*, 1995). Die inhibitorische Wirkung von Komplexen zwischen Karyopherinen und RanGTP auf die RanGAP-vermittelte Hydrolyse wird durch RanBP1/Yrb1p aufgehoben (Bischoff und Görlich, 1997; Floer *et al.*, 1997; Lounsbury und Macara, 1997). Dadurch ist überhaupt erst gewährleistet, daß Exportkomplexe ihre Substrate im Zytoplasma freisetzen können. Da die Transportrezeptoren selbst den Kern im Komplex mit RanGTP verlassen, ist somit auch das Recyceln der Karyopherine garantiert.

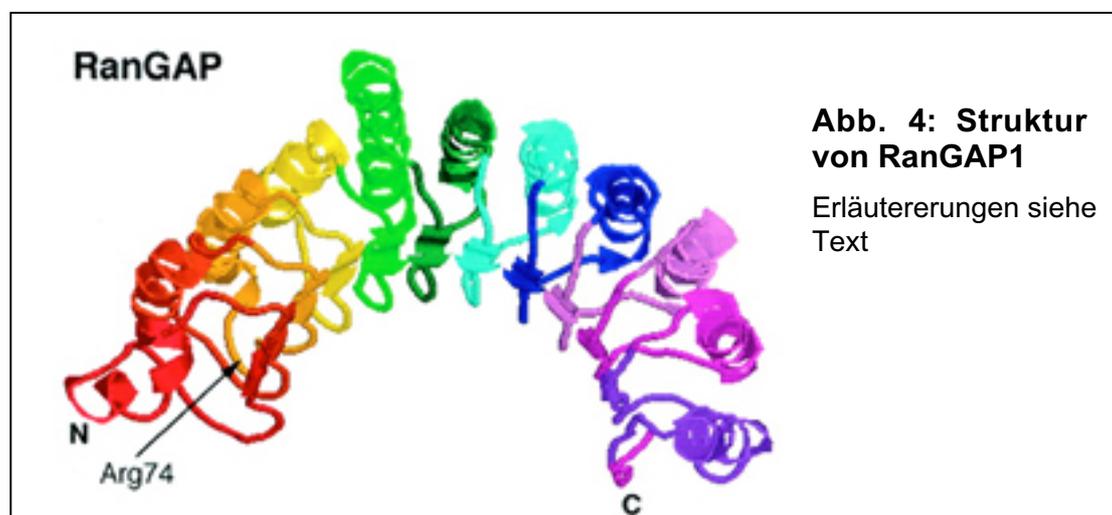
Nachdem entdeckt wurde, daß die Expression von RanBP1 in Säugerzellen während des Zellzyklus unterschiedlich ist, nämlich zunehmende Expression von der S-Phase zur M-Phase und plötzlicher Verminderung der Expression am Ende der Telophase (Guarguaglini *et al.*, 2000), wurde spekuliert, ob dies möglicherweise im Zusammenhang mit der Rolle von Ran während der Mitose (siehe 1.11.2 und 1.11.3) steht. Bisher ist keine vergleichbare Zellzyklus-Regulation der Expression des Hefehomologen Yrb1p bekannt. Der Grund hierfür ist möglicherweise, daß Hefe im Gegensatz zu Säugerzellen eine geschlossene Mitose durchläuft, in der die Kernmembran intakt bleibt (Bäumer *et al.*, 2000).

Die Affinität der zur RanBP1-Familie gehörenden Proteine Yrb2p und Nup2p zu RanGTP ist sehr gering ( $> 5 \mu\text{M}$ ) (Mueller *et al.*, 1998; Görlich und Kutay, 1999). Wie einige Nukleoporine (siehe 1.2) besitzen beide Proteine FXFG-Repeats, die an Transportrezeptoren binden. So konnte auch eine Beteiligung dieser Proteine beim Cse1p- und Crm1p-abhängigen Export nachgewiesen werden. Ihre genaue Einflußnahme ist jedoch noch unbekannt (Booth *et al.*, 1999; Hood *et al.*, 2000; Solsbacher *et al.*, 2000). Lindsay *et al.* konnten aller-

dings nachweisen, daß RanBP3 beim Crm1-abhängigen Transport die Affinität des Substrates für den Rezeptor erhöht und dadurch den Export erleichtert (Lindsay *et al.*, 2001).

### 1.10.2 RanGAP1 (Rna1p)

RanGAP bindet an RanGTP ( $K_D \approx 430$  nM, (Klebe *et al.*, 1995)) und vermittelt die Hydrolyse zu RanGDP, welches RanGAP1 in höheren Eukaryonten und Rna1p bzw. rna1 in Hefe genannt wird. Dieses Enzym besitzt eine halbmond-förmige Struktur, die aus 11 Leucin-reichen sich wiederholenden Sequenzbereichen besteht (LRR-Motif) (siehe Abb. 4).



Jede sich wiederholende Sequenz bildet eine  $\alpha$ -Helix und ein  $\beta$ -Faltblatt, wobei die  $\alpha$ -Helices auf der konvexen Seite des Halbmondes angeordnet sind (Hillig *et al.*, 1999; Seewald *et al.*, 2002). Diesen Sequenzwiederholungen schließt sich eine aus ca. 40 vorwiegend sauren Aminosäuren bestehende Region an. Die darauf folgende C-terminale Domäne besteht in *S. cerevisiae* bzw. *S. pombe* nur aus 12 bzw. 15 Aminosäuren, während die homologen Proteine von Mäusen und Menschen eine 191 bzw. 189 Aminosäuren lange C-terminale Domäne besitzen.

Viele GAPs wie z. B. RasGAP und RhoGAP erlangen ihre katalytische Aktivität durch einen gemeinsamen Mechanismus, den sogenannten "Arginin-Finger"-Mechanismus, bei dem der katalytische Übergangszustand durch einen Arginin-Rest in der Nukleotid-Bindungstasche der GTPase stabilisiert

wird (Scheffzek *et al.*, 1998). Daher ging man bisher davon aus, daß RanGAP über den gleichen Mechanismus aktiviert wird (Macara, 2001). Auch konservierte Arginin-Reste in RanGAP-Homologen sprachen für diese Theorie. Durch Aufklärung der dreidimensionalen Röntgenstruktur des Ran-RanBP1-RanGAP-Komplexes im Grund- und Übergangszustand konnte dies jedoch widerlegt werden (Seewald *et al.*, 2002). Statt dessen spielt die korrekte Position des katalytisch aktiven Glutamin-Restes eine wichtige Rolle.

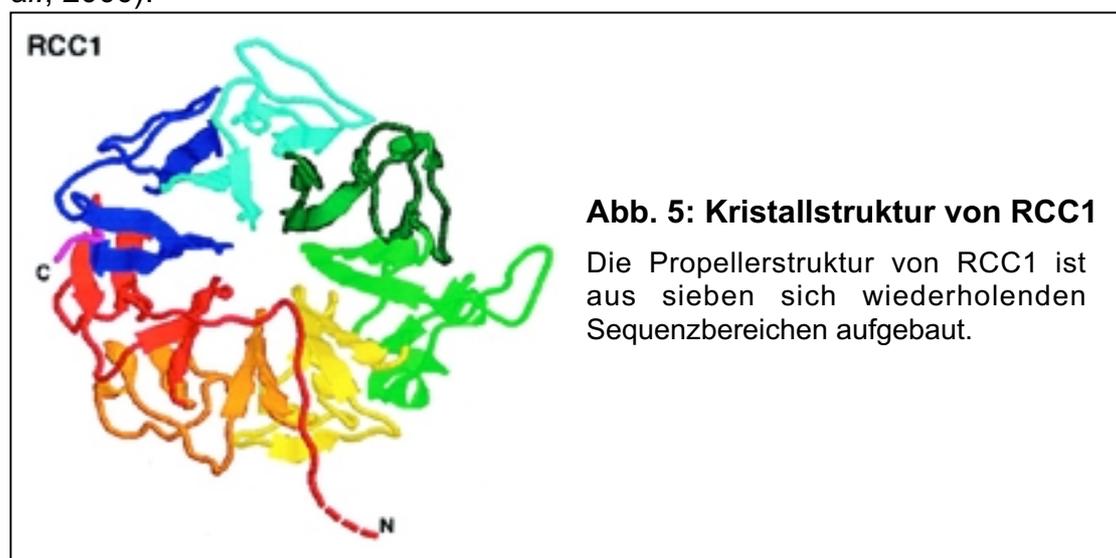
RanGAP lokalisiert ausschließlich im Zytosol. Die deutlich längere C-terminale Domäne von RanGAP1 in höheren Eukaryonten wird, im Gegensatz zu den Homologen in Hefe, durch das kleine 8kDa-große Ubiquitin-verwandte Polypeptid SUMO-1 posttranslational modifiziert (Matunis *et al.*, 1996; Mahajan *et al.*, 1997).

Nach neuesten Erkenntnissen stellt Nup358/RanBP2, welches ein struktureller Bestandteil der zytoplasmatischen Filamente von Kernporenkomplexen in Säugern ist, die SUMO1-Ligase für RanGAP dar (Pischler *et al.*, 2002). In Übereinstimmung hiermit konnte in Säugerzellen auch Kernporen-assoziiertes RanGAP1 nachgewiesen werden (Matunis *et al.*, 1996; Mahajan *et al.*, 1997). Außerdem ließ sich in höheren Eukaryonten sumoyliertes RanGAP1 an der Spindel nachweisen (Joseph *et al.*, 2002).

Obwohl Rna1p nicht modifiziert werden kann, wird auch in Hefe von Kernporen-assoziiertem RanGAP berichtet (Allen *et al.*, 2001). Interessanterweise vermutet man aufgrund einer nachgewiesenen funktionellen NES in Rna1p, daß sowohl RanGAP1, als auch Rna1p zwischen dem Kern und dem Zytoplasma hin und her wandern (Matunis *et al.*, 1998; Feng *et al.*, 1999). Die nachgewiesene Interaktion mit Nup42p (Allen *et al.*, 2001) könnte somit auch durch einen Kernporen-assoziierten Crm1p-Export-Komplex erklärt werden. Unklar bleibt, weshalb RanGAP möglicherweise zwischen Kern und Zytoplasma pendelt. Aus unterschiedlichen Gründen bestehen begründete Zweifel an diesem Pendelmechanismus: Zum Einen wäre durch nukleäres RanGAP die Aufrechterhaltung des Ran-Gradient interphasischer Zellen gefährdet, zum Anderen liegt die nachgewiesene NES in der wenig zugänglichen konkaven Seite der Halbmond-Struktur von RanGAP, wodurch eine Funktionalität der NES im Gesamtprotein in Frage gestellt werden muß (Macara, 2001).

### 1.10.3 RCC1 (Prp20p)

RCC1 (für "regulator of chromosome condensation 1") vermittelt den Nukleotid-Austausch von RanGDP zu RanGTP (Affinität zu RanGTP und RanGDP ca. 900 nM) (Klebe *et al.*, 1995). Das homologe Protein in Hefe wird Prp20 genannt. Dieses Protein lokalisiert ausschließlich im Kern und scheint an Chromatin assoziiert zu sein (Seki *et al.*, 1996). Mittlerweile konnte gezeigt werden, daß RCC1 an die Histone H2A und H2B bindet und auf diese Weise an DNA gekoppelt ist (Nemergut *et al.*, 2001). Da sich an dieser Lokalisation während des Durchlaufens der Mitose nichts ändert, kommt der daraus resultierenden lokalen Konzentration von RanGTP um die Chromosomen im Zellzyklus eine wichtige Funktion als Marker zu (siehe 3.12). Allerdings konnte RCC1 durch Immunoelektronen-Mikroskopie und Studien zur Bestimmung der Nukleotid-Austausch-Aktivität in geringeren Mengen auch auf beiden Seiten des Kernporenkomplexes nachgewiesen werden (Fontoura *et al.*, 2000).



**Abb. 5: Kristallstruktur von RCC1**

Die Propellerstruktur von RCC1 ist aus sieben sich wiederholenden Sequenzbereichen aufgebaut.

Die Röntgenstruktur von RCC1 weist charakteristische, sich wiederholende Sequenzbereiche auf, die sich in einer siebenfachen  $\beta$ -Propeller-Struktur widerspiegeln. Die Struktur ähnelt der Struktur von  $\beta$ -Untereinheiten heterotimerer G Proteine (Renault *et al.*, 2001). Die "Switch II"-Region von Ran, eine der beiden flexiblen Abschnitte der konservierten Nukleotid-Bindungsdomäne von Ran, nimmt je nach Art des gebundenen Nukleotids (GTP bzw. GDP) stark unterschiedliche Konformationen ein (Bourne *et al.*, 1991). Die

Kristallstruktur des RCC1-Ran Komplexes zeigt, daß Ran mit dieser "Switch II"-Region an eines der Propellerblätter von RCC1 bindet (Renault *et al.*, 2001).

#### 1.10.4 NTF2

NTF2 (Nuclear Transport Factor 2) ist ein 15 kDa Protein, welches von Hefe bis zu höheren Eukaryonten konserviert ist (Paschal und Gerace, 1995; Corbett und Silver, 1996). Es wurde zuerst als ein Protein beschrieben, welches den Import NLS-enhaltener Protein stimuliert (Moore und Blobel, 1994; Paschal und Gerace, 1995).

NTF2 bindet spezifisch die GDP gebundene Form von Ran ( $K_D = 25$  nM, (Smith *et al.*, 1998)), die die vorherrschende Form von Ran im Zytoplasma darstellt (Nehrbass und Blobel, 1996; Paschal *et al.*, 1996; Clarkson *et al.*, 1997). Dabei interagiert NTF2 vorwiegend mit der "Switch-II"-Region von RanGDP (Stewart *et al.*, 1998). Zusätzlich wird die Bindung von NTF2 an RanGTP durch die "Switch-I"-Region von Ran sterisch verhindert (siehe 1.10).

NTF2 bindet auch direkt an FxFG-enhaltene Kernporen-Proteine (Paschal und Gerace, 1995; Clarkson *et al.*, 1997) wie z. B. Nsp1 in Hefe bzw. p62 in Säugerzellen und vermittelt die Translokation von Ran durch die Kernpore (Ribbeck *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1998). Ging man anfänglich davon aus, daß durch die Bindung von NTF2 an RanGDP die Bindung von NTF2 an Nukleoporine erleichtert wird (Ribbeck *et al.*, 1998), so konnte mittlerweile gezeigt werden, daß durch die Bindung von Ran die Affinität von NTF2 an die Kernporen-Proteine (Bindungskonstante etwa 1  $\mu$ M) nicht verändert wird, ebenso nicht umgekehrt die Affinität von NTF2 an RanGDP durch die Bindung an Nukleoporine. Dies macht Sinn, da dadurch ein Ran-unabhängiger Export von NTF2 ermöglicht wird. Trotzdem reichert sich NTF2, wie man vermutet aufgrund Kernporen-assoziiertem Ran, an der Kernmembran an (Chaillan-Huntington *et al.*, 2000), so daß NTF2 unter Wildtypbedingungen an den Kernporen lokalisiert (Steggerda *et al.*, 2000).

NTF2 bildet Homodimere, wobei jede Kette unabhängige Bindungsstellen für RanGDP und Kernporen-Proteine (Nukleoporine) mit FxFG-Sequenz-Wiederholungen besitzt. Da die Dissoziationskonstante des NTF2-Dimers im mikromolaren Bereich liegt (ähnlich der zellulären NTF2-Konzentration), ist ein beträchtlicher Teil des zellulären NTF2 als Monomer vorhanden (Chaillan-Huntington *et al.*, 2001). Durch die Dimerisierung von NTF2 ist eine höhere thermische Stabilität des Proteins vorhanden. Die Dimerisierung ist auch für die eigentliche Funktion von NTF2 beim Import von RanGDP in den Kern wichtig, da gezeigt werden konnte, daß monomeres NTF2 sowohl RanGDP, als auch Kernporen-Proteine wesentlich schlechter bindet. Andererseits würde eine mögliche Dissoziation des NTF2-Dimers die Ablösung von RanGDP und den Austausch des Nukleotids nach Translokation in den Kern erleichtern (Chaillan-Huntington *et al.*, 2001).

Ran kann aufgrund seiner geringen Größe (24 kDa) passiv durch die Kernporen hindurch diffundieren. Dies geschieht zwar sehr langsam, jedoch konnte gezeigt werden, daß eine Überexpression von Ran das normalerweise essentielle NTF2 ersetzen kann, so daß die passive Diffusion durchaus als relevant zu betrachten ist (Paschal *et al.*, 1997). Umgekehrt wurde jedoch auch gezeigt, daß eine Überexpression von NTF2 den Wachstumsdefekt verschiedener *gsp1*-Mutanten supprimieren kann.

Dies zeigt, daß durch das von NTF2 unterstützte Recyclen von Ran die Effizienz des Ran-Zyklus gewährleistet ist (Oki und Nishimoto, 1998).

Der Import-Defekt einer *mog1* $\Delta$ -Mutante kann ebenfalls durch Überexpression von NTF2 supprimiert werden, was darauf hindeutet, daß NTF2 und Mog1p ähnliche Funktionen ausüben.

### 1.10.5 NXT1/p15

Nxt1, auch p15 genannt, wurde erstmals als Kofaktor des mRNA-Exports beschrieben. So konnte gezeigt werden, daß NXT1 mit TAP (Mex67 in Hefe, 23% Sequenzidentität), einem essentiellen mRNA Exportfaktor aus Säugerzellen coimmunpräzipitiert werden kann (Katahira *et al.*, 1999). Während in Hefe Mex67p mit Mtr2p interagiert und durch diese Interaktion das Andocken des mRNA-Exportkomplexes an die Kernpore zustande kommt (Santos-Rosa *et al.*, 1998; Strässer *et al.*, 2000), bindet TAP an NXT1 und bildet einen dem Mex67p-Mtr2p-Komplex vermutlich strukturell ähnlichen Komplex. NXT1 ist zwar funktionell mit Mtr2 verwandt (Koexpression von NXT1 und TAP komplementiert einen *mex67 mtr2* Disruptionsstamm (Katahira *et al.*, 1999)), weist jedoch keinerlei Sequenzhomologie auf. Hingegen deutet eine 26%-ige Sequenzidentität von NXT1 mit NTF2 auf eine Verwandtschaft dieser beiden Proteine hin.

So bildet interessanterweise NXT1 ein Heterodimer mit einer NTF2-ähnlichen Domäne von TAP (Strässer *et al.*, 2000; Suyama *et al.*, 2000), die ähnlich der wichtigen Rolle der Homodimerisierung von NTF2 für den Import von RanGDP in den Kern, für die Bindung an Nukleoporine während des Exports von mRNA erforderlich ist (Chaillan-Huntington *et al.*, 2001). Auch ungespleißte RNA mit Introns kann durch TAP vermittelt und stimuliert durch NXT1 auf einem CRM1-unabhängigen Weg exportiert werden, was im Falle einer Infektion mit Retroviren eine wichtige Rolle spielt (Guzik *et al.*, 2001). Die Aktivierung des Exports durch NXT1 beschränkt sich jedoch nicht nur auf mRNA. Auch andere Exportwege werden durch dieses Protein beeinflusst, so daß NXT1 möglicherweise ein allgemeiner Export-Faktor darstellt (Black *et al.*, 1999; Ossareh-Nazari *et al.*, 2000). So erleichtert NXT1 beim Crm1-abhängigen Protein-Export das Ablösen des Export-Komplexes im Zytoplasma von der Kernpore (Black *et al.*, 2001), was dafür spricht, daß NXT1 zu einem späten Zeitpunkt beim Translokations-Prozess beteiligt ist. Die genaue Funktion von NXT1 ist jedoch unklar.

In Säugerzellen lokalisiert NXT1 unter Wildtypbedingungen im Kern und am Kernporen-Komplex, wandert jedoch auch zwischen dem Kern und dem Zytoplasma hin und her (Black *et al.*, 1999).

Im Gegensatz zu NTF2 scheint NXT1 (N<sup>T</sup>F2-related nuclear export protein) nicht RanGDP, sondern ausschließlich die GTP gebundene Form von Ran zu binden (Black *et al.*, 1999). Zur Ausübung seiner Funktion beim RNA Export scheint die Bindung an GTP-gebundenes Ran wichtig zu sein (Ossareh-Nazari *et al.*, 2000). Auch eine direkte Interaktion von NXT1 mit Crm1 wurde publiziert (Black *et al.*, 2001).

Ob NXT1 jedoch wirklich an RanGTP bindet, ist kontrovers, da dies bis jetzt nur in einem Labor gezeigt werden konnte (Katahira *et al.*, 1999; Herold *et al.*, 2000). Die Bestimmung der Röntgen-Kristallstruktur des TAP-NXT1-Dimers offenbarte, daß strukturelle Unterschiede im Vergleich zum NTF2-Homodimer das TAP-NXT1-Heterodimer von einer Ran-Bindung – sowohl in der GDP- als auch GTP-gebundenen Form – abhält (Fribourg *et al.*, 2001).

### 1.10.6 Nup358/RanBP2, Nup153

Nup358/RanBP2 und Nup153 sind Komponenten des Kernporenkomplexes und binden an RanGDP. Daher sind sie möglicherweise verantwortlich für die beim Import erfolgte Bindung von RanGDP an die Kernpore (Görlich *et al.*, 1996). Singh *et al.* konnte zeigen, daß ein sogenanntes Zink-Finger Motif, das beide Nukleoporine aufweisen, sowohl für die Interaktion mit RanGDP, dem Exportrezeptor Crm1 (Singh *et al.*, 1999), aber auch mit DNA (Sukegawa und Blobel, 1993) verantwortlich ist. Das riesige Nup358 enthält in seiner Sequenz auch vier zur Ran-Binde-Domäne von RanBP1 homologe Sequenzabschnitte, die *in vitro* sowohl an RanGTP als auch an RanGDP binden (Yaseen und Blobel, 1999b).

Aufgrund dieser Einflußnahme der Nukleoporine sowohl im Import als auch im Export wurde postuliert, daß diese Proteine den RanGTPase-Zyklus feinregulieren (Kehlenbach *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 1999) und ihre RanGTP-bindenden Domänen eine ähnliche Rolle wie das zytoplasmatische RanBP1 übernehmen. Yaseen und Blobel konnten tatsächlich zeigen, daß die Ran-

Binde-Domänen von RanBP2 sowohl den Initiations-Schritt, als auch den beendenden Schritt der Translokation steuern (Yaseen und Blobel, 1999). Diese beiden Nukleoporine sind auf unterschiedlichen Seiten der Kernpore lokalisiert. Nup358/RanBP2 befindet sich an den zytoplasmatischen Filamenten der Kernpore und dient als Anker für sumoyliertes RanGAP1 (siehe 1.10.2). Nup153 lokalisiert hingegen am Kernkorb des Kernporenkomplexes. Möglicherweise haben die Ran-Binde-Domänen während der Mitose noch zusätzliche Funktionen. Nachdem gezeigt werden konnte, daß diese beiden Nukleoporine zu den ersten Nukleoporinen gehören, die in die neugebildete Kernmembran eingebettet werden, wurde eine Rolle dieser Ran-bindenden Proteine bei der Neuformung der Kernmembran postuliert (Bodoor *et al.*, 1999; Haraguchi *et al.*, 2000). Möglicherweise spielt dabei auch die Tatsache eine Rolle, daß die Ran-Binde-Domäne von RanBP2, die mit der "Switch I"-Region von Ran direkt interagiert, die gleiche Topology wie Pleckstrin-homologe (PH) Domänen aufweist (Vetter *et al.*, 1999), welche an Lipide des Phosphoinositol-Weges binden.

### 1.10.7 Mog1

Mog1 wurde als Multi-Copy-Suppressor von konditionalen Allelen (temperatur-sensitiven Mutationen) von GSP1 identifiziert (Oki und Nishimoto, 1998). Dieses Protein ist evolutionär konserviert (Marfatia *et al.*, 2001; Tatebayashi *et al.*, 2001). Es bindet, wenn auch unterschiedlich stark, an beide Nukleotid-gebundenen Formen von Ran.

Dem 24 kDa Hefe-Mog1 entspricht ein humanes 28 kDa Mog1-Protein. Unter Normalbedingungen lokalisiert Mog1 vorwiegend im Kern (Oki und Nishimoto, 1998; Marfatia *et al.*, 2001). Während Mog1 in *S. cerevisiae* nicht essentiell ist, ist ein *S. pombe* mog1-Disruptionsstamm nicht lebensfähig. Eine Überexpression des Ran-Homologen kann jedoch den lethalen Phänotyp supprimieren (Tatebayashi *et al.*, 2001), was dafür spricht, daß Mog1 am Ran-Zyklus beteiligt ist. Zudem führt sowohl eine temperatur-sensitive Mutation MOG1-Homologen in *S.pombe* (Tatebayashi *et al.*, 2001) als auch eine Disruption des Gens in *S. cerevisiae* (Oki und Nishimoto, 1998) zu

einem Defekt im Kern-Import, welcher durch Überexpression von NTF2 wieder aufgehoben werden kann. In *S. pombe* führt die Mutation – im Gegensatz zur Deletion in *S. cerevisiae* - zusätzlich zu einer Akkumulation von poly(A)<sup>+</sup>-RNA (Tatebayashi *et al.*, 2001).

Die genetische Interaktion mit NTF2 läßt auf eine Rolle von Mog1 bei der Lokalisation von Ran schließen. Und tatsächlich mislokalisiert Ran im Mog1-Disruptionsstamm ins Zytoplasma (Stochaj *et al.*, 2000). Daher wurde eine Rolle bei der Ablösung von RanGDP von NTF2 nach erfolgtem Import und anschließendem GDP-GTP Austausch durch RCC1 postuliert. Merkwürdigerweise inhibiert jedoch Mog1 den Austausch von GDP zu GTP auf Ran. Statt dessen wirkt Mog1 als Nukleotid-Austausch-Faktor für die umgekehrte Reaktion, den Austausch von GTP zu GDP, wobei die Nukleotid-ungebundene Form durch Mog1p stabilisiert wird. Diese Reaktion ist physiologisch jedoch nicht relevant (Oki und Nishimoto, 2000; Steggerda und Paschal, 2000).

Von der inhibitorischen Wirkung auf RCC1 abgesehen, ist die genaue Funktion von Mog1p im Ran-Zyklus daher noch unklar. Die Funktion scheint jedoch evolutionär konserviert zu sein, da der Knockout in *S. pombe* sowohl durch die entsprechenden Homologen der Bäckerhefe bzw. des Frosch-Homologen komplementiert werden kann (Nicolas *et al.*, 2001).

Interessanterweise wurde festgestellt, daß RanBP1 die inhibitorische Wirkung von Mog1 auf den Nukleotid-Austausch verringern kann und damit als Koaktivator für den RCC1-vermittelten Austausch von GDP zu GTP fungiert, ähnlich seiner bekannten Funktion als Koaktivator der RanGAP-vermittelten GTP-Hydrolyse im Zytoplasma (Nicolas *et al.*, 2001). Dabei bildet RanBP1 (Yrb1) mit Mog1 und RanGTP einen trimeren Komplex, in der die GTP-gebundene Form von Ran stabilisiert wird. In Übereinstimmung mit diesem Modell der Koaktivierung des Nukleotid-Austauschs durch RanBP1 sind Mutationen in YRB1 bzw. PRP20 im langsam wachsenden, aber lebensfähigen Mog1-Deletionsstamm bei entsprechender restriktiver Temperatur nicht mehr lebensfähig (M. Künzler, persönliche Mitteilung).

Da RanBP1 genauso wie Mog1 zwischen dem Kern und dem Zytoplasma hin und her wandert (Künzler *et al.*, 2000), ist Mog1p möglicherweise mitsamt RanBP1 noch in einen anderen zytoplasmatischen unbekanntem Prozess

involviert. Dies würde auch erklären, weshalb RanBP1 (Yrb1) zwischen dem Kern und dem Zytoplasma hin und her wandert.

### 1.10.8 Dis3

Dis3p wurde in einer Durchmusterung des Genoms mittels Zwei-Hybrid-Technik identifiziert, bei der neue Bindungspartner von menschlichem Ran gesucht wurden (Noguchi *et al.*, 1996). Dieses essentielle Protein ist evolutionär von Hefe bis hin zum Menschen konserviert und bindet sowohl RanGDP, RanGTP, als auch die nukleotidfreie Form von Ran. Es ähnelt damit dem ebenfalls nukleären Mog1p. Im Gegensatz zu Mog1p stimuliert es jedoch die GDP→GTP Austausch-Aktivität von RCC1 und bildet einen nachweisbaren Komplex mit Ran und RCC1 (Noguchi *et al.*, 1996).

Einen möglichen Hinweis auf die zugrunde liegende Funktion von Dis3 erbrachte die Entdeckung, daß Dis3p mit Rrp44p, einer Komponente des nukleolären Exosom-Komplexes, identisch ist (Mitchell *et al.*, 1997). Dis3p selbst besitzt 3'-5'-Exoribonukleaseaktivität. Mutationen in *DIS3* von *S. cerevisiae* führen daher zu einer Akkumulation von RNAs als Folge von Prozessierungsdefekten (Gadal *et al.*, 2001b; Grosshans *et al.*, 2001). Kürzlich wurde postuliert, daß Ran die Bildung und Dissoziation des Exosom-Komplexes über Dis3p reguliert (Suzuki *et al.*, 2001).

### 1.10.9 RanBPM

RanBPM wurde von Nakamura *et al.* in einer Zwei-Hybrid-Analyse unter Verwendung von Ran als Beute identifiziert. Obwohl sie im Zwei-Hybrid-System eine spezifische Interaktion mit der GTP-gebundenen Form von Ran nachweisen konnten, fehlt bis heute ein *in vitro*-Beweis dieser Bindung.

Dieses 55 kDa-Protein lokalisiert an Zentrosome und führt bei Überexpression zu einer ektopischen Bildung von Mikrotubuli. Man kann daher spekulieren, daß RanBPM ein Effektor von Ran bei der Bildung von Mikrotubuli-Astern ist (siehe auch 1.11.2). Der C-terminale Teil des *S. cerevisiae* ORFs YGL227w ist mit der Sequenz von RanBPM zu 30 % identisch, jedoch konnte noch kein

experimenteller Beweis der Homologie nachgewiesen werden (Nakamura *et al.*, 1998).

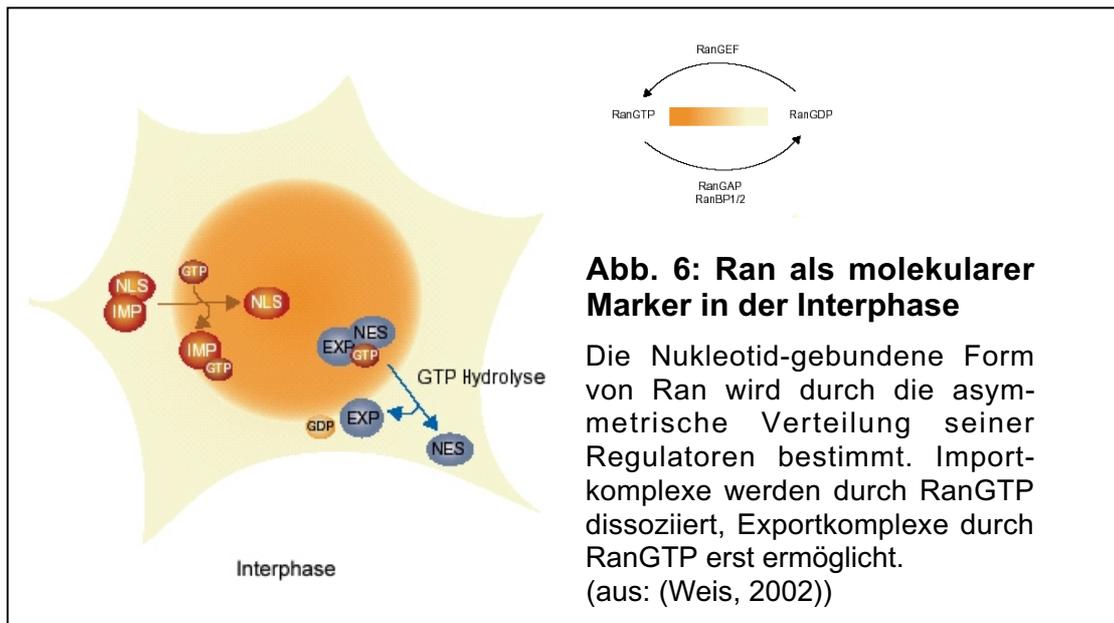
## **1.11 Regulation unterschiedlicher zellulärer Prozesse durch Ran**

Ran spielt bei einer ganzen Reihe zellulärer Prozesse eine wichtige Rolle. Ran-Mutanten zeigen nicht nur Defekte im nukleozytoplasmatischen Transport, sondern auch in der Organisation von Chromatin und Zellkern, Struktur des Nukleolus, bei der DNA-Replikation und Chromosomen-Segregation, beim RNA-Metabolismus, dem Ablauf des Zellzyklus, der Bildung von Mikrotubuli sowie in Hefe bei der Konjugation. Dies deutet darauf hin, daß Ran möglicherweise auch direkt an der Steuerung dieser Prozesse beteiligt ist und nicht nur ausschließlich aufgrund seiner Funktion im nukleozytoplasmatischen Transport. Diese Prozesse voneinander zu trennen ist schwierig, jedoch wurde in den letzten Jahren hierzu viel geforscht. Im Folgenden werden die daraus gewonnenen Ergebnisse kurz vorgestellt.

### **1.11.1 Allgemeine Betrachtungen**

Während der Interphase ist das RanGTPase-aktivierende Enzym RanGAP ausschließlich im Zytoplasma und an zytoplasmatischen Filamenten des Kernporenkomplexes lokalisiert, während der Nukleotid Austausch-Faktor RanGEF sich im Kern befindet. Dadurch überwiegt im Kern RanGTP, während im Zytoplasma vorwiegend RanGDP vorkommt.

Ein Durchlaufen eines GTPase Zyklus erfordert daher das Hin- und Herwandern von Ran zwischen dem Kern und dem Zytoplasma (Abb.6).



In höheren Eukaryonten zerfällt jedoch in der Prometaphase die Kernmembran, wodurch sich auch der Ort der Hydrolyse bzw. des Nukleotid-Austauschs prinzipiell ändern kann.

Nach bisherigen Erkenntnissen bleibt RCC1 während der gesamten Mitose Chromosomen-assoziiert (Ohtsubo *et al.*, 1989; Bischoff und Postingl, 1991; Bilbao-Cortés *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2002), so daß der Nukleotid-Austausch von RanGDP in mitotischen Zellen zumindest überwiegend an kondensierten Chromosomen stattfindet. Die Interaktion mit Ran begünstigt vermutlich sogar die Assoziation von RCC1 an Chromatin (Moore *et al.*, 2002).

Bezüglich der Lokalisation von RanGAP gibt es noch gewisse Unsicherheiten. Ein großer Anteil scheint an der noch verbliebenen Kernmembran gebunden zu sein. Möglicherweise spielt dann jedoch auch noch die Tatsache eine Rolle, daß sumoyliertes RanGAP1 (dessen funktionelle Bedeutung bislang weitgehend unverstanden ist und das bereits in der Interphase an das Kernporenprotein RanBP2 bindet), in mitotischen Zellen mit RanBP2 an den Spindeln und zwar vorwiegend in der Nähe der Kinetochoren lokalisiert (Joseph *et al.*, 2002). Allerdings konnte diese Lokalisation in *Drosophila* Embryonen nicht bestätigt werden (Trieselmann und Wilde, 2002).

Aufgrund der mitotischen Lokalisation von RCC1 und RanGAP geht man davon aus, daß RanGTP an bzw. in der Nähe von Chromatin auch *in vivo* während der Mitose gebildet wird. Nachdem bereits früher nachgewiesen wurde, daß RCC1 auch in mitotischen Zellextrakten aktiv ist und somit in der

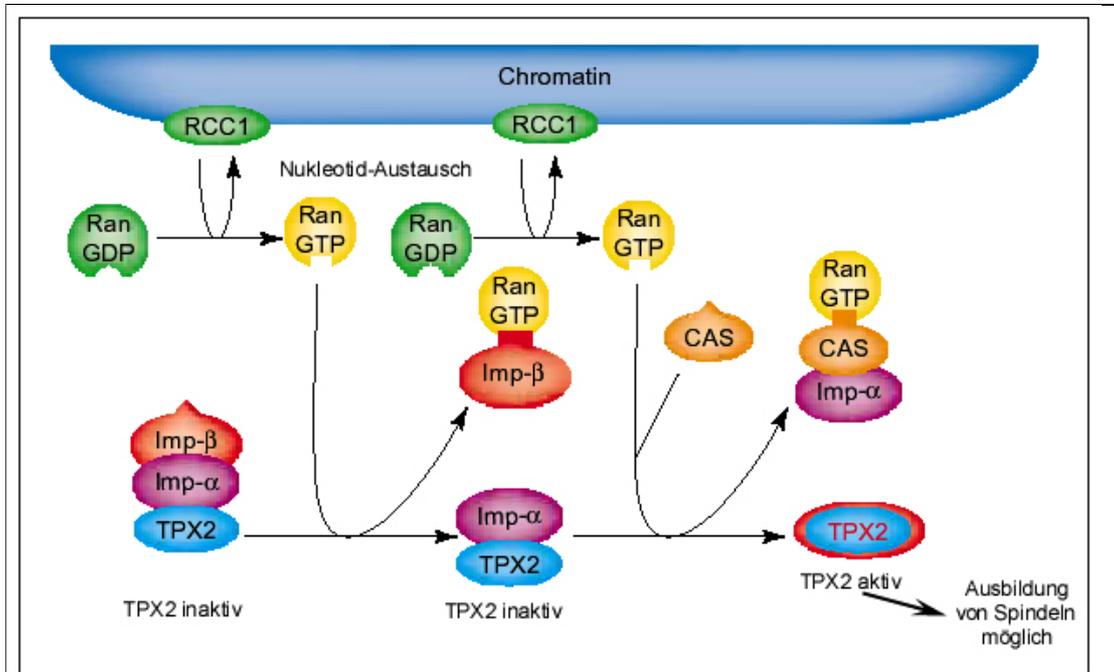
Lage ist RanGTP zu bilden (Carazo-Salas *et al.*, 1999; Nachury *et al.*, 2001), konnte eine kürzlich veröffentlichte Studie belegen, daß dies während der Mitose tatsächlich in der Nähe von Chromatin geschieht, so daß auch in mitotischen Zellen sich die höchste RanGTP-Konzentration um Chromatin herum befindet (Kalab *et al.*, 2002).

### **1.11.2 In der Metaphase stimuliert Ran die Ausbildung von Mikrotubuli und Spindeln**

Durch Verwendung eines *Xenopus* Ei-Extraktes als zellfreies und dadurch vom nukleozytoplasmatischen Transport unabhängigen Systems, wurde im Jahr 1999 ein Weg zur Unterscheidung direkter und indirekter Einflüsse von Ran auf andere zelluläre Prozesse gefunden. Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, daß durch Änderung des RanGTP/RanGDP-Gleichgewichtes Spindeln zerstört wurden (Carazo-Salas *et al.*, 1999; Kalab *et al.*, 1999). Aufgrund der Anwesenheit von RanGAP im Ei-Extrakt liegt Ran mit einer Konzentration von 1-2  $\mu\text{M}$  vorwiegend in der GDP-gebundenen Form vor. Untersuchungen zeigten, daß durch Zugabe des Austausch-Faktors RCC1 bzw. durch Verwendung von hydrolysedefizienten Ran-Mutanten, die dadurch hervorgerufene hohe Konzentration an RanGTP zu einer Ausbildung von Astern führte. Umgekehrt verhindert eine Ran-Mutante, die defekt bzgl. Bindung des Nukleotids ist und mit RCC1 einen stabilen Komplex bildet, ebenso wie die Zugabe von RanGAP und RanBP1 die korrekte Positionierung der Chromosomen an die Spindel der Metaphase.

RanGTP alleine ist jedoch nicht fähig gereinigte Tubulin-Untereinheiten zur Ausbildung von Mikrotubuli zu bringen. Anscheinend werden noch andere Faktoren benötigt. Diese Faktoren und der Mechanismus der Formung von Astern konnte im Jahr 2001 von drei Gruppen unabhängig aufgeklärt werden. RanGTP führt zu einer Freisetzung von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (nämlich TPX2 und NuMA, die beide zusammen mit Dynein bei der Konzentration von Spindelpolen beteiligt sind) von Importin- $\alpha$ /Importin- $\beta$  (siehe Abb. 7) (Gruss *et al.*, 2001; Nachury *et al.*, 2001; Wiese *et al.*, 2001).

Die Freisetzung von TPX2 und NuMA bewirkt die Bildung von Spindeln, umgekehrt verliert ein *Xenopus* Ei-Extrakt durch Ausfällung von TPX2 (und vermutlich auch NuMA) die Fähigkeit, Spindeln auszubilden (Hetzer *et al.*, 2002).

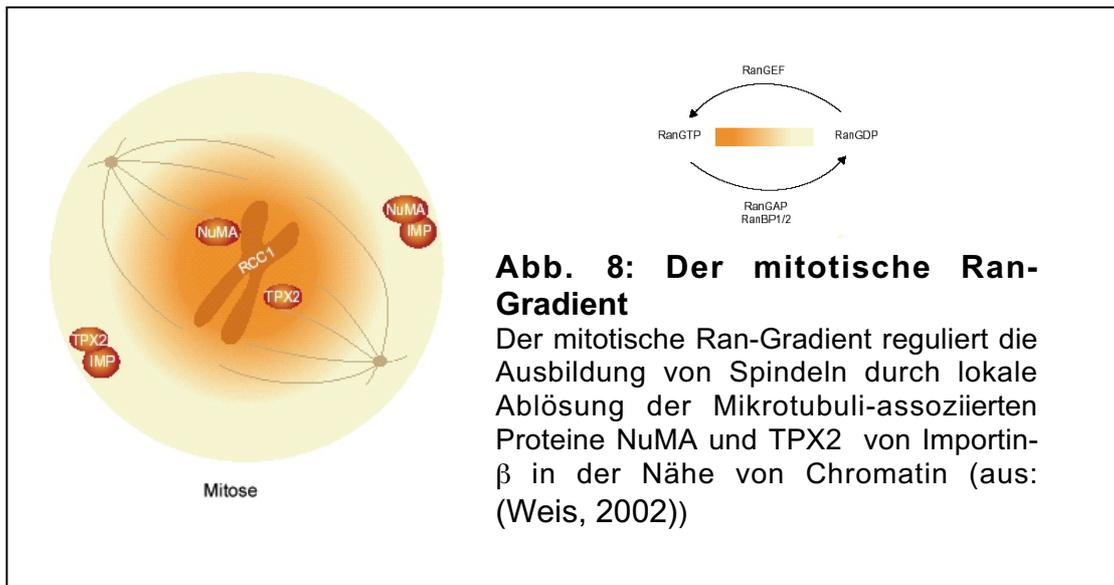


**Abb. 7: Die mitotische Rolle von Ran bei der Ausbildung von Spindeln.**

TPX2, ein essentieller Faktor für die Formung von Spindeln, ist normalerweise im Komplex mit Importin- $\alpha$  und Importin- $\beta$ . Dadurch ist keine Spindelausbildung möglich. Chromatin-assoziiertes RCC1 bildet RanGTP, welches zusammen mit dem Export-Rezeptor CAS zur Freisetzung von TPX2 und dadurch zur Ausbildung von Spindeln führt. (aus: (Kuersten *et al.*, 2001))

Daher ähnelt die Funktion von Ran in der Metaphase der Funktion von RanGTP im nukleozytoplasmatischen Transport. Beide Male führt die Bindung von RanGTP an Importin- $\beta$  zur Ablösung des Substrates.

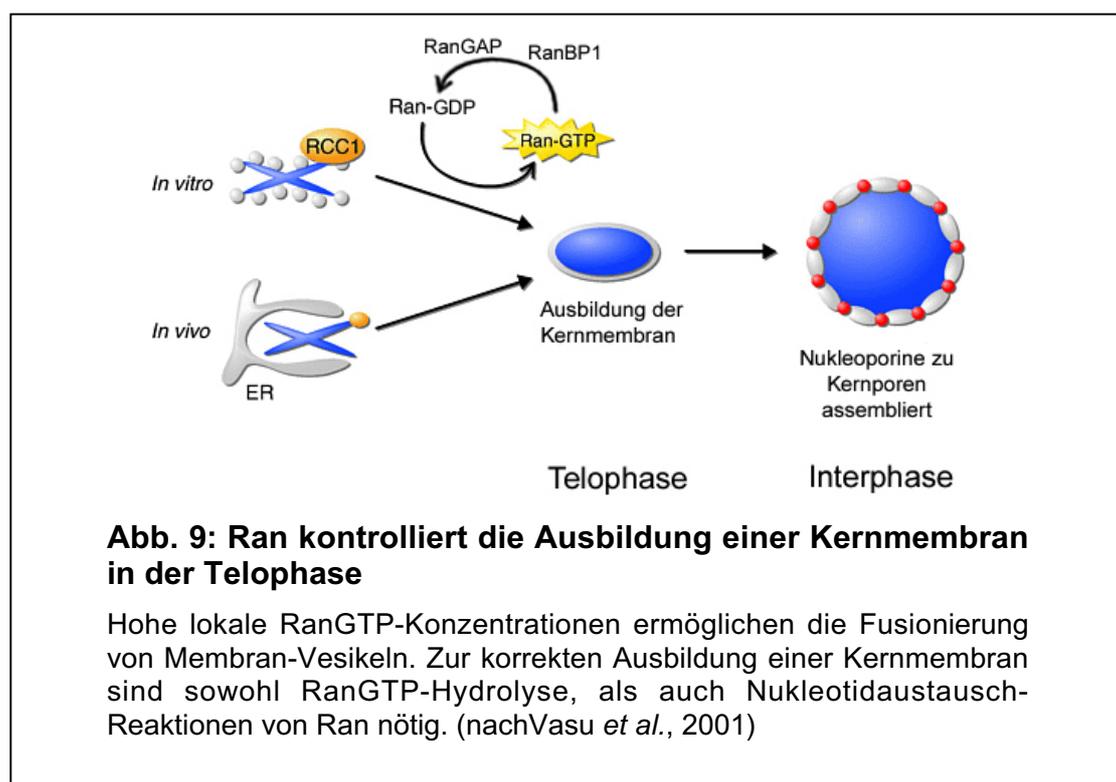
Aufgrund der Bindung von RCC1 an Chromatin besteht ein Ran-Gradient, der dafür sorgt, daß nur in unmittelbarer Nähe zu Chromatin TPX2 und NuMA losgelöst von den Importinen vorliegen. Dadurch wird ungeordnete Mikrotubuli-Polymerisation verhindert. In interphasischen Zellen werden diese Proteine – vermutlich aus gleichem Grund – vom zytoplasmatischen Tubulin ferngehalten und in den Kern gebracht (Dasso, 2001).



Diese mitotische Funktion von Ran scheint unter Säugerzellen konserviert zu sein (Guarguaglini *et al.*, 2000). Auch in *S. pombe* gibt es Hinweise, daß Ran in der Integration von Spindel-Mikrotubuli eine Rolle spielt, die unabhängig von seiner Funktion im nukleozytoplasmatischen Transport ist. So wurde eine Ran-Mutante identifiziert, die normalen zytoplasmatischen Transport ermöglicht, jedoch das aus Mikrotubuli bestehende Zytoskelett schädigt, was zu Chromosomen-Missegregation und abnormaler Zellform führt. Verstärkt werden diese Effekte noch durch Spindel-destabilisierende Einflüsse (Mutationen bzw. Mikrotubuli destabilisierende Substanzen), was für eine stabilisierende Rolle von Ran auf Spindel-Mikrotubuli spricht (Fleig *et al.*, 2000). Es gibt jedoch keinen Beweis, daß der Ran-Gradient in den eine geschlossene Mitose durchlaufenden Hefen *S. pombe* oder *S. cerevisiae* während der Mitose verändert wird. Rna1p bleibt zytoplasmatisch, Prp20p bleibt Chromatin-assoziiert (Sazer und Dasso, 2000). Ein nukleärer Ran-Gradient ist daher vermutlich nicht zu generieren. Zudem konnten keine homologen Proteine zu TPX2 und NuMA in Hefen identifiziert werden (Wittmann *et al.*, 2000).

### 1.11.3 In der Telophase reguliert Ran die Ausbildung der Kernmembran

Am Ende der Mitose muß die Kernmembran um Chromatin herum neu gebildet werden, Kernporenkomplexe müssen assembliert werden und nukleozytoplasmatischer Transport neu in Gang kommen. Nach Dekondensation des Chromatin binden Membranvesikel an Chromatin, fusionieren miteinander und bilden eine Doppelmembran aus. Nach und nach formen sich Kernporenkomplexe und das Kernvolumen wächst. Durch Verwendung von *Xenopus* Ei-Extrakt, dessen Chromatin zuvor dekondensiert wurde, konnte gezeigt werden, daß Ran für die Ausbildung einer Kernmembran benötigt wird (Hetzer *et al.*, 2000; Zhang und Clarke, 2001). Ran-Mutanten, die entweder die Hydrolyse (RanQ69L) bzw. die Nukleotid-Bindung (RanT24N) inhibieren, sind nicht zur Fusionierung von Membranvesikeln fähig (Hetzer *et al.*, 2000). Dies zeigt, daß im Gegensatz zur Funktion von Ran bei der Ausbildung von Spindeln, für die Neuformung einer Kernmembran sowohl eine funktionelle GTP-Hydrolyse, als auch ein funktioneller Nukleotid-Austausch benötigt werden. Die Entfernung von RCC1 bzw. RanGAP1 aus dem Extrakt verhindert ebenfalls die Ausbildung einer Kernmembran.



Es wurde jedoch beobachtet, daß die Proteinkonzentration des die Hydrolyse durch RanGAP stimulierenden Proteins RanBP1 während der Telophase stark (Guarguaglini *et al.*, 2000) absinkt, wodurch die Geschwindigkeit der Hydrolyse gesenkt wird. Noch nicht geklärt ist die Bedeutung dieses Phänomens.

Der genaue Mechanismus der Membranfusionierung ist noch nicht im Detail aufgeklärt, da die beeinflussenden Effektoren bislang weitgehend unbekannt sind. Man vermutet jedoch, daß als erster Schritt die höhere lokale Konzentration von RanGTP in der Nähe des Chromatins Membranvesikel anzieht. Anschließend fusionieren diese Vesikel und bilden ein röhrenförmiges Netzwerk auf der Chromatin-Oberfläche. Durch weiteres Fusionieren von Membranvesikeln bildet sich eine geschlossene Doppelmembran aus. Erst dann werden Untereinheiten der Kernpore und integrierte Membranproteine des Porenkomplexes assembliert und bilden individuelle Kernporenkomplexe. Abschließend werden nukleäre Komponenten wie Lamina importiert und die Kernmembran vergrößert (Hetzer *et al.*, 2001; Hetzer *et al.*, 2002).

Interessanterweise konnte gezeigt werden, daß eine mit Importin  $\beta$  beladene inerte Matrix in *Xenopus* Ei-Extrakten die Bildung einer Kernmembran um die Matrix herum auslöst. Das gleiche gilt, wenn statt dem Gesamtprotein nur jene Fragmente von Importin  $\beta$  benutzt werden, die an Nukleoporine binden. Dies widerspricht der beobachteten Ausbildung einer Kernmembran um Chromatin. Zum einen konnten vor der Fusion der Membranvesikel keine Nukleoporine in der um Chromatin herum ausgebildeten Membranfraktion nachgewiesen werden (Hetzer *et al.*, 2001). Außerdem konnte durch Verwendung des Metall-Chelators BAPTA die Bildung von Kernporenkomplexen verhindert werden, ohne daß die Neubildung der Kernmembran gestört war (Macaulay und Forbes, 1996).

Dies zeigt, daß diese bisher noch wenig verstandenen Prozesse noch intensiver weiterer Erforschung bedürfen.

#### 1.11.4 Indirekte Beeinflussung anderer zellulärer Prozesse durch Ran

Im Gegensatz zu höheren Eukaryonten durchlaufen Hefen und Pilze sowie einige Schleimpilze eine sogenannte geschlossene Mitose, das heißt die Kernmembran bleibt während des gesamten Zellzyklus erhalten. Daher ist es nach wie vor ungeklärt, ob Hefe-Ran noch andere direkte Funktionen ausübt. Durch eine gezielte Lokalisation von Substraten, die an verschiedenen Zellprozessen beteiligt sind, kann Ran jedoch indirekt Einfluß auf diese Prozesse nehmen.

Als Beispiel sei auf die wichtige Rolle der Proteine Far1p und Cdc24p beim Zellzyklus und der Konjugation von Hefen hingewiesen. Far1p pendelt zwischen Kern und Zytoplasma, akkumuliert aber in Abwesenheit von Pheromon an sein Substrat Cdc24p gebunden im Kern, da der Import von Far1p effektiver ist, als der Export. Nach Pheromon-Zugabe wird jedoch der Export von Far1p durch Msn5p stark beschleunigt, so daß Far1p im Komplex mit Cdc24p ins Zytoplasma exportiert und dort entlang eines Pheromon-Gradienten an die Spitze der Konjugations-Ausstülpung transportiert wird. Dort wirkt Cdc24p dann als GDP/GTP-Nukleotid-Austauschfaktor für den Regulator des Actin-Zytoskeletts Cdc42p und richtet dadurch das Zytoskelett während des polarisierten Zellwachstums korrekt aus (Butty *et al.*, 1998; Blondel *et al.*, 1999). Die zentrale Rolle des Ran-abhängigen Exports bei der Regulation dieses zellulären Prozesses wird hier sehr deutlich.

## 2 Ziel der Arbeit

Die Kompartimentalisierung eukaryontischer Zellen erfordert, daß Transportmaschinerien existieren, die dem jeweiligen Organell die erforderlichen Substanzen zuführt. Aufgrund der Trennung von Transkription und Translation durch die Kernmembran müssen daher Proteine und RNAs in den Kern importiert bzw. aus dem Kern exportiert werden. Bei diesem nucleozytoplasmatischen Transport, der durch die Kernporen (NPCs, nuclear pore complexes) stattfindet, spielt die nukleäre Ras-ähnliche GTPase Ran eine zentrale Rolle. Zu Beginn der Arbeit war bekannt, daß Mutationen in Ran neben dem nucleozytoplasmatischen Transport noch viele andere zelluläre Prozesse beeinflußt, wie z.B. den Ablauf des Zellzyklus, die Organisation von Chromatin und dem Zellkern, die Struktur des Nukleolus, die DNA-Replikation, die Chromosomensegregation, den RNA-Metabolismus, die Organisation von Mikrotubuli und die Konjugation bei Hefe. Es war hingegen unklar, ob die Vielfalt an Prozessen, an denen Ran beteiligt ist, eine indirekte Folge seiner primären Rolle im nucleozytoplasmatischen Transport ist, oder tatsächlich eine funktionelle Diversität dieses regulatorischen Proteins widerspiegelt.

Ziel dieser Arbeit war es, dieser Frage nachzugehen und neue Ran-interagierende Proteine in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* zu identifizieren und zu charakterisieren, um tiefere Einblicke in die Ran-Funktionen zu erhalten.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Allgemeine Methoden zur DNA-Manipulation

Molekularbiologische Methoden zur Manipulation von DNA wie Restriktionsverdau, Ligation von DNA-Fragmenten, Auftrennung und Analyse von DNA mittels Gelelektrophorese, Plasmidtransformation in *E. coli*, Herstellung elektrokompenter bzw. Kalzium-kompenter *E. coli* Zellen sowie Kultivierung bakterieller Zellen wurden nach Sambrook und Russel (2001) durchgeführt. Zu Klonierungszwecken wurde der *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  verwendet (F<sup>-</sup>( $\lambda$ 80d\_(*lacZ*)M15) *recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17* (r<sub>k</sub>-m<sub>k</sub><sup>+</sup>) *supE44 relA1 deoR*\_(*lacZYA-argF*) U169). Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des Qiaquick Gel Extraktions Kits (QIAGEN). Die Präparation von Plasmiden aus *E. coli* wurde im kleinen Maßstab nach der CTAB-Methode nach Sambrook und Russel (2001) durchgeführt bzw. unter Verwendung des Wizard Miniprep Kits (PROMEGA), zur Aufreinigung größerer DNA-Mengen wurde der Plasmid Midi Kit bzw. Plasmid Maxi Kit (MACHEREY-NAGEL) nach Angaben des Herstellers benutzt. Restriktionsenzyme wurden von MBI Fermentas bezogen. Die für präparative PCR-Reaktionen verwendete Vent-DNA-Polymerase stammt von der Firma NEW ENGLAND BIOLABS, ebenso die für analytische PCR-Reaktionen verwendete Taq-DNA-Polymerase und die T4-DNA-Ligase. Zur Hydrolyse von 5'-Phosphat-Resten von DNA wurde „Calf intestine alkaline phosphatase“ der Firma ROCHE DIAGNOSTICS eingesetzt, Oligonukleotide wurden von der Firma THERMOHYBAID bezogen und Sequenzierungen wurden von der Firma MWG durchgeführt.

### 3.1.2 Verwendete Plasmide

Die folgenden in dieser Arbeit verwendeten Plasmide wurden nicht selbst hergestellt:

pNOPPATA1L-GSP1wt, pNOPPATA1L-GSP1G21V, pGALPATG1L-GSP1wt, pNOPPATA1L, pRS314-YRB1-GFP, pNOPGFP2L (Hellmuth *et al.*, 1998); pNOPGFP2L-GCD11 (Hellmuth, unveröffentlicht); pNOPPATA1L-Gsp1-1 (Lau, unveröffentlicht); pRS315-NMD3-eGFP, YEplac195ADE2-L25NLS-GFP (Gadal *et al.*, 2001b); pRS315-NMD3 $\Delta$ NES1/2-eGFP (Gerstberger, unveröffentlicht); pGEX4T3-YRB1, pLDB450-wt (pTrcHisA-GSP1wt), YEplac112-yAP1-GFP, pMK263 (pRSETA-RNA1), pGALPATG1L (Künzler *et al.*, 2000); pMK104 (pRSETA-YRB1), pRS314-*yrb1-51*, pRS314-*yrb1-52* (Künzler *et al.*, 2001); YEp352GAL-Gsp1(G21V), pPROEX1-KAP95 (Künzler, unveröffentlicht); pET9d-His6-TB-XPO1, pHT4467 $\Delta$  ((Baßler, 2001); pRS315-pNOP-GFP-BUB3 (Bailer, unveröffentlicht); pUN100-SEC13-GFP (Siniosoglou *et al.*, 2000); pPS1739 (HOG1-GFP, (Ferrigno *et al.*, 1998)); pMK286 (pRS314-SRP1-eGFP; (Künzler und Hurt, 1998); pRS426-NLS-NES-2xGFP (modifiziert nach Stade *et al.*, 1997); YEp13-SPO7-GFP (Siniosoglou *et al.*, 1998); pGAD-GFP (P. Silver,); pNOPGFPA1A-GSP1 (Lau *et al.*, 2000); pGEX-2TK-KAP95 (Enenkel *et al.*, 1995); pET9d-GST-TEV-MAD (Stier, Heidelberg); pRS314-L25p-NLS<sub>L25</sub>-GFP-ARC1 (Galani, unveröffentlicht).

Die Konstruktion der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Plasmide ist im Folgenden beschrieben.

Zur Konstruktion einer N-terminal an die DNA-Bindungsdomäne des *E. coli*-Proteins LexA fusionierten Version von Gsp1p wurden der gesamte ORF mittels PCR amplifiziert, anschließend mit *StuI* und *PstI* verdaut und in die *SmaI*-*PstI*-Schnittstellen des Vektors pBTM116 (Bartel und Fields, 1995; Vojtek und Hollenberg, 1995) ligiert (pBTM116-GSP1wt). pBTM116-GSP1(G21V) und pBTM116-GSP1(T26N) wurden entsprechend kloniert, nur daß GSP1(G21V) bzw. GSP1(T26) auf einem pNOPPATA1L-Vektor als Matrizen für die PCR dienten. Im Falle des entsprechenden Zwei-Hybrid-Plasmids für *YRB30* wurde der vollständige ORF YGL164C von genomischer

DNA amplifiziert und als *EcoRI-BamHI*-Fragment in die analogen Schnittstellen des pBTM116-Vektors eingeführt (pBTM116-YRB30).

Die Klonierung einer N-terminalen Fusion von ProtA an Yrb30p erfolgte durch Amplifizierung des 1.3 kb-ORFs von YRB30 und dessen Ligation in die *NcoI-BamHI*-Schnittstellen des Galaktose induzierbaren Vektors pGALPATG1L (pUN100-GAL1::ProtA-TEV::GAL4) mittels eingeführter *NcoI* und *BamHI*-Schnittstellen am 5' und 3' Ende des ORFs (pGALPATG1L-YRB30). Von diesem Konstrukt wurde ein *NcoI-BamHI*-Fragment in den Vektor pNOPPATA1L (pUN100-NOP1::ProtA-TEV::ADH1) subkloniert (pNOPPATA1L-YRB30).

Eine N-terminal an GFP fusionierte Version von Yrb30p wurde ausgehend von letzterem Konstrukt durch Subklonierung des 1.4 kb-*PstI*-Fragments in pNOPGFP2L (pRS425-NOP1-GFP(S65T)) hergestellt (pNOPGFP2L-YRB30). Zur Lokalisation von YRB30 im Leptomycin B (LMB)-sensitiven Hefestamm mußte auf einen Vektor mit einem anderen Marker umkloniert werden. Hierfür wurde das GFP-YRB30-Fragment unter Kontrolle des *NOP1*-Promotors als *SacI-KpnI*-Fragment von pNOPGFP2L-YRB30 in die komplementären Schnittstellen des Vektors pRS424 bzw. pRS426 eingeführt (z. B. pRS426-NOPGFP2-YRB30).

Zur Herstellung eines rekombinanten Proteins, das an GST fusioniert ist, wurde aus dem Plasmid pET9d-GST-TEV-MAD2 (G. Stier) das MAD2-Gen durch Verdau mit *NcoI* und *SacI* herausgeschnitten und durch das entsprechende YRB30-enthaltende Fragment aus pGALPATG1L-YRB30 ersetzt (pET9d-GST-TEV-YRB30). GST-Fusionsproteine des Yrb30p-Homologen SPAC31A2.10 in *S. pombe* wurden als PCR-amplifizierte (von genomischer *S. pombe* DNA) *NcoI-SacI*-Fragmente in den gleichen Vektor überführt (pET9d-GST-TEV-SPAC31A2.10). Das GST-Fusionsprotein des Homologen SPCC584.03c wurde als PCR-amplifiziertes *BamHI/XhoI*-Fragment in die entsprechenden Schnittstellen des Vektors pGEX4T3 kloniert (pGEX4T3-SPCC584.03c(133-586)).

An His<sub>6</sub>-fusioniertes rekombinantes Protein wurde von einem Plasmid exprimiert, welches durch Fusionierung des *NcoI-BamHI*-Fragmentes aus dem entsprechenden pNOPPATA1L-Plasmid an die Sequenzabschnitte des pET9d-His6-TB (pET9dt)-Vektors (Novagen) direkt anschliessend an die

Erkennungssequenz für den Verdau mit Thrombin konstruiert wurde (pET9d-His6-TB-YRB30).

pGALPATG1L-GSP1 G21V wurde durch Subklonierung des *NcoI-BamHI*-Fragmentes aus dem vorhandenen Konstrukt pNOPPATA1L-GSP1G21V hergestellt.

Fusionen der zweiteiligen NLS des ribosomalen Proteins RPL25 (Leer et al., 1984) (Schaap et al., 1991) unter Kontrolle der RPL25-Promoters an GFP-YRB30 wurden durch Einführen von YRB30 als *PstI*-Fragment aus pNOPGFP2L-YRB30 in das bereits vorhandene Plasmid pRS314-L25p-NLS<sub>L25</sub>-GFP-ARC1 (K. Galani und E. Hurt, unveröffentlicht) zwischen der GFP-Sequenz und der für Arc1p codierenden Sequenz hergestellt. Durch das vorhandene Stop-Codon von YRB30 wurde gewährleistet, daß kein Arc1p translatiert wurde (pRS314-L25p-NLS<sub>L25</sub>-GFP-YRB30STOP-ARC1).

Zur Konstruktion von pNOPGFP-SUB2-YRB30 wurde pNOPGFP2L-YRB30 mit *PstI* und *SphI* verdaut und das resultierende *PstI-SphI* Vektorfragment zusammen mit dem YRB30 *PstI-PstI*-Fragment und einem *SphI-NsiI* GFP-SUB2-Fragment in einer Tripelligation aneinander gefügt. Letztgenanntes Fragment wurde mittels PCR amplifiziert (als Matrize diente pNOPGFPA1L-SUB2-Arc1 von K. Galani).

Konstrukte mit verkürzten oder mutierten Sequenzbereichen des *YRB30*-Gens wurden mittels PCR auf analoge Weise hergestellt.

Zur Expression des unmarkierten *YRB30* unter Kontrolle seines eigenen authentischen Promoters und Terminators wurde die Sequenz 0.5 kb 3' bis 0.5 kb 5' des ORFs von *YRB30* durch PCR von genomischer DNA amplifiziert und das entsprechende 2.3 kb große *BamHI-XbaI*-Fragment in dieselben Restriktionssequenzen von *Ycplac33* kloniert (*Ycplac33-YRB30p-YRB30-YRB30t*). pRS314-YRB30p-YRB30-YRB30t wurde dann durch Subklonierung des 2.3 kb großen *SacI-XbaI*-Fragmentes in die Restriktionsstellen *SacI* und *SpeI* des Vektors pRS314 hergestellt. Das gleiche genomische Fragment wurde auch in die *SacI-XbaI*-Schnittstellen des Plasmids pHT4467 $\Delta$  kloniert (pHT4467 $\Delta$ -YRB30p-YRB30-YRB30t)

Zur Überprüfung der Funktionalität der am C-terminalen Ende gelegenen NES von Yrb30p wurden verschiedene durch PCR amplifizierte Sequenzbereiche von *YRB30* als *Bam*HI-*Bam*HI-Fragmente in die *Bcl*I-Schnittstelle des vorhandenen Plasmids pRS315-NMD3 $\Delta$ NES1/2-eGFP (Gerstberger) amplifiziert (pRS315-NMD3 $\Delta$ NES1/2-eGFP-YRB30). Um die korrekte Orientierung des kurzen ungerichtet in diese Schnittstelle eingeführten Fragmentes überprüfen zu können, wurde C-terminal vor die *Bam*HI-Schnittstelle eine *Nco*I-Schnittstelle eingefügt.

Zur Überexpression wurde *YRB30* von Multicopy-Plasmiden unter Kontrolle eines *GAL1*-Promoters als Fusionsprotein mit ProtA (pGALPATG2L-YRB30) bzw. unter Kontrolle des *GAL10*-Promoters als His<sub>8</sub>-Fusionsprotein (pEMBLyex4-His8-YRB30) exprimiert. Für das erstgenannte Konstrukt wurde zunächst durch Umklonierung des GAL1p-2xProtA-TEV-GAL4t Fragmentes als *Not*I-*Hind*III-Fragment in die entsprechenden Schnittstellen des Vektors pRS425 der Vektor pGALPATG2L erhalten. Der ORF von *YRB30* wurde dann als *Nco*I-*Bam*HI-Fragment aus dem Plasmid pGALPATG1L-YRB30 eingeführt. Zur Expression des His<sub>8</sub>-Fusionsproteins wurde der durch PCR hergestellte *YRB30*-ORF als *Bam*HI-*Xba*I-Fragment in die entsprechenden Schnittstellen des Vektors pEMBLyex4-His<sub>8</sub> unter Berücksichtigung des korrekten Leserasters kloniert.

Die Expression von His<sub>6</sub>-Gsp1 $\Delta$ DE (His<sub>6</sub>-Gsp1(1-212)) erfolgte vom Plasmid pTrcHisA-Gsp1 $\Delta$ DE, welches durch Einfügen eines PCR amplifizierten *Nhe*I-*Hind*III-Fragments in die entsprechenden Erkennungssequenzen des pTrcHisA-Vektors hergestellt wurde.

pNOPGFP2L-STE5 wurde durch Subklonierung des *Pst*I-Fragments aus pNOPPATA1L-STE5 in pNOPGFP2L hergestellt. pNOPPATA1L-STE5 wurde durch Einführung des PCR amplifizierten *STE5*-Fragmentes (Matrize: Plasmid YEp13-STE5 von V. L. MacKay) in die *Nco*I und *Bam*HI Schnittstellen von pNOPPATA1L gewonnen.

Die Expression der Konstrukte wurde durch Immunoblot unter Verwendung des anti-Yrb30p-Antiserums bzw. anti-ProtA, anti-GFP oder anti-GST-Antikörper überprüft.

## 3.2 Mikrobiologische Methoden

### 3.2.1 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Zur Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* wurden BL21-Zellen (B, F-, dcm, ompT, hsdS(rB-mB-), gal(DE3)) mit dem für die Expression des jeweiligen Proteins kodierenden Plasmid transformiert. Mit einer einzelnen Kolonie wurde eine Übernachtskultur in MM-Medium (siehe (Sambrook und Russel, 2001)) und dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft und bei 37°C inkubiert. Die Übernachtskultur wurde 1:100 in MM mit dem entsprechenden Antibiotikum verdünnt und weiter bei 37°C in MM gezogen. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0.7 wurde 1 ml der Kultur entnommen, bevor sie mit 0,2 mM IPTG induziert wurde. Die Kultur wurde weitere zwei bis drei Stunden bei 23°C inkubiert, die OD<sub>600</sub> erneut gemessen, eine dem ersten Aliquot entsprechende Zellmenge entnommen, die restlichen Zellen pelletiert und bei -20°C eingefroren. Beide entnommenen Aliquots wurden abzentrifugiert, in 100 µl 1x Laemmli-Puffer (Laemmli, 1970) resuspendiert und 3 min bei 95°C gekocht. Die lysierten Zellen wurden 10 min bei 14.000 rpm in einer Eppendorffzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorffgefäß überführt. Zur Überprüfung der Proteinexpression wurden 10 µl von beiden Proteinextrakten durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung oder Western-Blot unter Verwendung der entsprechenden Antikörper analysiert.

#### 3.2.1.1 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen aus *E. coli*

Zur Aufreinigung der GST-Fusionsproteine aus *E. coli* wurde jeweils 1 l der entsprechend transformierten BL21 bei einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,7-1 mit IPTG induziert, die Zellen durch Zentrifugation abgeerntet und das mit H<sub>2</sub>O gewaschene Zellpellet bei -20°C eingefroren.

Das Zellpellet einer 1 l Kultur wurde in 20 ml "Universal buffer" (20 mM HEPES, pH 7,0, 100 mM KOAc, 2 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 0,1% Tween 20, 10% Glycerin, 5 mM β-Mercaptoethanol, Complete EDTA-free protease inhibitor

mix (ROCHE DIAGNOSTICS) resuspendiert und die Zellen durch Sonifizieren in Eis lysiert. Die Zellbruchstücke wurden abzentrifugiert (1h, 100.000 g, 4°C) und der lösliche Überstand für 1 h bei 4°C mit 200 µl Glutathion-Sepharose 4B (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH AB), die zuvor mit 10 ml "Universal buffer" gewaschen wurden, auf einem Drehrad inkubiert. Die GSH-Sepharose wurde zu einer Säule (BIORAD) gegossen und mit 10 ml "Universal buffer" gewaschen. Anschließend wurden die Proteine mit 400 µl "Universal buffer" plus 10 mM GSH für 15 min bei Raumtemperatur auf dem Drehrad eluiert. Durch dieses Prozedere können GST-Fusionsproteine aus einem *E. coli* Zelllysat sehr sauber aufgereinigt werden.

### **3.2.1.2 Aufreinigung von His<sub>6</sub>-Fusionsproteinen aus *E. coli***

Zur Aufreinigung von His<sub>6</sub>-Fusionsproteinen aus *E. coli* wurden BL21-Zellen, die die entsprechenden Expressionskonstrukte (z. B. pET9d-YRB30) enthielten in Minimalmedium mit entsprechendem zugesetztem Antibiotikum bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,7 gezogen und mit 0.2 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation abgeerntet, das Zellpellet mit H<sub>2</sub>O gewaschen und bei -20°C eingefroren.

Das Zellpellet einer 1 l Kultur wurde in 20 ml "Universal buffer", der zusätzlich noch 5mM Imidazol enthielt, resuspendiert und die Zellen durch Sonifizieren in Eis lysiert. Die Zellbruchstücke wurden abzentrifugiert und der lösliche Überstand für 1 h bei 4°C mit 300 µl TALON-beads (CLONTECH), die zuvor mit 10 ml des gleichen Puffers gewaschen wurden, auf einem Drehrad inkubiert. Das Inkubat wurde in eine Säule (BIORAD) gegossen, und 3 x mit je 10 ml Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Fusionsprotein mit 400 µl "Universal buffer", der 100 mM Imidazol enthielt, eluiert .

### **3.2.1.3 Aufreinigung und Beladung von His<sub>6</sub>-Gsp1 aus *E. coli***

Zur Aufreinigung von His<sub>6</sub>-Gsp1 wurde das entsprechende Zellpellet nach dem Abernten in 10 ml TSE-Puffer (50 mM Tris pH 8, 25% Sucrose, 1mM EDTA, Complete EDTA-free protease inhibitor mix) resuspendiert, in diesem

Puffer eingefroren und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. Nach schnellem Auftauen im  $37^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbad wurden 10 ml "Universal buffer" zugegeben und die Zellen durch Sonifizierung aufgeschlossen. Anschließend wurde 1% Triton X-100, 1% Tween 20 und 5mM Imidazol zugegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das His<sub>6</sub>-Fusionsprotein wie oben beschrieben aufgereinigt. Direkt im Anschluß wurde Gsp1 mit GTP beladen. Hierzu wurde 30 mM KPi (pH 7.5), 1 mM GTP und 10 mM EDTA (pH 8) zugegeben und bei Raumtemperatur 1 h inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 mM Mg(OAc)<sub>2</sub> gestoppt, weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert und das beladene Protein in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

### 3.2.2 Arbeiten mit *S. cerevisiae*

Plasmide sowie lineare DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der Lithium-Acetat-Methode nach (Ito *et al.*, 1983) in *S. cerevisiae* transformiert. Die Kreuzung von Stämmen (Konjugation zur Erzeugung von Diploiden, Sporulation, Tetradsenseparation und Tetradenanalyse) wurde wie in (Sherman, 1991) beschrieben durchgeführt. Zur Präparation genomischer DNA aus Hefe wurde der QIAamp DNA Mini Kit (QUIAGEN) nach Angaben des Herstellers benutzt.

#### 3.2.2.1 Medien zur Hefezüchtung / Hefezüchtung

Alle Hefestämme wurden in Standardmedien nach (Sherman, 1991) gezogen. **Vollmedien** enthielten 1% Hefe-Extrakt (DIFCO), 2% Bacto-Pepton (DIFCO) und entweder 2% Glukose (YPD) oder 2% Galaktose (YPG). Tetraden wurden auf YPD-Platten separiert, die 4 % Glukose enthielten.

**Synthetische (S-) Medien** enthielten 0,67% Hefe-Stickstoffgrundlage (Yeast Nitrogen Base) ohne Aminosäuren (Difco) , 2% Glukose (SD), 2% Galaktose (SG) oder 2% Raffinose (SR) sowie 7% des entsprechenden CSM (complete synthetic mix) (BIO101), welches die für das Wachstum benötigten Aminosäuren sowie Purin- und Pyrimidinbasen enthält, außer jenen, die für die Selektion auxotropher Marker (z.B. *leu*, *trp*, *ade* etc.) nötig sind. Der pH

wurde jeweils auf 5.5 eingestellt. **Feste Medien** enthielten zusätzlich 2% Agar.

Zur Selektion Uracil-auxotropher Zellen wurde den entsprechenden synthetischen Festmedien 0.1 % 5-FOA zugegeben (TORONTO RESEARCH CHEMICALS). Kanamycin-resistente Zellen wurden auf Glukose-Vollmedium (YPD), welches 200 µg/ml Geneticin (SIGMA) enthielt, selektioniert.

Das Wachstum der Zellen in Flüssigkultur wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 600 nm verfolgt. Eine optische Dichte ( $OD_{600}$ ) von 1,0 entspricht etwa  $3 \times 10^7$  Zellen/ml.

### 3.2.2.2 Verwendete Hefestämme

Die verwendeten Hefestämme sind in Tabelle 3 aufgelistet.

**Tabelle 3: Verwendete Hefestämme**

Name	Genotyp	Quelle
W303	<i>MATa<math>\alpha</math> ura3-1 trp1-1 his3-11,15 leu2-3,112 ade2-1 can1-100 GAL</i>	R. S. Fuller
RS453	<i>MATa<math>\alpha</math> ura3-52 trp1-1 leu2-3 ade2-1 his3-11,15 can1-100</i>	(Wimmer <i>et al.</i> , 1992)
BY4741	<i>MATa his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 MET15<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	EUROSCARF
Y04531	<i>MATa his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 MET15<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 yrb30::KanMX4</i>	EUROSCARF
GSP1 "Shuffle"-Stamm, wt	<i>MAT a leu2- ura3- LYS1 trp1- his3- ade2-gsp1::HIS3 pRS316-GSP1</i>	(Lau <i>et al.</i> , 2000)
GSP1 "Shuffle"-Stamm, rna1-1	<i>MAT a leu2- ura3- LYS1 trp1- his3- ade2-gsp1::HIS3 rna1-1 pRS316-GSP1</i>	(Lau <i>et al.</i> , 2000)
NMD3 "Shuffle" Stamm	<i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 TRP1 nmd3::kanMX4 (ARS/CEN URA3 NMD3)</i>	(Gadal <i>et al.</i> , 2001b)
CRM1T539C (MNY8)	<i>MATa ura3-1 trp1-1 his3-11,15 leu2-3,112 ade2-1 can1-100 GAL+ xpo1::KAN pRS315-CRM1T539C</i>	(Neville und Rosbash, 1999)
RS453 $\Delta$ los1	<i>MAT a ade2-1 his3-11,15 ura3-52 leu2-3,112 trp1-1 can1-100 los1::HIS3</i>	K. Hellmuth
cse1-2 (AJH54)	<i>MATa ade2-101 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-delta901 ura3-52 cse1::LEU2 pRS314-Cse1-2</i>	(Schroeder <i>et al.</i> , 1999)
$\Sigma$ (sigma) MATa	<i>MATa his3::hisG leu2::hisG trp1::hisG ura3-52</i>	H.-U. Mösch
$\Sigma$ (sigma) MATalpha	<i>MAT<math>\alpha</math> his3::hisG leu2::hisG trp1::hisG ura3-52</i>	H.-U. Mösch
L40 $\Delta$ gal4	<i>MATa his3-delta200 trp1-901 leu2-3,112 ade2 lys2-801am gal4<math>\Delta</math> LYS2::(lexAop)4-HIS3 URA3::(lexAop)8-lacZ</i>	BD Clontech™ / P. Legrain
Y187	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 his3-200 ade2-101 trp1-901 leu2-3,112 met- gal4<math>\Delta</math> gal80<math>\Delta</math> URA3::GAL1<sup>UAS</sup>-GAL1<sup>TATA</sup>-lacZ</i>	BD Clontech™ / P. Legrain
W303-1a prp20-1	<i>MATa ade2-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 can1-100 GAL+ prp20-1</i>	M. Aebi/M. Künzler

Name	Genotyp	Quelle
W303-1a <i>ma1-1</i>	<i>MATa MATa ura3-1 trp1-1 his3-11,15 leu2-3,112 ade2-1 can1-100 GAL ma1-1</i>	A. Hopper/M. Künzler
FS-xpo1-1 (MATa)	<i>MATa ade2-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 can1-100 GAL+ xpo1::KAN pRS313-xpo1-1</i>	F. Stutz/M. Künzler
KW-xpo1-1 (MATalpha)	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 GAL+ xpo1::LEU2 pRS313-xpo1-1</i>	(Stade <i>et al.</i> , 1997)
KW-XPO1 (MAT alpha)	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 GAL+ xpo1::LEU2 pRS313-XPO1</i>	(Stade <i>et al.</i> , 1997)
XPO1 "Shuffle"	<i>MATa ura3-1 trp1-1 his3-11,15 leu2-3,112 ade2-1 can1-100 GAL+ xpo1::KAN pRS316-XPO1</i>	(Künzler <i>et al.</i> , 2000)
YRB1 Shuffle Stamm	<i>Mata ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 GAL+ yrb1::HIS3 YEP352-YRB1</i>	(Künzler <i>et al.</i> , 2001)
$\Delta$ yrb2	<i>MAT a YRB2::kanMX4 his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	VON EUROSCARF-Stamm Y21456 abstammend
$\Delta$ nup2	<i>W303-1a nup2::HIS3</i>	(Künzler <i>et al.</i> , 2001)
FDJN067-06A(A) ( $\Delta$ mog1)	<i>MAT a LYS2 mog1::kanMX4 ura3-52 his3<math>\Delta</math>200 leu2<math>\Delta</math>1 trp1<math>\Delta</math>63</i>	EUROSCARF
W303-1a <i>srp1-31</i>	<i>MATa ura3-1 trp1-1 his3-11,15 leu2-3,112 ade2-1 can1-100 GAL+ srp1-31</i>	(Loeb <i>et al.</i> , 1995)
<i>mex67-5</i>	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1, ura3-1 mex67::HIS3 pUN100-mex67-5</i>	(Segref <i>et al.</i> , 1997)
PSY967 <i>kap123::HIS3</i>	<i>MATalpha his3<math>\Delta</math>200,15 leu2<math>\Delta</math>1,112 ura3-52 kap123::HIS3</i>	(Seedorf und Silver, 1997)
$\Delta$ nup42	<i>MATa ade2 leu2 trp1 ura3 his3 nup42::KanMX</i>	(Stutz <i>et al.</i> , 1997)
PSY 1199 <i>nmd5::HIS3</i>	<i>MATalpha ade2::hisG ade8<math>\Delta</math>-100::KAN-R ura3<math>\Delta</math> leu2<math>\Delta</math> HIS3<math>\Delta</math>200 nmd5::HIS3</i>	(Ferrigno <i>et al.</i> , 1998)
PSY1200 <i>sxm1::HIS3</i>	<i>MATa ura3-52 leu2<math>\Delta</math>1 his3<math>\Delta</math>200 trp1<math>\Delta</math>63 sxm1::HIS3</i>	(Seedorf und Silver, 1997)
RS453H <i>pdr6::HIS3</i>	<i>MATalpha ade2 leu2 trp1 ura3 his3 pdr6::HIS3</i>	(Lau <i>et al.</i> , 2000)
<i>lhp1::LEU2 (CY4)</i>	<i>MATa ura3 lys2 ade2 trp1 his3 leu2 lhp1::LEU2</i>	(Yoo und Wolin, 1994)
<i>nup188::HIS3-2C</i>	<i>MATalpha ade2 ura3 leu2 trp1 his3 nup188::HIS3</i>	Santos-Rosa (unveröffentlicht)
YAB20	<i>MATa ura3-1 trp1-1 his3-11,15 leu2-3,112 ade2-1 can1-100 GAL yrb30::HIS3</i>	diese Arbeit
YAB21	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-1 trp1-1 his3-11,15 leu2-3,112 ade2-1 can1-100 GAL yrb30::HIS3</i>	diese Arbeit
YAB22	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-1/ura3-1 trp1-1/ trp1-1 his3-11,15/ his3-11,15 leu2-3,112/ leu2-3,112 ade2-1/ ade2-1 can1-100/ can1-100 GAL/ GAL yrb30::HIS3/ yrb30::HIS3</i>	diese Arbeit
YAB15	<i>W303-1a msn5::TRP1</i>	diese Arbeit
RS453 YRB30GFP(S65T)	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 trp1-1 leu2-3 ade2-1 his3-11,15 can1-100 YRB30-GFP::HIS3</i>	diese Arbeit
RS453 YRB30-ProtA	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 trp1-1 leu2-3 ade2-1 his3-11,15 can1-100 YRB30-ProtA::TRP1</i>	diese Arbeit
RS453 YRB30-CBD-TEV-ProtA	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 trp1-1 leu2-3 ade2-1 his3-11,15 can1-100 YRB30-CBD-TEV-ProtA::TRP1</i>	diese Arbeit

### **Herstellung spezieller Stämme:**

#### **A.) Disruption von YRB30 in *S. cerevisiae***

(→ YAB20, YAB21, YAB22, sigma  $\Delta$ yrb30 (MATa))

Zur Disruption des *YRB30*-Gens wurde zunächst das *HIS3*-Markergen vom Vektor pRS313 durch PCR amplifiziert. Durch die dabei verwendeten Primer (5'-GAAGGATTA ACTTTAACTATTACCTAACACCAATATCTGAAGAGAgcag attgtactgagagtgc-3' und 5'-ACAATTATAAAATTTGTCCAAGGCTGCACAGGATACGTAACCATCctccttactcatctgtgcgg-3') wurde ein DNA-Fragment mit langen Überhängen erzeugt, die zur 5'-UTR bzw. 3'-UTR-Region des *YRB30*-ORF komplementär sind (Die zur 5'- bzw. 3'-UTR-Region homologe Sequenz ist mit Großbuchstaben, die an die *HIS3*-Sequenz bindende Sequenz mit Kleinbuchstaben gekennzeichnet). Durch homologe Rekombination wurde diese DNA gegen den ORF ausgetauscht. Auf diese Weise wurden Disruptionen von *YRB30* im W303 Stamm, sowie im sigma-Stamm durchgeführt.

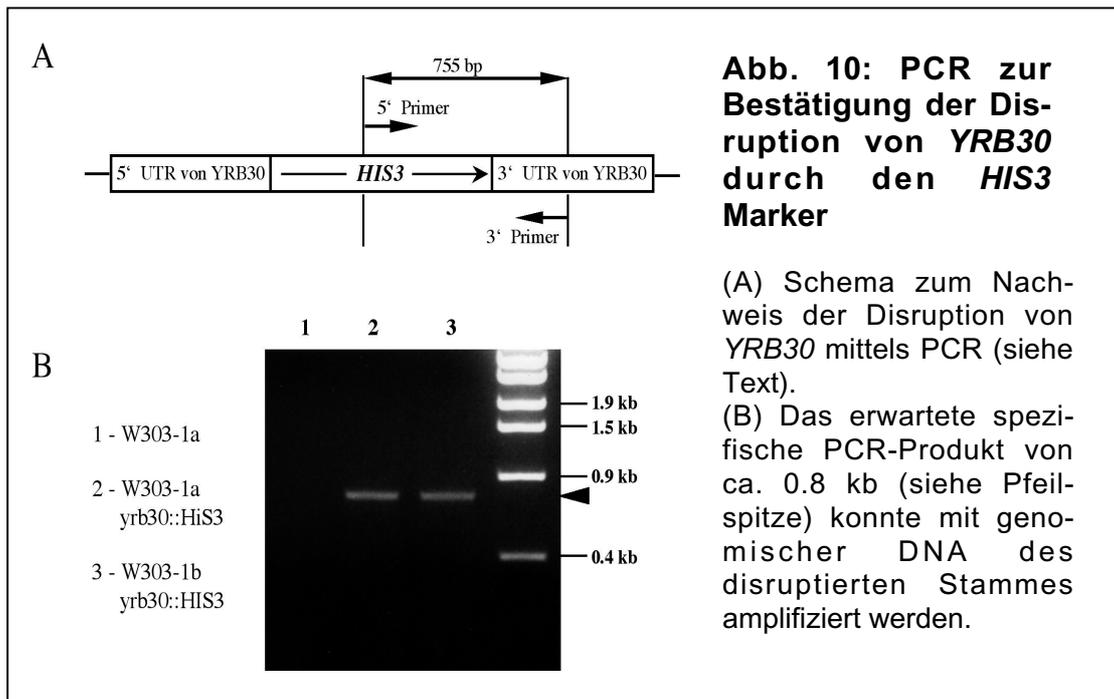
Die korrekte Disruption des *YRB30*-Gens durch den *HIS3* Marker wurde mittels PCR nachgewiesen (siehe Abb. 10). Hierzu wurde genomische DNA des haploiden Ausgangsstammes W303-1a (bzw. sigma) bzw. des für *YRB30* disruptierten Stammes (beide Mating-types) als Matrize verwendet sowie Primer, die innerhalb des *HIS3*-Gens hybridisieren (Kleinbuchstaben in Abb. 10A) und 3' vom *YRB30*-ORF (Großbuchstaben). Das erwartete 0.8 kb große Produkt konnte im Falle des disruptierten Stammes nachgewiesen werden, nicht aber für den Ausgangsstamm (siehe Abb. 10B)

Die hierbei eingesetzten Primer haben die folgende Sequenz:

(5'-ccagagcggtag-3') und (5'-GGAGAATGGAATGTCAATATCG-3').

Zur weiteren Bestätigung des Knockouts wurden Hefeextrakte des disruptierten Stammes und Yrb30p-exprimierender Kontrollstämme durch einen Immunoblot unter Verwendung des  $\alpha$ Yrb30p-Antikörpers auf Expression von Yrb30p getestet.

Die Disruptionen (Einzel- und Doppel-) der beiden *YRB30*-Homologen in *S. pombe* wurde von Valerie Doye, (Institut Pasteur, Paris), die Disruption des Homologen in *Ashbya gossypii* von Peter Philippsen (Biozentrum, Basel) durchgeführt.



#### B.) YRB30-ProtA (→RS453 YRB30-ProtA)

Eine Integration der für ProtA kodierenden Sequenz an das 3' Ende des YRB30-ORF wurde ebenfalls unter Ausnutzung der homologen Rekombination erzielt. Hierfür wurde ProtA-TRP1 vom Plasmid pFA6a-ProtA-TRP1 unter Verwendung der Primer (5'-GCAATTCGACAATTGAAGAGACAGAAAAAAGTTAAAAACCTAAACTTcggatccccgggtaattaa-3') und (5'-TAT ATACAATTATAAAATTTGTCCAAGGCTGCACAGGATACGTAACCATCgaattcgagctcgtttaaac-3') amplifiziert, in den Hefestamm RS453a transformiert und dadurch vor dem Stop-Codon von YRB30 ins Genom integriert.

#### C.) YRB30-GFP(→RS453 YRB30-GFP(S65T))

Auf gleiche Weise wurde der YRB30-ORF C-terminal an eGFP-HIS3 fusioniert, wobei die gleichen Primer, jedoch das Plasmid pFA6a-GFP(S65T)-His3MX6 verwendet wurde.

#### D.) YRB30-TAP (C-terminales TAP-tagging)

Zur Herstellung einer genomischen Fusion der YRB30-Sequenz an die Calmodulin-Bindungsdomäne-TEV-Erkennungssequenz-ProtA, wurde die entsprechende Sequenz von Plasmid pBS1479 unter Verwendung der Primer (5'-ATAAGCAATTCGACAATTGAAGAGACAGAAAAAAGTTAAAAACCTA

AAACTTTCCATGGAAAAGAGAAG-3') und (5'-CGGGCCGAGATTCCGGATAAATTTTTCCATTCGTATACATATACATAGATATACGACTCACTATAGGG-3') amplifiziert und in den Stamm RS453 transformiert.

Alle genomischen Fusionen von *YRB30* wurden durch Immunoblot überprüft.

### 3.2.2.3 Wachstumsanalyse von Hefezellen

Übernacht-Flüssigkulturen in Voll- bzw. Selektivmedium wurden auf eine  $OD_{600}$  von 0.5 ( $1.5 \times 10^7$  Zellen) in 1 ml Wasser verdünnt und hiervon weitere Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1.000 und 1:10.000) angesetzt. Auf vorgetrocknete Festmedien wurden dann je 7  $\mu$ l (Vollmedien) bzw. 10  $\mu$ l (synthetische Medien) jeder Verdünnung als Tropfen in einer Reihe aufgetragen. Die Inkubation der Platten erfolgte, wo nicht anders angegeben, bei 23°C und 30°C für mehrere Tage.

### 3.2.2.4 Test auf Defekte im invasiven Wachstum

Um zu überprüfen, ob *YRB30* notwendig für haploides invasives Wachstum von Hefe ist, wurde *YRB30* im haploiden Sigma-Stamm disruptiert. Ein Flächenausstrich des Ursprungstammes, des zu untersuchenden Stammes sowie eines wt Laborstammes (z. B. W303-1a, der nicht zu invasivem Wachstum fähig ist) wurde bei 30°C vier Tage auf YPD-Festmedium wachsen lassen, die Platte vorsichtig unter einem Wasserstrahl gründlich abgewaschen und erneut für 1-2 Tage bei 30°C inkubiert. Bei invasivem Wachstum wächst der Zellausstrich durch die in den Agar eingewachsenen Zellen schnell wieder nach .

### 3.2.2.5 Lokalisierung von Proteinen mithilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie

Zur Bestimmung der zellulären Lokalisation wurde das GFP-Protein (GFP(S65T) oder eGFP) an den N- oder C-terminus der zu lokalisierenden Proteine fusioniert.

Exponentiell wachsende Zellen wurden kurz abzentrifugiert, der Überstand weitgehend entfernt und die Zellen im restlichen Medium resuspendiert. Deren Lokalisation wurde mittels eines ZEISS-Axioskop-Fluoreszenz-Mikroskops bestimmt, wobei für Fluoreszenzaufnahmen der entsprechende Filter verwendet wurde. Mit einer Xillix Microimmager CCD-Kamera wurden Fotos aufgenommen und mit Hilfe der Computerprogramme Improvision (OPENLAB) und Photoshop 4.01 (ADOBE) weiter bearbeitet.

Zur Lokalisation von Proteinen in Leptomycin B-sensitiven Stämmen wurden 10 ml einer Übernachtskultur mit einer  $OD_{600}$  von etwa 0,6 abzentrifugiert und in 1ml synthetischem Medium, welches auf den entsprechenden auxotrophen Marker des enthaltenen Plasmids selektioniert, resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in zwei gleich große Ansätze geteilt, dem einen Ansatz wurden 5 $\mu$ l (= 1:100) einer Lösung von LMB (erhalten von Herrn Dr. M. Yoshida, University of Tokyo, Tokyo, Japan) in EtOH (10  $\mu$ g/ml), dem anderen Ansatz zur Kontrolle das gleiche Volumen Ethanol zugesetzt. Die Lokalisation wurde für beide Ansätze nach 10 Minuten, 20, Minuten, 30 Minuten, 1h, 2h und 3 h bestimmt.

Zur Lokalisation von Yrb30p bei Depletion von Xpo1p wurde ein durch ein Galaktose-induziertes *ProtA-XPO1* komplementierter *xpo1::KAN<sup>R</sup>* Disruptionsstamm verwendet, der mit *GFP-NLS<sub>L25</sub>-YRB30* auf einem Single-Copy Plasmid transformiert wurde. Nach Wachstum der Transformanten in Galaktose enthaltendem Medium wurden die Zellen vorsichtig (3000 rpm) abzentrifugiert und in Glukose enthaltendes Medium überführt. Nach 18 h war vollständige Depletion von Xpo1p erreicht.

### 3.2.2.6 In situ-Hybridisierung von poly(A)<sup>+</sup> RNA

Zur Analyse des mRNA-Exportes wurde die Lokalisierung von polyadenylierter RNA in Hefezellen durch in situ-Hybridisierung mit CY3-markiertem oligo-d(T) bestimmt (Santos-Rosa *et al.*, 1998).

### 3.2.2.7 Aufreinigung von ProtA-Fusionsproteinen aus Hefe

Zur Reinigung von überproduziertem Yrb30p aus Hefezellen wurden Galaktose-induzierbare Konstrukte, pGALPATG1L) bzw. pGALPATG1L-YRB30 in  $\Delta yrb30$ -Stämme transformiert. Nach Kultivierung der Zellen in SRC-Leu-Medium bei 23°C bis zu einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,5 und 0,7 wurden die Zellen durch Zugabe von gleichem Volumen YPG-Vollmedium induziert (2% Galaktose-Endkonzentration) und anschließend 2 h bei 37°C weiter inkubiert, bevor sie abgeerntet wurden.

Zur kontinuierlichen Expression von ProtA (pNOPPATA1L) bzw. ProtA-Yrb30 (pNOPPATA1L-YRB30) wurden entsprechende Knockout-Stämme bei 30°C bis zu einer OD<sub>600</sub> zwischen 1,0 und 1,5 in SDC-Leu-Flüssigmedium gezogen. Die Zellen wurden jeweils abzentrifugiert, mit Wasser gewaschen, und das Zellpellet. wurde pro 1.000 OD<sub>600</sub> Zellen in 100 ml 100 mM Tris-HCl, pH 9,4, 10 mM DTT resuspendiert und bei Raumtemperatur für 7 min bei sanfter Bewegung inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in 1,2 M Sorbitol, 20 mM KP<sub>i</sub>, pH 7,4 (100 ml pro 1000 OD<sub>600</sub> Zellen) resuspendiert. Pro g Zellen wurden 2 mg Zymolase 100T (SEIKAGAKU) hinzugefügt und für 30 min bei 30°C bei sehr sanfter Bewegung inkubiert. Die Entstehung von Sphäroplasten wurde durch Verdünnen von 50 µl der Sphäroplastensuspension in 1 ml H<sub>2</sub>O oder 1 ml 1,2 M Sorbitol, 20 mM KP<sub>i</sub>, pH 7,4 überprüft. Die H<sub>2</sub>O-Lösung sollte in kurzer Zeit klar werden, da die sphäroplastierten Hefen aufplatzen, während die isotonische Lösung mit 1,2 M Sorbitol trüb bleibt. Die Sphäroplasten wurden vorsichtig abzentrifugiert, mit 1,2 M Sorbitol, 20 mM KP<sub>i</sub>, pH 7,4 sorgsam gewaschen und das Pellet bei -20°C eingefroren.

Zum Aufschluß der Sphäroplasten wurden diese in Lysepuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, Proteaseinhibitoren; 10 ml pro 1 g Sphäroplasten) resuspendiert und durch 10-maliges Passagieren durch einen "Douncer" mechanisch lysiert. IgG-Sepharose 6 Fast FLOW (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH AB) (250 µl Bettvolumen/ 3 g Zellen) wurden mit TST-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20) und AcOH (pH 3,4) gewaschen und anschließend mit dem Überstand des abzentrifugierten Lysats (1h, 100.000 g, 4°C) etwa eine Stunde bei 4°C inkubiert. Die IgG-Sepharose wurde anschließend mit 10 Bettvolumen TST-Puffer gewaschen. ProtA bzw. ProtA-Yrb30 wurde anschließend durch 600 µl 0.5 M Essigsäure (pH 3,4) (= Säureeluat) bzw. durch 2-stündige Inkubation mit ca. 5 µl TEV-Protease (GIBCO BRL) in 250 µl Puffer (= TEV-Eluat) eluiert.

ProtA-Gsp1(wt) bzw. ProtA-Gsp1(G21V) wurde im *gsp1::HIS3* Knockout-Stamm konstitutiv exprimiert (pNOPPATA1L) und die Zellen wie im Falle des kontinuierlich exprimierten ProtA-Yrb30 kultiviert und aufbereitet.

### 3.2.2.8 Aufreinigung von einem TAP-Fusionsprotein

Die Aufreinigung eines TAP-Fusionsproteins (Fusion eines Proteins mit Calmodulin-Bindungssequenz-TEV-Erkennungssequenz-ProtA) von Yrb30p erfolgte gemäss (Rigaut *et al.*, 1999). Zusammenfassend wird bei dieser Methodik das aufzureinigende Protein zuerst über eine IgG-Sepharose aufgereinigt. Nach Abspaltung des ProtA durch Ausnutzung der TEV-Protease-Schnittstelle zwischen den beiden Markern wird das Eluat in einem zweiten Schritt über eine Calmodulin-Matrix von unspezifischen Kontaminanten befreit.

Eine 2l-Kultur von YRB30-TAP-Zellen in YPD-Medium wurde in einem mit Schikanen versehenen 5l-Erlenmeyerkolben bei 30°C auf einem Schüttler bis zu einer OD<sub>600</sub> von 3.0-4.0 wachsen lassen. Nach Abzentrifugieren der Zellen bei 4600 g wurde das gewaschene Zellpellet bei -80°C aufbewahrt. Der Aufschluß des in Lysepuffer (mit 1 mM DTT und Protease-Inhibitoren) resuspendierten Zellpellets erfolgte in in einer Fritsch 'Pulverisette 6' (AXON

LABORTECHNIK GMBH, Kaiserslautern) aufgrund mechanischer Zerstörung der Zellmembran durch kleine Glaskügelchen. Nach Abzentrifugieren des Zellhomogenates bei 100.000 g für 1 h bei 4°C wurden an der Oberfläche schwimmende Lipide entfernt und der klare Überstand mit IgG-Sepharose 1h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden ungebundene Proteine entfernt, die Matrix 3x mit je 5 ml Lysepuffer (mit DTT, aber ohne Protease-Inhibitoren) vorsichtig gewaschen und gebundene Proteine durch Inkubation mit 5-10 µl TEV-Protease in 300 µl Lysepuffer (+DTT) bei 16°C für 2h eluiert. Zur weiteren Reinigung des abzentrifugierten 'TEV-Eluats' wurden 250 µl Calmodulin-Sepharose (STRATAGENE) mit 150 µl Kalzium-haltigem Lysepuffer (+1 mM DTT, +4 mM CaCl<sub>2</sub>) und 150 µl 'TEV-Eluat' 1h bei 4°C inkubiert. Nach Waschen der Sepharose mit 5 ml Lysepuffer (+ 1mM DTT, + 2 mM CaCl<sub>2</sub>) wurden gebundene Proteine durch Inkubation in Elutionspuffer (10 mM Tris/HCl, pH 8.0; 5 mM EGTA) für 15 min bei 37°C auf dem Thermoschüttler eluiert und anschließend abzentrifugiert.

Die eluierten Proteine wurden anschließend durch Zugabe von 10% Trichloressigsäure (TCA) auf Eis ausgefällt (10 min) und abzentrifugiert. Nach Waschen des Proteinniederschlags in 1 ml 10%-iger TCA wurden die Proteine in 60 µl Probenpuffer gelöst, mittels Ammoniak auf einen basischen pH gebracht und vor Auftragung auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel 3 min. bei 95°C aufgeköcht.

### 3.2.2.9 *S. cerevisiae*-Gesamtproteinextrakte

Zur Extraktion der Gesamtproteine von *S. cerevisiae* wurden 10 OD<sub>600</sub> einer logarithmisch wachsenden Hefekultur durch Zentrifugation abgeerntet, Glasperlen (100 µl, 0,55 Durchmesser), 100 µl Wasser und 100 µl 4x Laemmli-Puffer (Laemmli, 1970) zum Zellpellet zugegeben und die Zellen durch zweimaliges 3-minütiges Erhitzen auf 95°C und vortexen lysiert. Der Extrakt wurde kurz bei 14.000 rpm in einer Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Für Immunoblots wurden in der Regel 8 µl des Überstands eingesetzt.

### 3.2.2.10 Synthetisch-letale Durchmusterung des Genoms mit der $\Delta$ yrb30-Mutante

Als synthetische Letalität bezeichnet man den Zelltod aufgrund der Kombination zweier nicht letaler Mutationen bzw. Disruptionen. Die synthetisch-letale Durchmusterung des Genoms unter Verwendung des yrb30-Disruptionsstammes wurde nach Doye und Hurt (Doye und Hurt, 1995) durchgeführt.

Als Versuchsstamm diente ein  $\Delta$ yrb30 ade2 ade3 Stamm, der das pURA3-ADE3-YRB30-Plasmid pHT4467 $\Delta$ -YRB30 enthält. Durch den ADE3-Marker ist somit eine farbliche Unterscheidung zwischen Mutanten, die das oben genannte Plasmid verlieren können (rot-weiß-sektorierende Zellen) und solchen Mutanten, die synthetisch letal mit der  $\Delta$ yrb30-Mutation sind, also nur in Gegenwart des Plasmids überleben können (rote Kolonien), möglich. Um den Zellen schneller die Möglichkeit des Plasmidverlusts zu geben, besaß das verwendete ADE3-Plasmid zudem eine Deletion von 24 bp im CEN6-Bereich (Baßler, 2001), wodurch eine bessere Unterscheidung von wirklichen roten sl-Kandidaten und sektorierenden Zellen möglich wurde. Eine stationäre Kultur dieser Zellen wurde 1:10.000 verdünnt, je 200-400  $\mu$ l auf YPD-Platten aufgetragen und mit UV-Licht mutagenisiert (ca. 4 % Überlebensrate). Die Kolonien wurden auf eine rote, d.h. nicht-sektorierende Kolonien-Bildung und auf das Unvermögen auf 5-FOA-haltigen Platten zu wachsen überprüft.

### 3.2.2.11 Zwei-Hybrid-Screen mit unterschiedlichen Hefe-Ran-Mutanten

L40 $\Delta$ Gal4-Zellen, in denen das *E. coli lacZ* Gen unter Kontrolle von acht LexA-Bindungsstellen (Bartel und Fields, 1995) steht, wurden mit den Plasmiden pBTM116-GSP1(wt), pBTM116-GSP1G21V bzw. pBTM116-GSP1T26N transformiert. 80 OD<sub>600</sub> dieser das Zielprotein ('bait') enthaltenden Zellen wurden anschließend mit Y187-Hefezellen vermischt, die mit der FRYL-DNA-Bibliothek aus dem Labor von Pierre Legrain (Institute Pasteur, Paris) transformiert waren (ca. 13 Millionen Hefetransformanten). Nach 4,5 stündiger Inkubation und Konjugation der Zellen bei 30°C auf insgesamt 5

YPD-Platten, wurden die Platten mit insgesamt 30 ml SDC-Leu-His-Trp abgewaschen.

Zur Ermittlung der Zahl der eingesetzten Zellen sowie der Konjugations-Effizienz, wurde eine 1000-fache Verdünnung auf SDC-Leu-, SDC-Trp- bzw. SDC-Leu-Trp-Platten ausplattiert. Die restlichen Zellen wurden auf ca. 90 SDC-Leu-Trp-His-Platten ausplattiert und drei Tage bei 30°C inkubiert.

Der Hefestamm L40 $\Delta$ Gal4 besitzt ein *HIS3*-Reportergen, welches die Selektion positiv diploider Zellen in Abwesenheit von 3-Aminotriazol (3-AT) ermöglicht. Nach Selektion möglicher Kandidaten auf SDC-his-Platten (Expression des *HIS3*-Reportergens erforderlich) wurde auf Expression des zweiten Reportergens (*LacZ*) getestet. Zur schnellen Identifizierung wurde hier die Blaufärbung von *LacZ*-exprimierenden Zellen nach Inkubation mit X-Gal direkt auf den Transformationsplatten durchgeführt. Jede der ca. 90 Transformationsplatten pro Screen wurde mit 10 ml einer ca. 45°C warmen Agarlösung, bestehend aus 5 ml 0.5 M Natriumhydrogenphosphat-Puffer pH 7.5 mit 4.2 ml 1% Agar, 200  $\mu$ l 2% (w/v) X-Gal in DMF, 100 % 10% SDS und 500  $\mu$ l DMF vorsichtig überschichtet. Nach Festwerden des Agars wurden die Platten mit der Überschichtungs-Phase nach oben zeigend bei 30°C inkubiert. Jeweils nach 30 Minuten, 1h, 2h, 4h, 6h sowie über Nacht wurden blaugefärbte Zellen (Positive) mithilfe eines Zahnstochers auf SDC-Leu-Trp-His-Platten gesichert. Da die Überschichtungsphase für die Zellen bei längerer Inkubation toxisch ist, überlebten nicht alle Kandidaten diese Prozedur.

Die Zwei-Hybrid-Analyse unter Verwendung von Yrb30 als Beute („bait“) wurde in Zusammenarbeit mit Micheline Fromont-Racine und Pierre Legrain (Institut Pasteur, Paris) durchgeführt.

### 3.3 Biochemische Methoden

Die Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese, Anfärbung von Protein-Banden mit Coomassie-Blau bzw. Silberfärbung sowie Westernblot-Analyse wurden nach Sambrook und Russel (2001) durchgeführt.

#### 3.3.1 *In-vitro* Bindungsstudien zur Bestimmung von Protein-Protein-Interaktionen

In der Regel wurden für Bindungsassays aufgereinigte und von der Affinitätsmatrix eluierte GST-Fusionsproteine erneut an GSH-Säulen gebunden, nur in Ausnahmefällen wurde bereits an Säulenmaterial gebundenes Protein eingesetzt. Für jede Bindungstudie wurden je 20µl mit "Universal buffer" gewaschener GSH-Sepharose eingesetzt. Das an das Säulenmaterial zu bindende jeweilige Protein wurde mindestens 1:15 mit "Universal buffer" verdünnt für 1 h bei 4°C mit der GSH-Sepharose inkubiert. Anschließend wurde kurz gewaschen und die aufgereinigten Proteine, deren Bindung getestet werden sollte, in einem Gesamtvolumen von 200 µl zugegeben. Nach 1h Inkubation bei 4°C wurden nichtgebundene Proteine abzentrifugiert und mit Laemmli-Puffer versetzt (= Nichtgebundene Fraktion). Vor der Elution gebundener Proteine wurde die GSH-Sepharose 3x mit je 500 µl "Universal buffer" gewaschen. Das Säulenmaterial wurde mit 45µl "Universal buffer" vorsichtig in Reaktionsgefäße überführt, die gebundenen Proteine mit 1x Laemmli-Puffer eluiert und durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung bzw. Western-Blot mit den entsprechenden Antikörpern analysiert.

#### 3.3.2 Bindungsstudien mit Hefeextrakt

Für Bindungsstudien unter Verwendung von Hefeextrakt wurde der wt Stamm W303-1a in Vollmedium bei 30°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1.5 wachsen lassen. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in "Universal buffer" durch vortexen mit kleinen Glaskügelchen in einer Fritsch 'Pulverisette 6' (Axon Labortechnik GmbH, Kaiserslautern) aufgeschlossen. Endogenes Glutathion im Zellüber-

stand wurde durch Gelchromatographie unter Verwendung von G25-fine-Sepharose (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) entfernt.

Die Beladung der im Überstand vorhandenen GTPasen mit GTP $\gamma$ S erfolgte entsprechend der Beladung von Gsp1p mit GTP (siehe Kapitel 3.2.1.3).

GST-Yrb30p (ca. 15  $\mu$ g) wurde mit 50  $\mu$ l Glutathion-Sepharose in "Universal buffer" 1h bei 4°C inkubiert, ungebundenes Protein durch Waschen entfernt und die Matrix 1h bei 4°C mit ca. 800  $\mu$ g Hefeextrakt inkubiert. Nach Waschen (4x 500  $\mu$ l) der Sepharose wurden gebundene Proteine durch Aufkochen in 1x Laemmli-Puffer eluiert und durch SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung, sowie mittels Massenspektrometrie analysiert.

### **3.3.3 Detektion von Yrb30p innerhalb eines Saccharose-Dichtegradienten**

Zur Herstellung eines 10–50 %-iger Saccharose-Dichtegradienten wurden 10%-ige bzw. 50%-ige Sacchrose-Lösungen in Puffer A (20 mM HEPES-KOH (pH 7,5), 10 mM KCl, 1 mM EGTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) hergestellt und der Gradient mithilfe des ProTeam LC Gradienten System (ISCO) nach Angaben des Herstellers erstellt. Dies ergab 10ml Gradientenlösung in für den Swing-out Rotor SW40 passenden BECKMAN Zentrifugenröhrchen.

Hefelysate des wt-Stammes BY4742 wurde erhalten, indem eine 500 ml Kultur dieses Stammes bei 30°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 wachsen lassen wurde. Anschließend wurden 10 mg Cycloheximid zugegeben, für 30 min inkubiert und die Zellen abzentrifugiert. Das Hefepellet wurde mit 10 ml Puffer gewaschen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –20 °C gelagert. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 1,5 ml Glasperlen (0,5 mm) und 0,6 ml Puffer A durch 4x 30 s Vortexen bei 4 °C. Das Lysat wurde 10 min bei 24.000 g und 4°C zentrifugiert und 200  $\mu$ l 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 ( $\lambda=254$  nm) des Gradienten mit dem ProTeam LC Gradienten System (ISCO) bestimmt und in 400  $\mu$ l Volumen fraktioniert. Zur Sedimentationsanalyse von Proteinen wurden die einzelnen Fraktionen mit TCA

gefällt, durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Westernblot ( $\alpha$ Yrb30p) analysiert.

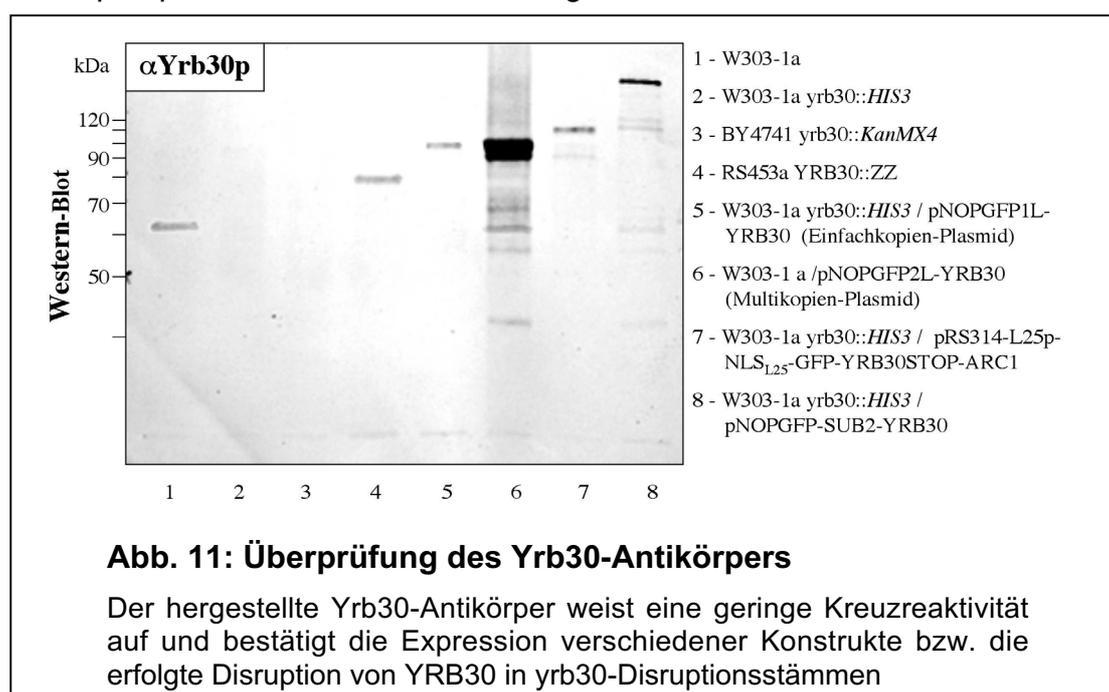
### 3.3.4 Quantitative Messung des RanGEF-vermittelten Guanin-nukleotid-Austauschs, der RanGAP-vermittelten GTP-Hydrolyse sowie der intrinsischen GTP-Hydrolyseaktivität

Die von Dr. Ralf Bischoff durchgeführten Aktivitätsmessungen des Nukleotid-austausches bzw. der Hydrolyseaktivität von Ran wurden wie in Deane et al. beschrieben durchgeführt (Deane *et al.*, 1997)

## 3.4 Immunologische Methoden

### 3.4.1 Erzeugung von $\alpha$ -Yrb30p Antikörpern

Um Antikörper gegen Yrb30p zu erhalten, wurde insgesamt ca. 1 mg affinitäts- gereinigtes His-Yrb30p (in Elutionspuffer, siehe 3.2.1.2) zur Injektion von zwei Kaninchen an DR. J. PINEDA, ANTIKÖRPER-SERVICE (Berlin) geschickt. Immuneserum und Präimmuneserum wurden mit Hilfe von Gesamtproteinextrakten von Yrb30p-exprimierenden Stämmen (z.B. von Plasmiden wie pBTM116-YRB30, pEMBLyex4-His8-YRB30) und verschiedenen GFP-Yrb30p-exprimierenden Hefestämmen getestet.



### 3.4.2 Immunoblot

Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (MiniProtean-System, BIORAD) und mit Hilfe eines Semi-Dry Blotters (BIORAD bzw. PEQLAB) auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Membran wurde mit TPBS (1xPBS, 0.1% Tween 20) mit 5% Magermilchpulver gesättigt und über Nacht mit dem jeweiligen Antikörper im selben Medium inkubiert. Die eingesetzten Antikörper und Verdünnungen sind unten aufgelistet.

Erstantikörper	eingesetzte Verdünnung	Zweitantikörper	eingesetzte Verdünnung
$\alpha$ Gsp1p (Kaninchen)	1:5000	$\alpha$ Kaninchen	1:2000
$\alpha$ Yrb30p (Kaninchen)	1:4000	$\alpha$ Maus	1:2000
$\alpha$ Yrb1p (Kaninchen)	1:2000	$\alpha$ Ziege	1:2000
$\alpha$ GFP(Maus)	1:1000		
$\alpha$ GST (Ziege)	1:1000		
$\alpha$ ProtA	1:2000		

Nach Waschen der Membran mit TPBS für 3x 15 min wurde diese für 1 h bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden Zweit-Antikörper in TPBS inkubiert. Die Membran wurde anschließend 3x mit TPBS gewaschen und der Blot mit dem ECL-Kit (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) entwickelt. Nach Detektion der Signale in der Dunkelkammer, wurde die Membran kurz in PBS gewaschen und anschließend die Signalbanden mit einer Mischung aus 5  $\mu$ l 4-Chloro-1-naphtol Stocklösung (300 mg/ml Ethanol) in 500  $\mu$ l Methanol, 5  $\mu$ l 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 4 ml 1xPBS angefärbt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Aufreinigung von ProtA-Gsp1p aus *S. cerevisiae*

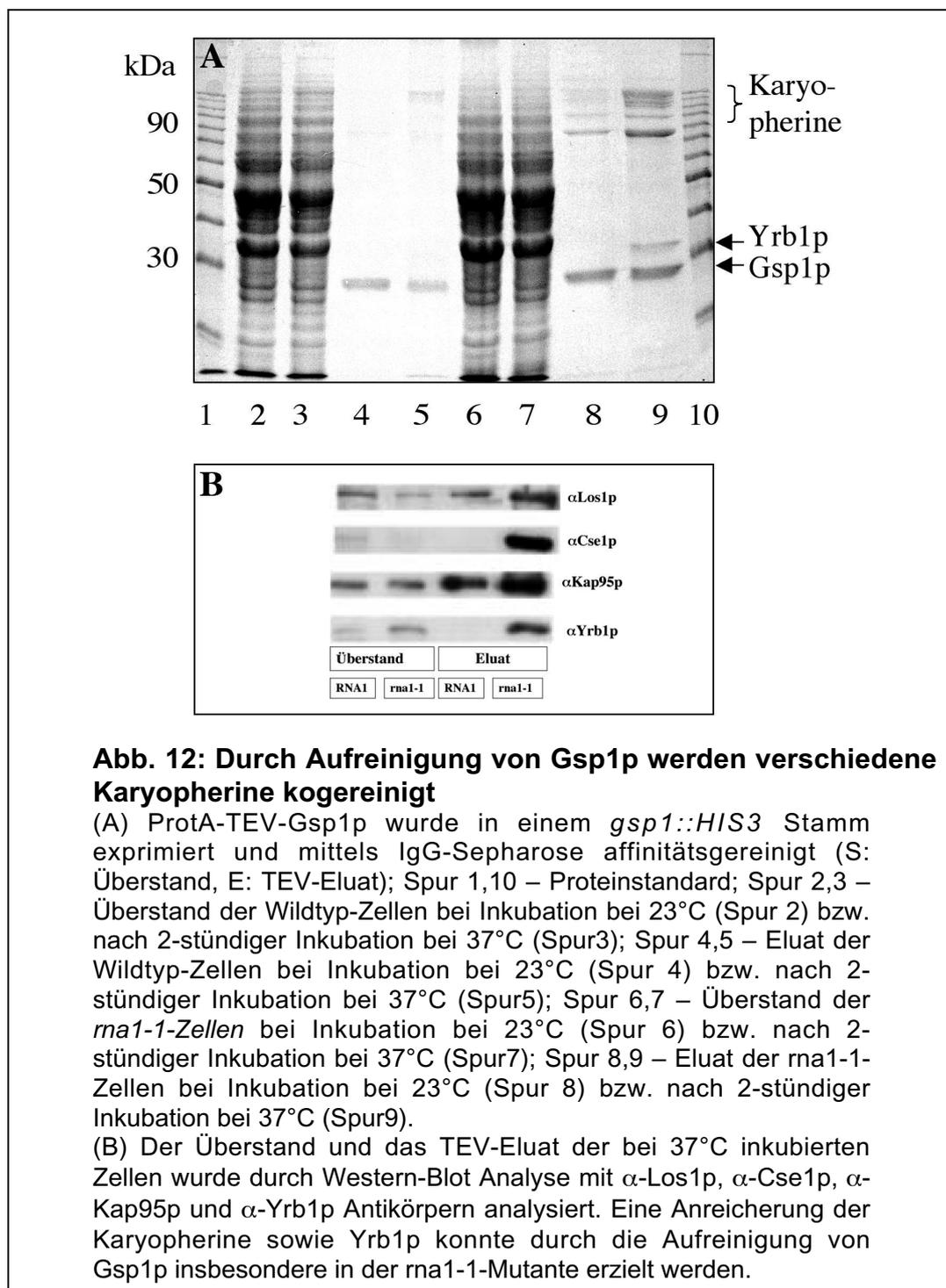
Um Hinweise auf die Funktionen des Hefehomologen von Ran, Gsp1p, zu erhalten, sind neue Bindungspartner dieses Proteins, deren zelluläre Funktion bekannt ist, sehr hilfreich. Zur Identifizierung von neuen Bindungspartnern kann man einen biochemischen Ansatz wählen, indem man das entsprechende Fusionsprotein aus dem jeweiligen Organismus - in diesem Fall aus Hefe - an einer Affinitätsmatrix aufreinholt. *In vivo* existierende, stabile Proteinkomplexe werden dabei relativ rein dargestellt und können als koreinige Proteine mittels SDS-PAGE nachgewiesen werden. Diese Methode wurde für Gsp1p bereits vor Beginn dieser Arbeit angewendet (Schlenstedt *et al.*, 1995). Dabei konnte mittels Aufreinigung von GST-Gsp1p aus Hefe das RanGTP-bindende Protein Yrb1p identifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Fusionsprotein von Gsp1p und dem ProtA-Epitop aufgereinigt, dessen volle Funktionalität durch Komplementation eines *gsp1*-Disruptionsstammes gezeigt wurde (Lau *et al.*, 2000). Bei dieser Methode kann das an IgG-Sepharose gebundene ProtA-Gsp1p und an dieses assoziierte Proteine mit einer Säurelösung (0.5 M Ammoniumacetatpuffer pH 3.4) eluiert werden. Alternativ kann man natives Gsp1p von der Affinitätsmatrix mit Hilfe der TEV-Protease eluieren, da zwischen dem ProtA-Epitop und Gsp1p eine Schnittstelle der viralen TEV (Tobacco-Etch-Virus)-Protease eingeführt wurde. Deren spezifische Erkennungssequenz (Glu-X-X-Tyr-X-Gln-Ser) ist in keinem Hefeprotein vorhanden, so daß bei der Aufreinigung aus Hefe keine unerwünschten Nebenprodukte auftauchen.

Da das aus Wildtyp-Zellen aufgereinigte ProtA-Fusionsprotein des Ran-Hefehomologen durch das im Zelllysate befindliche RanGAP, Rna1p, vorwiegend in seine GDP-gebundene Form hydrolysiert wird, wurde ProtA-Gsp1p auch aus temperatur-sensitiven *rna1-1* Zellen isoliert. Um die GTP-Hydrolyse in *rna1-1* Zellen zu inhibieren, wurde die Zellkultur 2 Stunden lang

bei nicht-permissiver Temperatur (37°C) inkubiert. Unter diesen Bedingungen kann Ran vorwiegend in seiner GTP-gebundenen Form aufgereinigt werden. Zur Aufreinigung von ProtA-Gsp1p wurden Hefestämme verwendet, in denen das mit dem *HIS3*-Marker disruptierte *GSP1* Gen durch ein plasmidkodiertes *ProtA-GSP1* Gen, welches unter Kontrolle des *NOP1*-Promotors steht, komplementiert ist.

Mittels Coomassie- bzw. Silber-gefärbten Proteingelen wurde das TEV-Eluat der Aufreinigung auf koreinigende Proteine untersucht (siehe Abb.12).

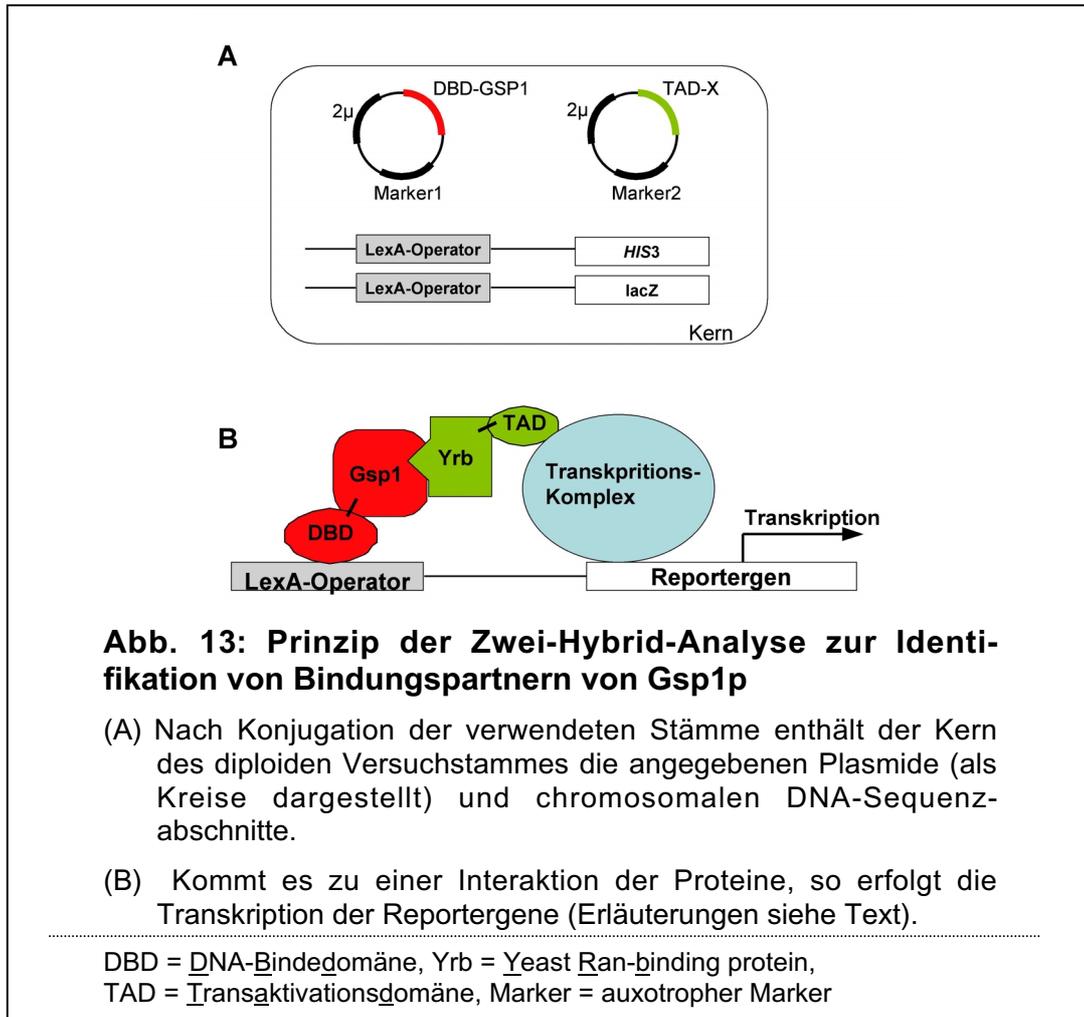


Einige koreinigende Banden wurden massenspektrometrisch analysiert. Es konnten mehrere  $\beta$ -Karyopherine mit ProtA-Gsp1p aufgereinigt werden, insbesondere von *rna1-1* Zellen, was die vorherrschende Art des an Gsp1p gebundenen Nukleotids widerspiegelt. Cse1p konnte im Eluat von *rna1-1* Zellen am stärksten angereichert werden. Sichtbare Mengen von Yrb1p konnten nur mit Gsp1pGTP aufgereinigt werden. In gleicher Weise wurde Gsp1p aus *prp20-1* Zellen aufgereinigt (ohne Bild), wobei in diesem Fall keine RanGTP-bindenden Proteine mit aufgereinigt werden konnten.

Zusammenfassend konnte mittels dieses biochemischen Ansatzes, außer der Identifizierung eines weiteren  $\beta$ -Karyopherins (Pdr6p) durch Aufreinigung des fast identischen Gsp2p (Lau *et al.*, 2000), kein neues Ran-bindendes Protein gefunden werden.

## 4.2 Durchmusterung des Hefegenoms nach neuen Ran-bindenden Proteinen mittels der Zwei-Hybrid-Technik

Die Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse wurde erstmals im Jahre 1989 beschrieben (Fields und Song, 1989) und stellt eine Methode dar, um Protein-Protein-Interaktionen in Hefe nachzuweisen. Bei dieser Methode werden die Testproteine an eine spezifische DNA-Bindungsdomäne (z.B. LexAp-DNA-Bindedomäne) bzw. eine Transkriptionsaktivierungsdomäne (z.B. Gal4p-Aktivierungsdomäne) fusioniert. Mittels einer NLS gelangen die Fusionsproteine in den Zellkern (siehe Abb. 13A). Kommt es zu einer Interaktion der Proteine, so aktiviert der 'upstream' vom Reportergen (*lacZ*) an die spezifische DNA-Bindungsdomäne gebundene Komplex die Transkription des Reportergens (siehe Abb. 13B). Der Nachweis einer erfolgten Transkription des Reportergens erfolgt über einen Farbaassay, bei dem ein farbloses Substrat (X-Gal) vom *lacZ*-Genprodukt  $\beta$ -Galaktosidase zu einem blau gefärbten Produkt umgesetzt wird. Als zusätzliche Kontrolle wird ein Marker-gen als Reporter eingesetzt (*HIS3*), das auf entsprechendem Drop-out-Medium auf Interaktion des Reportergens mit dem zu untersuchenden Protein selektioniert.



Um mittels dieser Methode Interaktionen von Gsp1p sowohl in seiner GTP-, als auch GDP-gebundenen Form zu erfassen, wurde die vollständige codierende Sequenz (ORF) des Wildtyp-Proteins ebenso wie auch die Sequenz der G21V-Mutante und der T26N-Mutante von GSP1 an die DNA-Bindungsdomäne von LexA fusioniert. Bei der G21V-Mutante handelt es sich um eine hydrolysedefiziente Mutante (Bischoff *et al.*, 1994), so daß diese Mutante die GTP-gebundene Form von Hefe-Ran repräsentiert. Die T26N-Mutante wird hingegen als GDP-gebunden betrachtet (Dasso *et al.*, 1994). Diese Fusionsproteine wurden in L40 $\Delta$ gal4-Zellen transformiert und die Expression der Fusionsproteine mittels Westernblot überprüft. Außerdem wurde durch Vergleich der Wachstumsrate von Zellen, die nur den DNA-Bindungsdomänen-Vektor enthielten bzw. die klonierten GSP1-Plasmide sichergestellt, daß die exprimierten Proteine nicht toxisch für die Zelle sind.

Nach Konjugation dieser Zellen mit den Y187-Zellen, welche mit einer DNA-Bibliothek (auf einem die *GaI4*-Aktivierungsdomäne enthaltendem Plasmid, 'FRYL'-Bibliothek) transformiert waren, wurden diploide Zellen auf Selektivmedium, welches die Aminosäure Histidin nicht enthielt, auf transkriptionelle Aktivität dieses Reportergens getestet. Zur Bestätigung der Zwei-Hybrid-Interaktion bzw. zum Ausschluß von falsch positiven Kolonien wurde anschließend durch Inkubation der Zellen mit X-Gal die jeweilige Aktivität der *lacZ*-Expression (Blaufärbung der Kolonien) geprüft. Die Plasmide der blaugefärbten Zellen wurden mittels PCR amplifiziert, die entsprechende DNA sequenziert und mithilfe von Sequenz-Datenbanken die Kandidaten identifiziert.

Unter den identifizierten Kandidaten (der sogenannten 'Beute ') befanden sich bereits bekannte Ran-bindende Proteine wie Mitglieder der Karyopherin-Familie, das Hefe-Homologe von RanBP1 (Yrb1p) sowie Mog1p (siehe Tabelle 4).

**Tabelle 4: Mittels Zwei-Hybrid-Durchmusterung identifizierte Kandidaten für eine Interaktion mit Hefe-Ran**

Köder	Kleinstes identifiziertes Sequenz-Fragment (Nukleotide)	Beute	Funktion
Gsp1 wt	1-860	KAP123 <sup>A</sup> / YRB4	Karyopherin (Importin)
Gsp1 wt	1-569	CSE1 <sup>A</sup> / KAP109	Karyopherin (Exportin)
Gsp1 wt	599-990	NUP42/ RIP1 <sup>B</sup>	Nucleoporin
Gsp1 wt	1316-4383	NUP159 <sup>B</sup>	Nucleoporin
Gsp1 wt	518-889	SLZ1	Sporulation
Gsp1 wt	221-671	SHE1	Zellzyklus
Gsp1 wt	2969-3619	SEC3	Zell-Polarität
Gsp1 wt	1-1512	FRS2	Proteinsynthese
Gsp1 wt	119-End	YER139C	unbekannt
Gsp1 wt	977-2102	YEL043W	unbekannt
Gsp1 T26N	54-657	MOG1 <sup>a</sup>	Suppressor von Gsp1p-Mutationen
Gsp1 T26N	2793-3117	YPL009C	unbekannt
Gsp1 T26N	1157-2703	YBR225W	unbekannt
Gsp1 G21V	76-606	YRB1 <sup>a</sup>	RanBP1
Gsp1 G21V	242-1323 (≅ aa 81-440)	<b>YGL164C</b> ( <b>YRB30</b> )	unbekannt

A – Bereits bekannte Ran bindende Proteine  
B – Diese Proteine binden vermutlich über Repeats an Hefe-Ran

### 4.3 Aufreinigung der potentiellen neuen Ran-bindenden Proteine aus Hefe

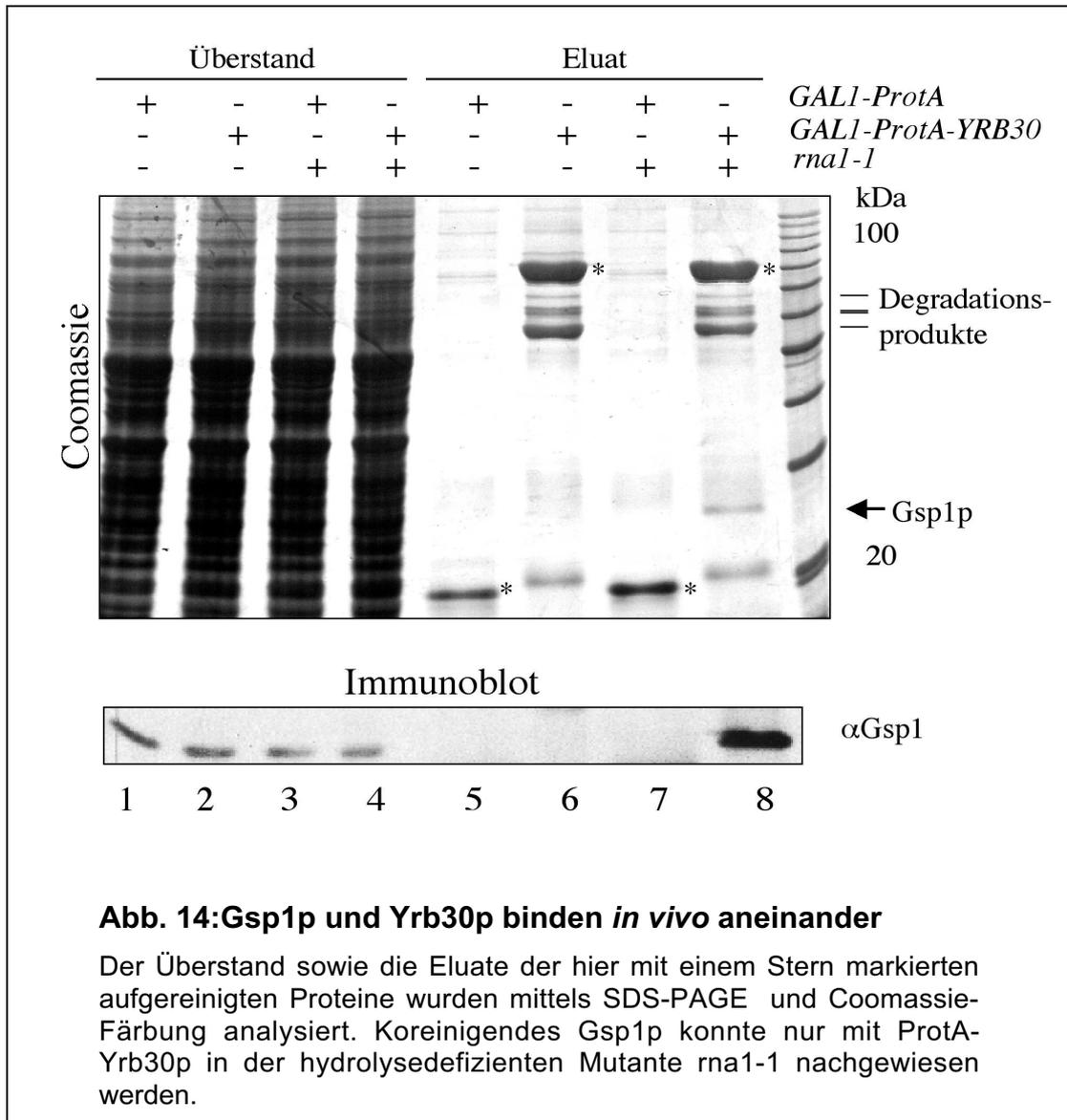
Bei der Zwei-Hybrid-Analyse findet man häufig auch falsche positive Interaktoren. Daher mußte geklärt werden, ob die beobachtete Interaktion in der Zwei-Hybrid-Analyse real ist. Um auf biochemischem Weg eine Bindung an Hefe-Ran (Gsp1p) zu bestätigen, wurden daher Fusionsproteine der Kandidaten mit ProtA unter Kontrolle eines *NOP1* bzw. *GAL1*-Promoters hergestellt und diese an IgG-Sepharose aus Hefe aufgereinigt. Eine Anreicherung von Gsp1p im Eluat konnte jedoch in keinem Fall nachgewiesen werden. Einer der Kandidaten, nämlich Ygl164cp, interagiert in der Zwei-Hybrid-Durchmusterung mit der hydrolysedefizienten G21V-Mutante, so daß zu

vermuten ist, daß dieses Protein spezifisch an die GTP-gebundene Form von Gsp1p bindet. Diese ist möglicherweise im Hefeextrakt unterrepräsentiert, da Gsp1pGTP durch das im Extrakt vorhandene die GTP-Hydrolyse vermittelnde Enzym RanGAP (Rna1p) zu Gsp1pGDP hydrolysiert wird (siehe S. 30). Ein möglicher Komplex zwischen YGL164Cp und Gsp1pGTP sollte jedoch in der temperatursensitiven Mutante *rna1-1* stabilisiert werden. ProtA (als Kontrolle) bzw. an ProtA fusioniertes Ygl164cp wurde deshalb sowohl im RNA1 Wildtyp-Stamm, als auch in der hydrolysedefizienten *rna1-1* Mutante aus Hefe exprimiert. Die Expression der unter Kontrolle des *GAL1*-Promoters stehenden Fusionen wurde dabei durch Zugabe von Galaktose induziert. Nach deren Aufreinigung an IgG-Sepharose wurde durch Säurezugabe (0.5 M Ammoniumacetat pH 3.4) eluiert.

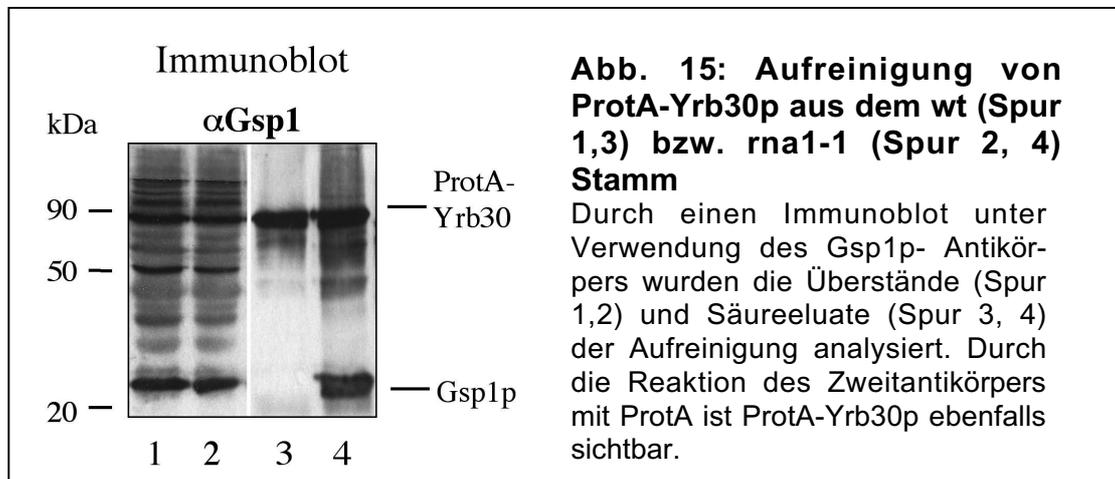
Tatsächlich konnte ein YGL164Cp-Gsp1pGTP-Komplex bei der Affinitätsaufreinigung aus dem *rna1-1* Stamm nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu führte die Aufreinigung des Fusionsproteins im Wildtyp-Stamm bzw. von Protein A alleine nicht zu einer Koreinigung von Hefe-Ran. Dies konnte durch Verwendung eines Gsp1p-Antiserums bestätigt werden (Abb. 14).

Das bislang uncharakterisierte 50 kDa-Hefeprotein Ygl164cp wurde **Yrb30p** (für **Y**east-**R**an **b**inding protein) genannt.

Eine *in vivo*-Interaktion der in der Zwei-Hybrid-Analyse identifizierten Proteine mit Hefe-Ran konnte durch Inhibition der RanGTP-Hydrolyse also lediglich für Yrb30p nachgewiesen werden.



Die entsprechende Aufreinigung von YGL164C unter Kontrolle des kontinuierlich exprimierenden *NOP1*-Promoters führte zu einem ähnlichen Ergebnis:



Auch der umgekehrte Ansatz - die Aufreinigung von Gsp1p und Koreinigung von Yrb30p – wurde zur weiteren Bestätigung der gefundenen Interaktion durchgeführt. Hierzu wurde N-terminal mit GFP fusioniertes Yrb30p zusammen mit einem ProtA-Fusionsprotein von Gsp1p kontinuierlich unter Regulation des *NOP1*-Promoters exprimiert. Dabei wurde Gsp1p (wie in der Zwei-Hybrid-Analyse) entweder in seiner Wildtyp-Form oder als GTP-gebundene G21V-Mutante exprimiert. Die markierten Proteine wurden an IgG-gekoppelter Sepharose aufgereinigt und in diesem Fall durch Inkubation mit geringen Mengen TEV-Protease eluiert. Die Eluate wurden anschließend unter Verwendung eines Gsp1p- bzw. GFP-Antiserums analysiert. Es konnten gleiche Mengen der beiden Formen von Gsp1p aufgereinigt werden. Tatsächlich konnte auf diese Weise Yrb30p mit Gsp1p kogereinigt werden, jedoch effektiv nur im Falle der G21V Mutante (Abb. 16).

**Abb. 16: GFP-Yrb30p kann mit ProtA-Gsp1(G21V)p kogereinigt werden**

Wildtyp Gsp1p bzw. die hydrolysedefiziente G21V-Mutante von Gsp1p wurden als ProtA-Fusionsproteine aus Hefe aufgereinigt und mittels proteolytischem Verdau mit der TEV-Protease eluiert. Durch Immunoblots unter Verwendung des  $\alpha$ Gsp1p- bzw.  $\alpha$ GFP-Antikörpers konnten die zu testenden Proteine nachgewiesen werden.

Dies bestätigt erneut, daß Yrb30p spezifisch die GTP-gebundene Form von Ran bindet. Die GTP-gebundene Wildtyp(wt)-Form von Ran kann hingegen durch im Lysat vorhandenes Rna1p (stimuliert durch Yrb1p) hydrolysiert werden. Die beobachtete dünne Bande von Yrb30p im Eluat der wt-Form von

Gsp1 repräsentiert daher vermutlich den während der Aufreinigung noch verbleibenden Anteil an GTP-gebundenem Ran.

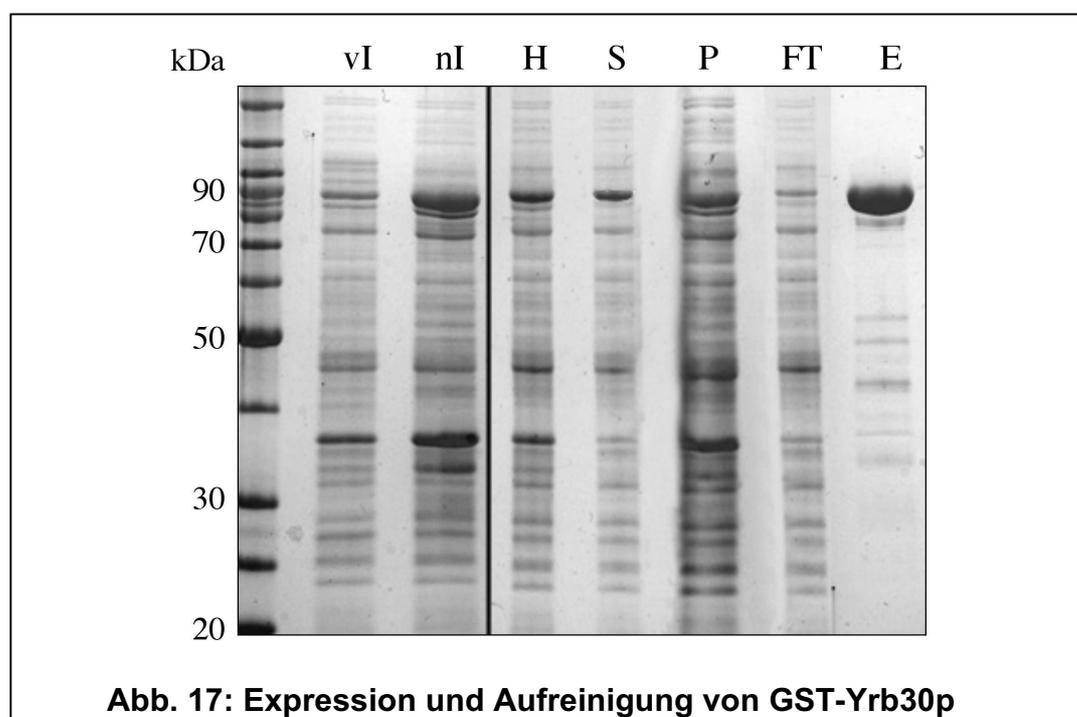
Substöchiometrisches Yrb30p konnte erst durch eine kontinuierliche Koexpression von Yrb30p mittels ProtA-Gsp1p kogereinigt werden.

#### 4.4 *In vitro*-Bindungsstudien zum Test einer direkten Interaktion der Kandidaten mit Gsp1p

Zur Klärung der Frage, ob die *in vivo* beobachtete Interaktion mit Gsp1p eine direkte Bindung widerspiegelt, oder durch ein anderes im Hefeextrakt enthaltenes Protein vermittelt wird, wurden Bindungsstudien unter Verwendung rekombinant hergestellter Proteine durchgeführt. Die hierzu notwendigen Proteine wurden als GST- bzw. His<sub>6</sub>-Fusionsproteine rekombinant exprimiert und an einer Affinitätsmatrix sauber aufgereinigt.

##### 4.4.1 Aufreinigung von GST-Yrb30p und His-Yrb30p

Yrb30p konnte sowohl fusioniert an GST als auch mit His<sub>6</sub> sauber und in guten Ausbeuten aufgereinigt werden. Als Beispiel sei hier die Aufreinigung des ca. 90 kDa großen GST-Yrb30-Fusionsproteins dargestellt:



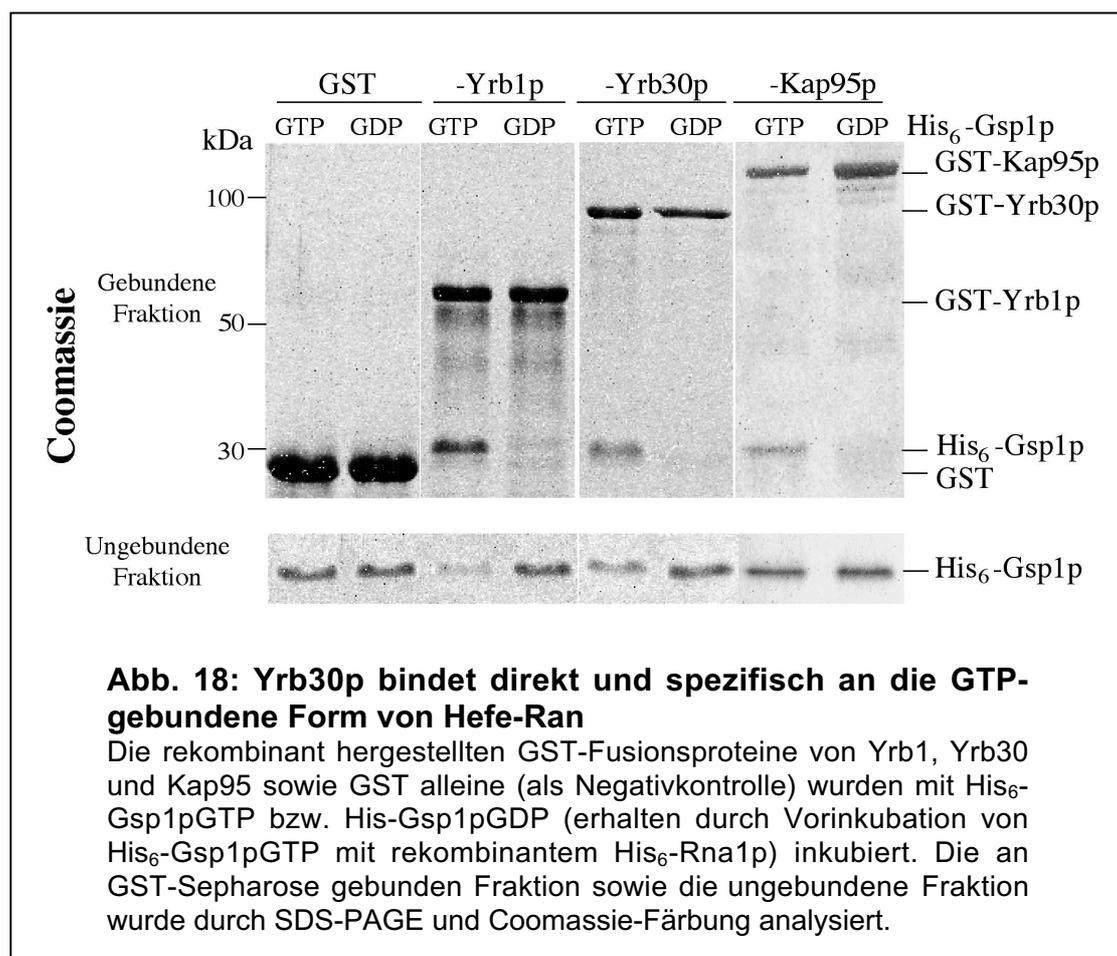
**Abb. 17: Expression und Aufreinigung von GST-Yrb30p**

GST-Yrb30p wurde in *E. coli* exprimiert und an GSH-Sepharose aufgereinigt (vI: Probe vor Induktion, nI: Probe nach Induktion, H: Homogenat, S: Überstand, P: Pellet, FT: Durchfluß, E: eluiertes Protein). Der überwiegende Teil konnte als lösliches Protein gut aufgereinigt werden, ein Teil präzipitierte jedoch auch mit dem abzentrifugierten Niederschlag.

#### 4.4.2 Yrb30p interagiert *in vitro* direkt und spezifisch mit Gsp1pGTP

Hierzu wurde GST-Yrb30p an Glutathion-Sepharose gebunden und mit GTP- bzw. GDP-beladenem His<sub>6</sub>-Gsp1p inkubiert. Als Negativkontrolle diente rekombinant aufgereinigtes GST, als Positivkontrolle GST-Fusionen von Vertretern der beiden Hauptklassen RanGTP-bindender Proteine, nämlich Yrb1p (RanBP1-Familie) bzw. Kap95p (Karyopherine). Eine deutliche Interaktion konnte für Yrb30p, ebenso wie für die beiden RanGTP-bindenden Proteine, nur mit RanGTP, nicht jedoch mit RanGDP nachgewiesen werden. (Abb. 18).

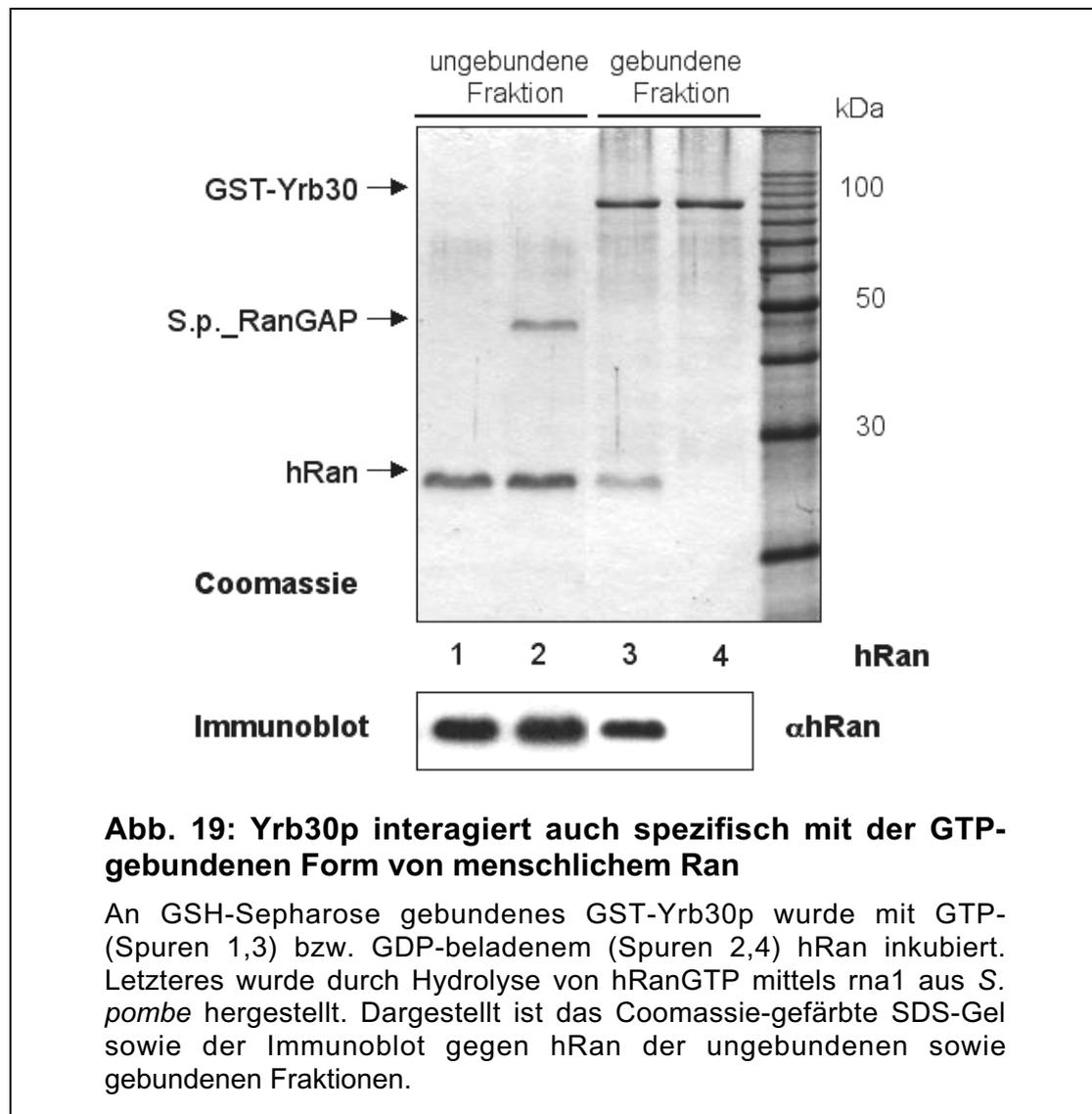
Nachdem für die anderen aus der Zwei-Hybrid-Analyse erhaltenen Kandidaten bereits *in vivo* keine Interaktion mit Gsp1p nachgewiesen werden konnte, zeigten auch die rekombinant hergestellten Proteine dieser Kandidaten keine Bindung an RanGTP oder RanGDP (ohne Bild).



**Abb. 18: Yrb30p bindet direkt und spezifisch an die GTP-gebundene Form von Hefe-Ran**

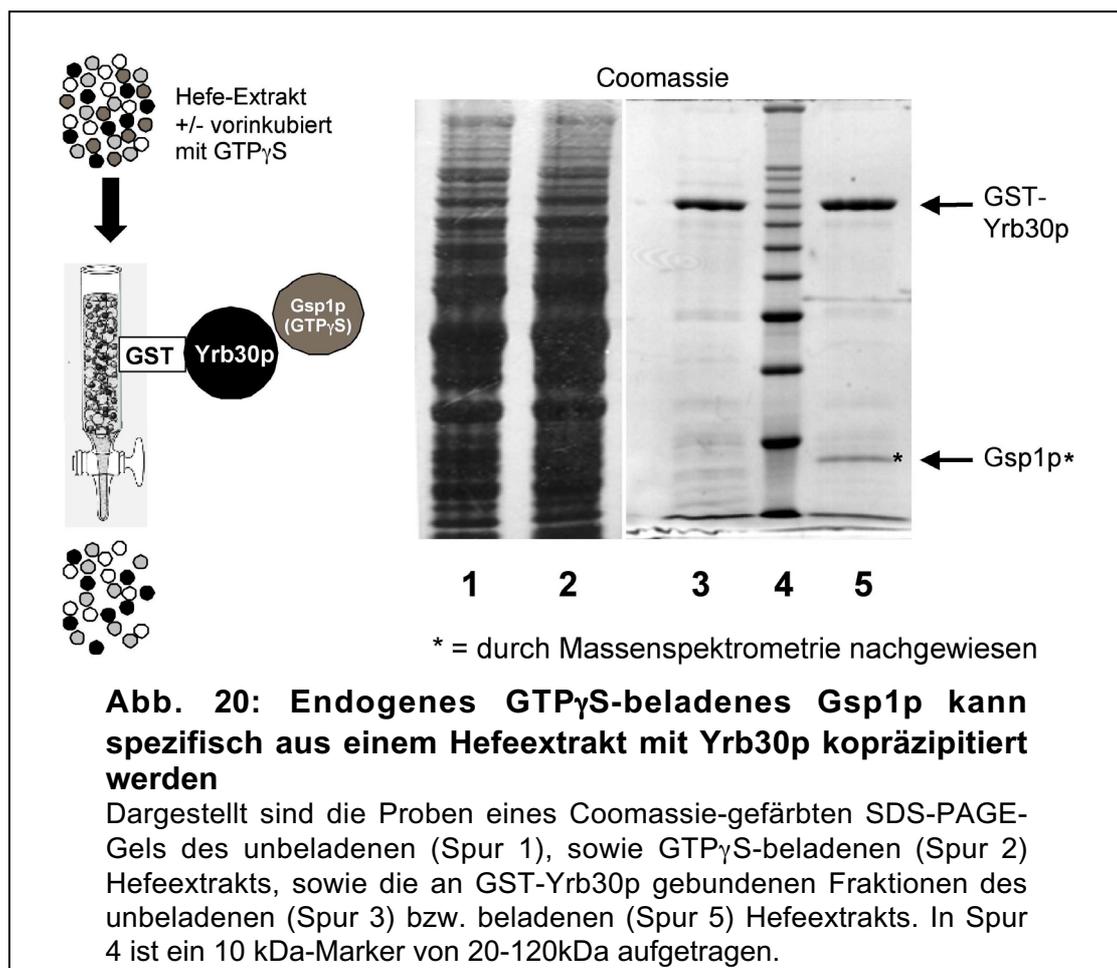
Die rekombinant hergestellten GST-Fusionsproteine von Yrb1, Yrb30 und Kap95 sowie GST alleine (als Negativkontrolle) wurden mit His<sub>6</sub>-Gsp1pGTP bzw. His-Gsp1pGDP (erhalten durch Vorinkubation von His<sub>6</sub>-Gsp1pGTP mit rekombinantem His<sub>6</sub>-Rna1p) inkubiert. Die an GST-Sepharose gebundene Fraktion sowie die ungebundene Fraktion wurde durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

Auch die GTP-gebundene Form von menschlichem Ran, die zu Gsp1p eine sehr große Homologie aufweist, besaß in einer auf gleiche Weise durchgeführten Bindungsstudie die Fähigkeit, an GST-Yrb30p zu binden, während die hydrolysierte Form keine Affinität zu Yrb30p aufwies (Abb. 19).



#### 4.5 Yrb30p interagiert nicht mit anderen GTPasen, außer mit Ran

Generell ist es nicht auszuschließen, daß Yrb30p grundsätzlich an vorhandene GTP-gebundene Proteine, wie z.B. GTPasen, bindet. Um dies auszuschließen und die zelluläre Relevanz dieser Interaktion zu zeigen, wurde untersucht, ob Yrb30p spezifisch mit Gsp1p aus einem Hefeextrakt aufgereinigt werden kann. Hierzu wurde rekombinant hergestelltes GST-Yrb30p an GSH-Sepharose gekoppelt und mit dem löslichen Überstand eines Hefeextraktes inkubiert. Die Bindung GTP-gebundener Proteine würde jedoch verhindert werden, wenn GTP durch im Extrakt vorhandene Enzyme ständig hydrolysiert werden kann. Um daher alle GTPasen im Überstand eines Hefeextraktes stabil in ihrer GTP-gebundenen Form zu erhalten, wurden alle GTPasen durch Vorinkubation des Extraktes mit dem nicht hydrolysierbaren GTP-Analog  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  beladen (siehe Material und Methoden).



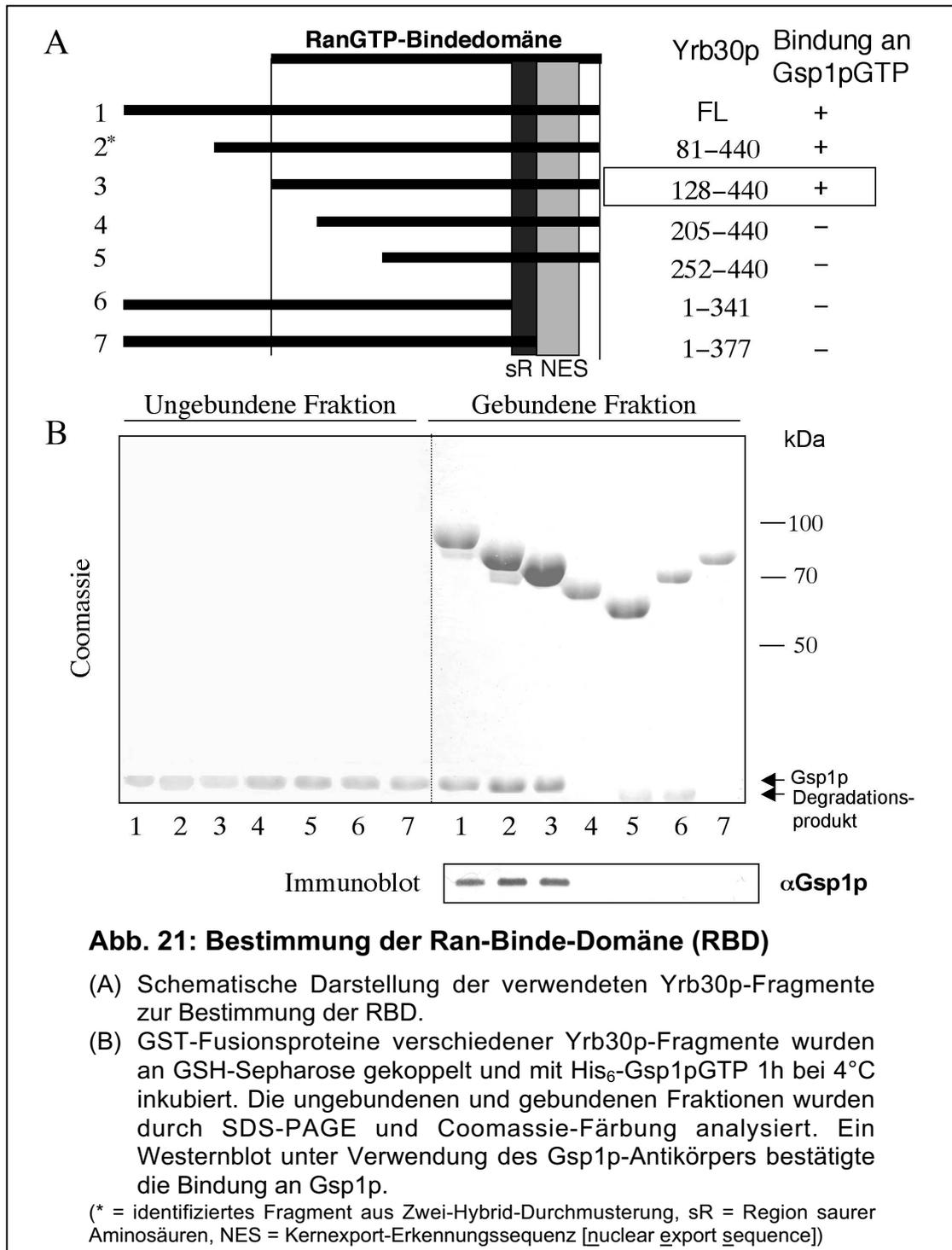
Wie aus Abb. 20 hervorgeht, konnte Gsp1p spezifisch mit Yrb30p aus GTP $\gamma$ S behandeltem Hefeextrakt aufgereinigt werden. Dies wurde durch eine massenspektrometrische Analyse der angegebenen koreinigenden Proteinbande bestätigt. Man kann aus diesem Experiment auf eine sehr hohe spezifische Affinität von Yrb30p für Gsp1pGTP schließen (siehe auch Kapitel 4.8).

#### 4.6 Bestimmung der Ran-Bindedomäne (RBD) auf Yrb30p

Zur Eingrenzung des Sequenzabschnitts, der für die Bindung von Yrb30p an Gsp1p erforderlich ist, wurden verschiedene N- und C-terminal verkürzte rekombinante GST-Fusionsproteine von Yrb30p hergestellt und *in vitro* auf Bindung an His<sub>6</sub>-Gsp1GTP getestet (Abb. 21). C-terminal verkürzte Deletionsmutanten waren nicht mehr in der Lage Gsp1pGTP zu binden, während die Gsp1p-Bindung einiger N-terminaler Deletionsmutanten keine Beeinträchtigung erfuhr. Auf diese Weise konnte die Bindung des in der Zwei-Hybrid-Analyse identifizierten Fragmentes von Yrb30p (aa 81-440) bestätigt werden. Der zur Bindung erforderliche Sequenzbereich konnte außerdem noch weiter auf Aminosäurereste 128-440 eingeschränkt werden.

Somit werden 313 Aminosäuren, mehr als 2/3 des Gesamtproteins, zur direkten Bindung an Gsp1pGTP benötigt.

Vergleicht man die Primärsequenzen der Ran-Bindedomänen von Yrb30p-Homologen (siehe Kapitel 5.3) mit den Primärsequenzen der RBDs der RanBP1-Proteinfamilie bzw. der Karyopherin- $\beta$ -Familie, so können keinerlei konservierte Primärsequenzbereiche festgestellt werden. Dies läßt vermuten, daß es sich bei der identifizierten Ran-Bindedomäne um ein neues Erkennungsmotiv der RanGTP-Bindung handelt.



## 4.7 Charakterisierung der Bindungsstelle von Yrb30p auf RanGTP

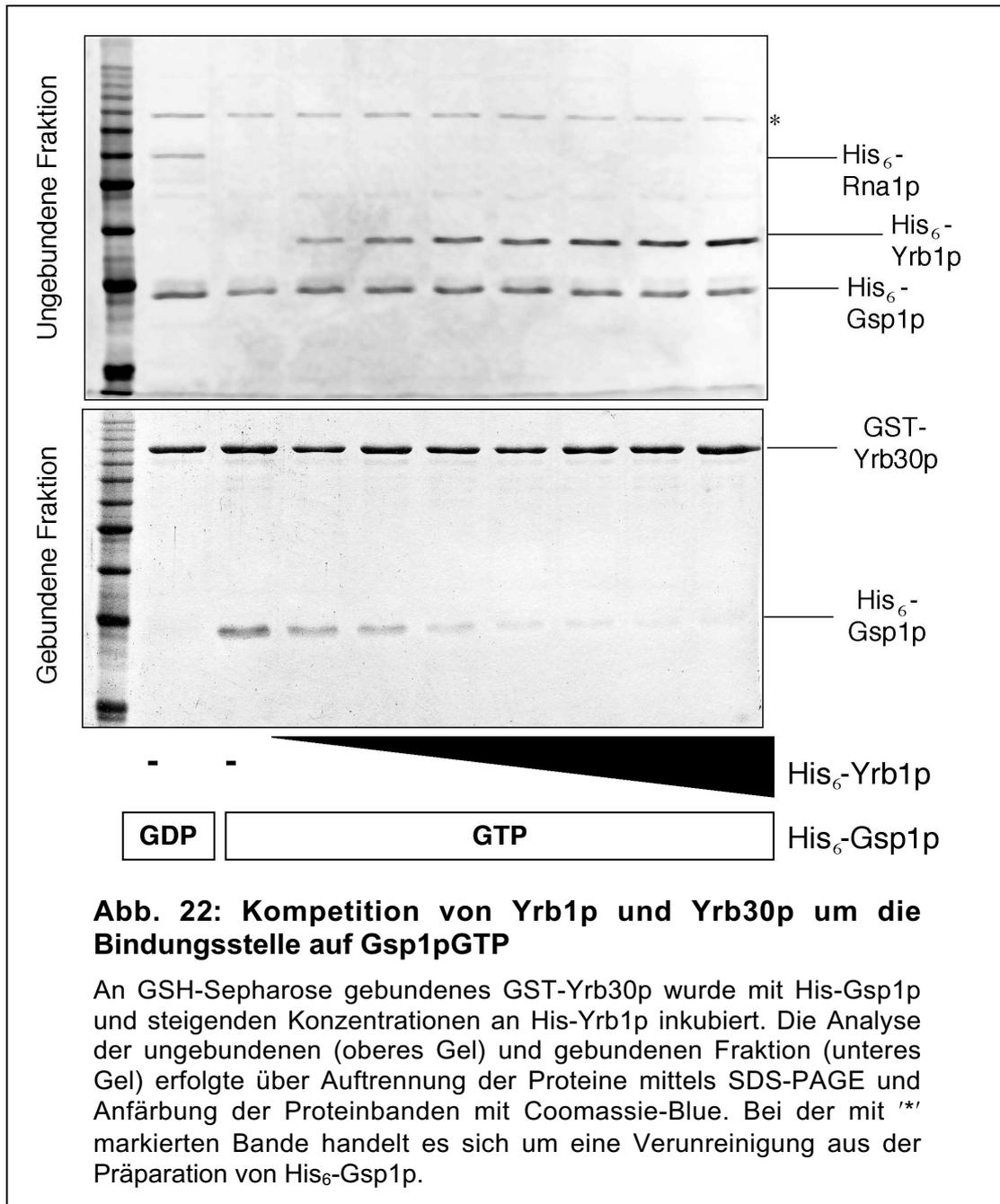
Die fehlende Homologie der Yrb30-RBD zu bisher bekannten RBDs deutet auf eine neue Art der RanGTP-Bindung hin. Zur Bestätigung dieser Vermutung wurde im Folgenden untersucht, ob Yrb30p bezüglich seines Bindungsverhaltens zu Ran und seines Einflusses auf den RanGTPase-Zyklus tatsächlich in keine der beiden Hauptklassen RanGTP-bindender Proteine, der Karyopherine bzw. Mitglieder der RanBP1-Familie eingeordnet werden kann.

Frühere Untersuchungen sowie mittlerweile gelöste Röntgenstrukturen von RanBP1 bzw. Importin- $\beta$  im Komplex mit RanGTP (Chook und Blobel, 1999; Vetter *et al.*, 1999; Seewald *et al.*, 2002) haben gezeigt, daß Importin- $\beta$  als Vertreter der Karyopherine und RanBP1 als Vertreter der RanBP1-Familie an unterschiedliche Oberflächen von RanGTP binden. Um eine Vorstellung des von Yrb30p erkannten Epitops auf Gsp1p zu erhalten, wurden im Folgenden Vertreter der zwei Hauptklassen RanGTP-bindender Proteine auf Konkurrenz mit Yrb30p bzw. Ausbildung eines trimeren Komplexes getestet.

### 4.7.1 Yrb1p und Yrb30p konkurrieren um die Bindungsstelle auf Ran

Zur Klärung der Frage, ob andere RanGTP-bindende Proteine eine identische Bindungsstelle auf Gsp1p besitzen, wurde getestet, ob Yrb30p und Yrb1p (als Vertreter der RanBP1-Proteinfamilie) um die Bindung an Gsp1pGTP konkurrieren. Hierzu wurde GST-Yrb30p an Glutathione-Sepharose gekoppelt und mit einem Gemisch aus His<sub>6</sub>-Gsp1p und steigenden Konzentrationen von His<sub>6</sub>-Yrb1p inkubiert. Wie aus Abb.22 ersichtlich, nimmt die Bindung von Gsp1pGTP an Yrb30p mit zunehmenden Mengen an Yrb1p ab. Yrb1p ist also in der Lage, Yrb30p von Gsp1pGTP zu verdrängen.

Diese Konkurrenz von Yrb1p und Yrb30p läßt darauf schließen, daß diese Proteine eine überlappende oder sogar identische Bindungsstelle auf Gsp1pGTP besitzen.

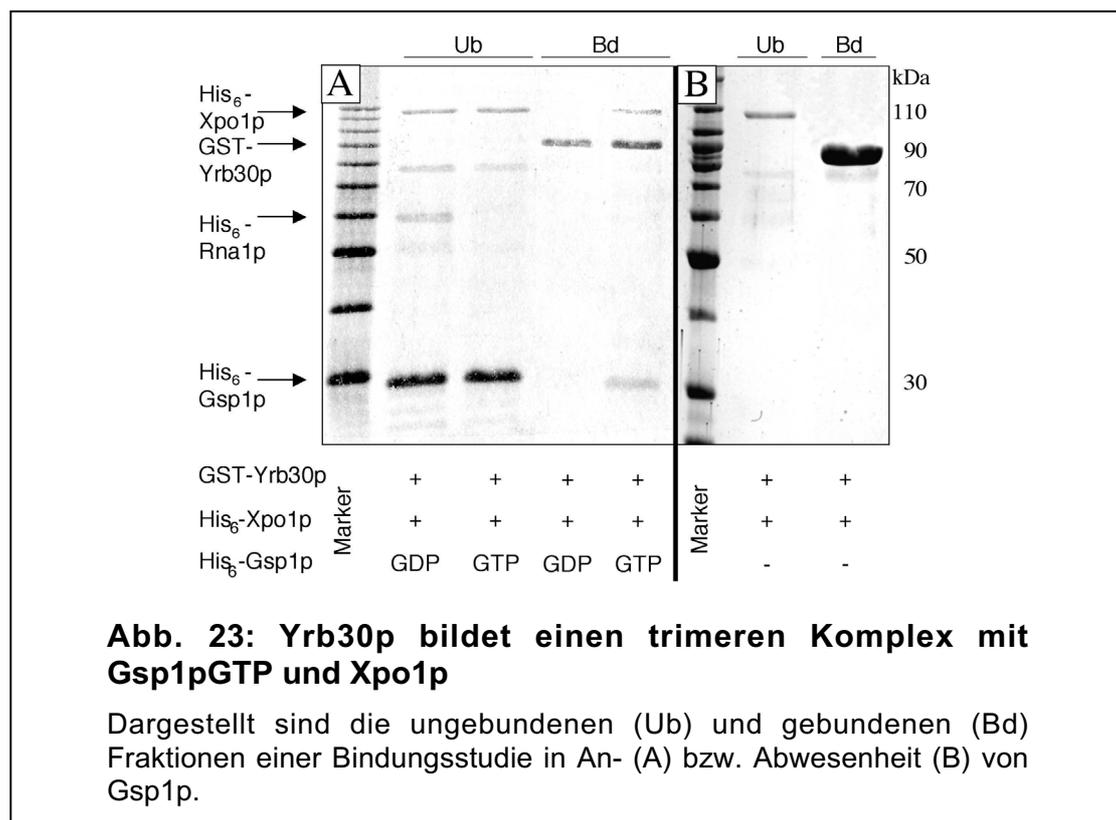


**Abb. 22: Konkurrenz von Yrb1p und Yrb30p um die Bindungsstelle auf Gsp1pGTP**

An GSH-Sepharose gebundenes GST-Yrb30p wurde mit His-Gsp1p und steigenden Konzentrationen an His-Yrb1p inkubiert. Die Analyse der ungebundenen (oberes Gel) und gebundenen Fraktion (unteres Gel) erfolgte über Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE und Anfärbung der Proteinbanden mit Coomassie-Blue. Bei der mit '\*' markierten Bande handelt es sich um eine Verunreinigung aus der Präparation von His<sub>6</sub>-Gsp1p.

#### 4.7.2 Yrb30p kann trimere Komplexe mit Ran und Karyopherinen bilden

Nachdem gezeigt werden konnte, daß Yrb30p ähnlich an Ran bindet wie Yrb1p, stellte sich die Frage, ob dieses neue RanGTP-bindende Protein auch die Fähigkeit zur Ausbildung trimerer Komplexe mit den Karyopherinen besitzt. Hierzu wurde an Glutathion-Sepharose gebundenes GST-Yrb30p mit His<sub>6</sub>-Gsp1p in GTP- bzw. GDP-gebundener Form sowie His<sub>6</sub>-Xpo1p bzw. His<sub>6</sub>-Kap95p (Importin-β) inkubiert. Genauso wie Yrb1p konnte Yrb30p zusammen mit Gsp1pGTP sowohl mit dem Exportin Xpo1p (Abb. 23), als auch mit dem Importin Kap95p (Abb. 24) trimere Komplexe bilden. Eine direkte Bindung von Yrb30p an Xpo1p bzw. Kap95p in Abwesenheit von Gsp1pGTP wurde hingegen nicht beobachtet.





**Abb. 24: Yrb30p formt in Gegenwart von Gsp1pGTP auch mit Kap95p einen trimeren Komplex**

Entsprechende Komplexe konnten *in vitro* auch mit dem Exportin Msn5p und dem Importin Kap104p nachgewiesen werden..

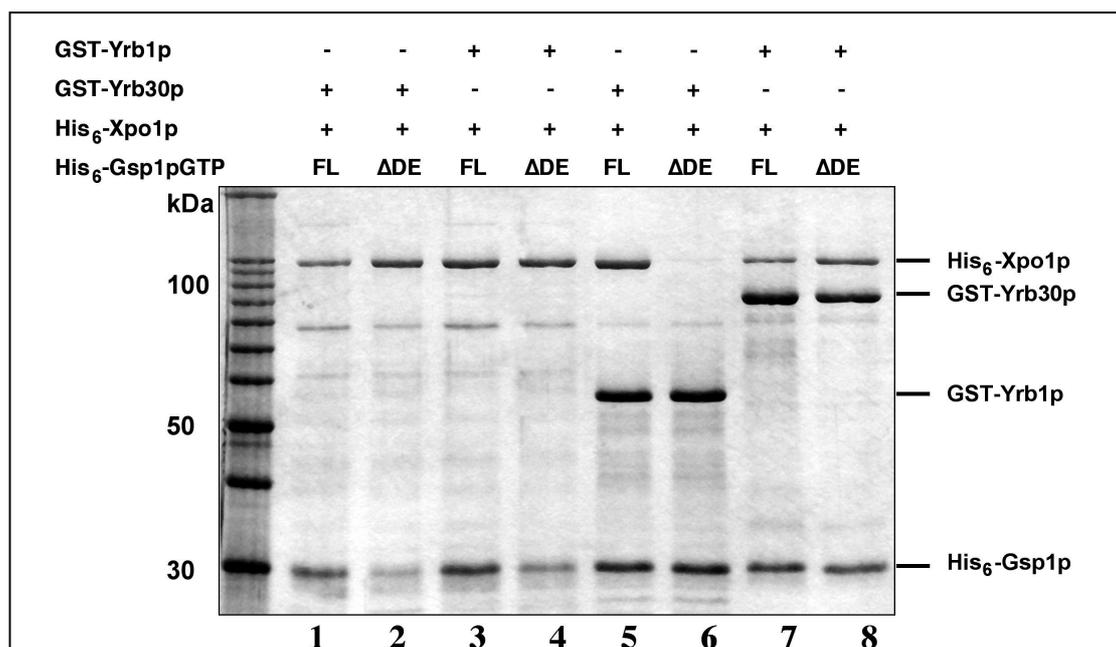
Festzuhalten bleibt also das Ergebnis, daß Yrb30p mit Karyopherinen und RanGTP trimere Komplexe bilden kann und somit eine andere Bindungsfläche auf Gsp1p besitzt. Die bisherigen Ergebnisse zur Bestimmung der Bindungsstelle von Yrb30p auf Gsp1p deuten also darauf hin, daß Yrb30p in seinen Bindungseigenschaften der RanBP1-Familie näher steht, als den Karyopherinen.

#### **4.7.3 Der trimere Komplex aus dem Exportin Xpo1p, Gsp1p und Yrb30p unterscheidet sich von dem analogen Komplex mit Yrb1p**

Das C-terminale Ende der Sequenz von Ran weist einen extrem hohen Anteil saurer Aminosäuren auf. Interessanterweise sind diese nur wenigen Aminosäuren für die Funktionalität von Ran essentiell. Die Röntgenstruktur von Ran zeigt, daß in der GTP-gebundenen Form diese Aminosäuren anders ausgerichtet sind, als in der GDP-gebundenen Form (siehe Abb. 3). In der GDP-gebundenen Form binden diese Aminosäurereste intramolekular an basische Aminosäuren (aa 139-142 von Ran) und stabilisieren so die GDP-gebundene (Richards et al., 1995). Zudem wird die Bindung an Importin- $\beta$  inhibiert (J.

Kuhlmann, unveröffentlichte Daten). In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, daß die entsprechenden Aminosäurereste in Gsp1p (DEDDADL) zur Ausbildung eines Yrb1p-Gsp1(GTP)-Xpo1p Komplexes erforderlich sind, während ein komplementärer Komplex mit Importin- $\beta$  ähnlichen Transportfaktoren bzw. klassischen NES-enhaltenden Proteinen diese sauren Aminosäuren nicht benötigt (Maurer et al., 2001). Dieser Sequenzbereich übernimmt also wichtige regulatorische Funktionen.

Durch entsprechende Bindungsstudien wurde festgestellt, daß Yrb30p diese sechs C-terminalen Aminosäuren zur Ausbildung des Komplexes bemerkenswerterweise nicht benötigt (siehe Abb.25), siehe auch Diskussion). Dies zeigt, daß Yrb30p und Yrb1p sich zwar in ihren Bindungseigenschaften zu RanGTP ähneln, daß es aber auch Unterschiede in der Art der Bindung gibt.



**Abb. 25: Yrb30p bildet einen trimeren Komplex mit Xpo1p und Gsp1p, der sich von einem homologen Komplex mit Yrb1p unterscheidet**

GST-Yrb30p bzw. GST-Yrb1p wurden an GSH-Sepharose gebunden und mit His<sub>6</sub>-Xpo1p sowie der GTP-gebundenen Form von His<sub>6</sub>-Gsp1wt bzw. der C-terminal deletierten Form His<sub>6</sub>-Gsp1 $\Delta$ DE inkubiert. Die ungebundenen Fraktionen (Spur 1-4) sowie die gebundenen Fraktionen (Spur 5-8) wurden durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert.

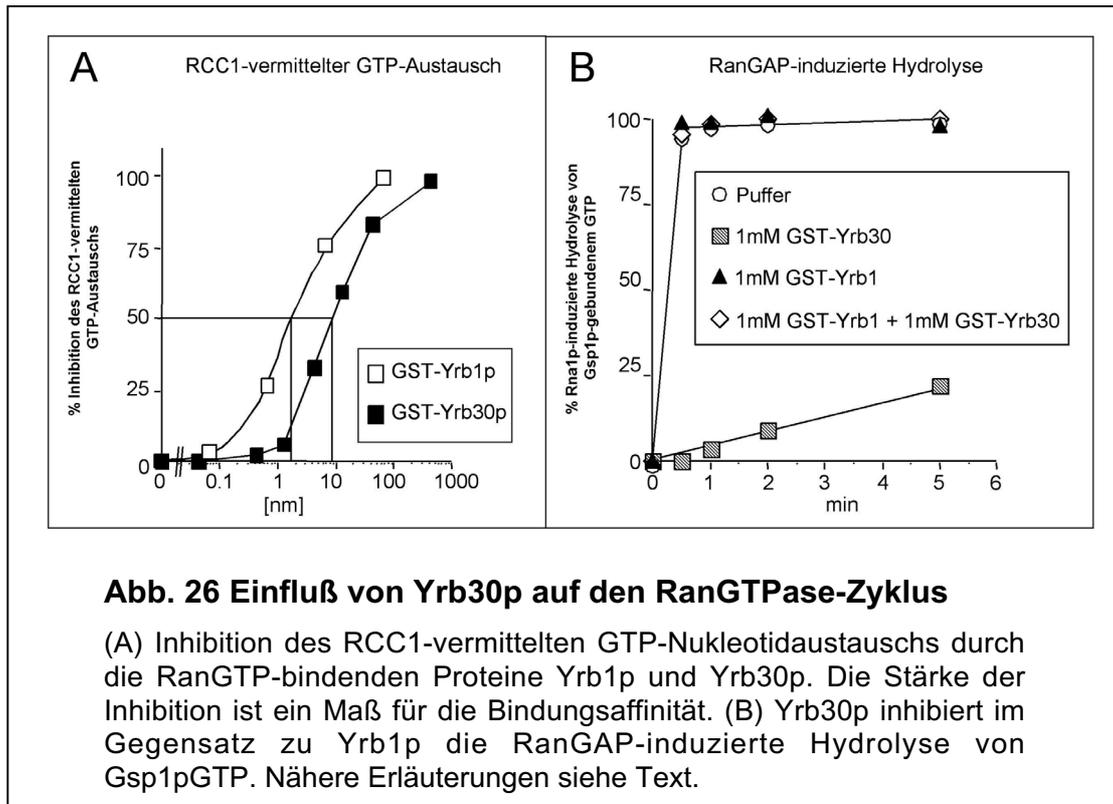
#### 4.8 Beeinflussung des RanGTPase-Zyklus durch Yrb30p

Als RanGTP-bindendes Protein hat Yrb30p wahrscheinlich auch direkten Einfluß auf den RanGTPase-Zyklus. Daher wurde in Zusammenarbeit mit Dr. F. Ralf Bischoff (DKFZ, Heidelberg) untersucht, wie sich Yrb30p auf die intrinsische GTPase-Aktivität von Ran, auf den RCC1-vermittelten Nukleotid-Austausch auf Ran, sowie auf die RanGAP-induzierte GTP-Hydrolyse von RanGTP auswirkt.

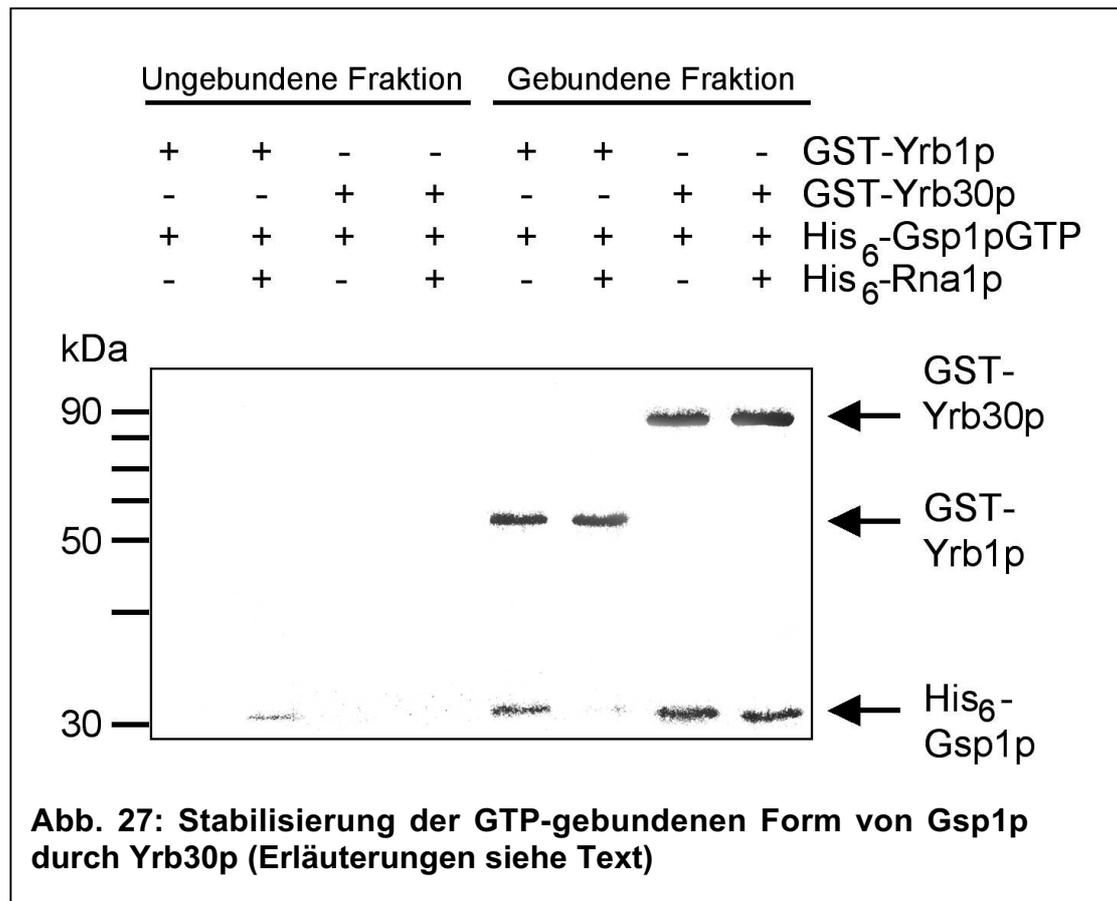
Daher wurde radioaktiv markiertes Ran[ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]GTP (sowie als Kontrolle Ran[ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]GDP) mit Yrb30p bei 25°C vorinkubiert und anschließend GDP sowie EDTA (zur Messung der intrinsischen GTPase-Aktivität) bzw. RCC1 (zur Messung des GTP-Austausches) zugegeben. Die verbliebene Ran-gebundene Radioaktivität wurde dann mittels eines Filterassays bestimmt (Bischoff und Postingl, 1991). Während die intrinsische GTPase-Aktivität von Ran nur geringfügig zunimmt (ohne Bild), inhibiert Yrb30p, genauso wie andere RanGTP-bindende Proteine, den GTP-Austausch durch das nukleäre Enzym RCC1 (Abb. 26). Aus der Stärke der Inhibition kann der Affinitätskoeffizient von Yrb30p zu RanGTP ermittelt werden (50% Inhibition des RCC1-vermittelten GTP-Austausches). Während die Affinitätskonstante von Yrb1p zu RanGTP zu 1-2 nM ermittelt wurde, liegt der Affinitätskoeffizient für Yrb30p zu RanGTP bei ca. 8-10 nM, was eine starke Interaktion dieser Proteine widerspiegelt.

Die Messung der RanGAP-vermittelten Hydrolyse von RanGTP erfolgte durch Inkubation der RanGTP-bindenden Proteine mit Rna1p und Zugabe von radioaktiv markiertem RanGTP. Die verbliebene Ran-gebundene Radioaktivität der in gewissen Zeitabschnitten entnommenen Aliquote wurde wiederum mittels Filterassay bestimmt. Durch das im Experiment zugesetzte Rna1p (40 nM) war die Hydrolyse nach bereits 30 Sekunden fast vollständig abgeschlossen. Aufgrund der relativ hohen Rna1p-Konzentration konnte die aktivierende Wirkung von Yrb1p auf die Rna1p-vermittelte RanGTP-Hydrolyse in diesem Experiment nicht beobachtet werden. Interessanterweise wirkt Yrb30p - im Gegensatz zu Yrb1p - als Guanosin-Dissoziations-Inhibitor (GDI)

(Abb. 26). In Gegenwart äquimolarer Konzentrationen von Yrb1p wird der inhibitorische Einfluß von Yrb30p jedoch fast vollständig zurückgedrängt.



Zur Bestätigung dieser inhibitorischen Wirkung von Yrb30p auf die RanGAP-vermittelte GTP-Hydrolyse wurden Bindungsexperimente mit rekombinanten GST-Fusionsproteinen an GSH-Sepharose durchgeführt. Hierzu wurde GST-Yrb30p bzw. GST-Yrb1p an GSH-Sepharose gebunden und mit His<sub>6</sub>-Gsp1pGTP inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden nach einem Waschschrift in Puffer mit bzw. ohne 0.5 µl His<sub>6</sub>-Rna1p für 12 Minuten bei 4°C inkubiert. Während im Fall von Yrb1p eine fast vollständige Freisetzung von Gsp1p durch erfolgte Hydrolyse beobachtet wurde, konnte Rna1p in Gegenwart von Yrb30p innerhalb dieser kurzen Zeit RanGTP nicht hydrolysieren (Abb. 27), was in Übereinstimmung mit dem vorangegangenen Experiment ist. Physiologisch könnte diese Verlangsamung der RanGAP-vermittelten Hydrolyse durch Yrb30p sehr interessant sein. Ein stabilisierender Einfluß auf einen Exportkomplex würde eine sofortige Dissoziation des Komplexes in der Nähe der Kernpore nach Eintritt ins Zytoplasma verhindern bzw. hinauszögern.

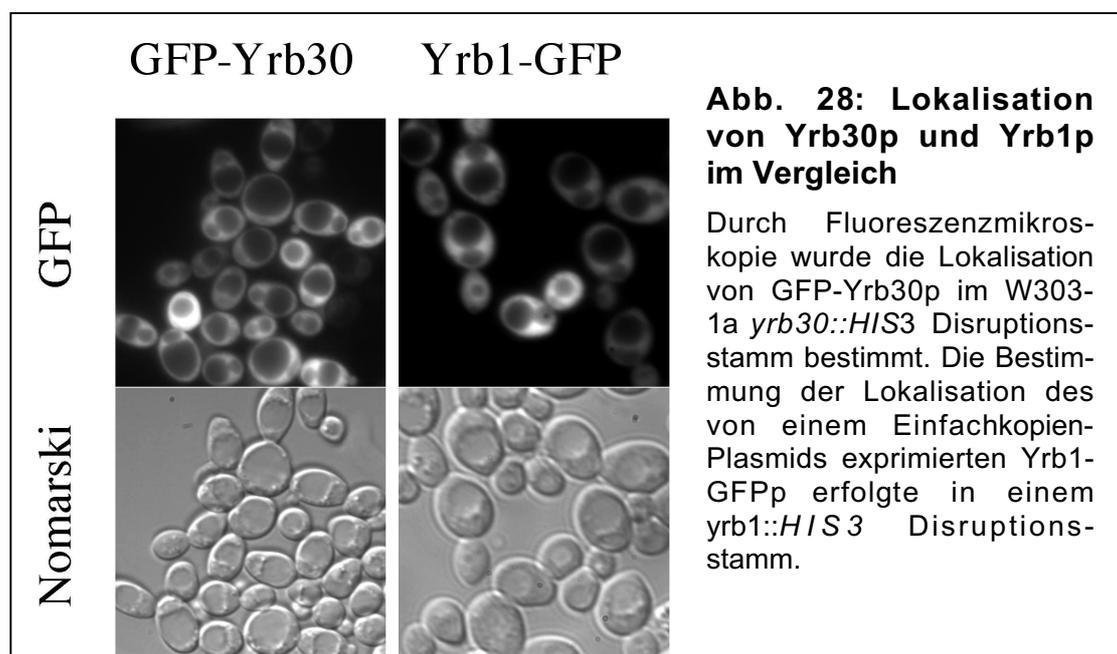


## 4.9 Lokalisation von Yrb30p

### 4.9.1 Unter Wildtypbedingungen lokalisiert Yrb30p ausschließlich im Zytoplasma

Um die zelluläre Lokalisation von Yrb30p unter Normalbedingungen zu bestimmen, wurden Fusionsproteine von Yrb30p mit dem Grün-fluoreszierenden Protein (GFP) hergestellt und in *yrb30::HIS3*-Zellen exprimiert. Da keine Überprüfung der Funktionalität dieser Proteine möglich war (außer durch die bereits bestätigte Ran-Bindung, siehe Aufreinigung von ProtA-Gsp1p bei Koexpression von GFP-Yrb30p), wurde Yrb30p sowohl N-terminal, als auch C-terminal mit GFP fusioniert. Dabei wurden die Fusionsproteine meist von Multikopie-Plasmiden (2 $\mu$ ) exprimiert. Bei Expression des Fusionsproteins unter Kontrolle des eigenen Promotors konnte nur ein schwaches GFP-Signal

nachgewiesen werden. Daher wurde die Expression des GFP-Fusionsproteins meist unter Kontrolle des stärkeren und kontinuierlich exprimierenden *NOP1*-Promoters gestellt. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde die Lokalisation dieser Fusionsproteine sowohl in einem Wildtyp, als auch in einem *yrb30* Disruptionsstamm bestimmt. In allen Fällen konnte eine homogene zytoplasmatische Lokalisation von Yrb30p nachgewiesen werden. Der Kern und die Vakuole bleiben hingegen von Yrb30p ausgespart (siehe Abb. 28). Eine genomisch C-terminal mit GFP fusionierte Version von Yrb30p wies eine identische Lokalisation auf.

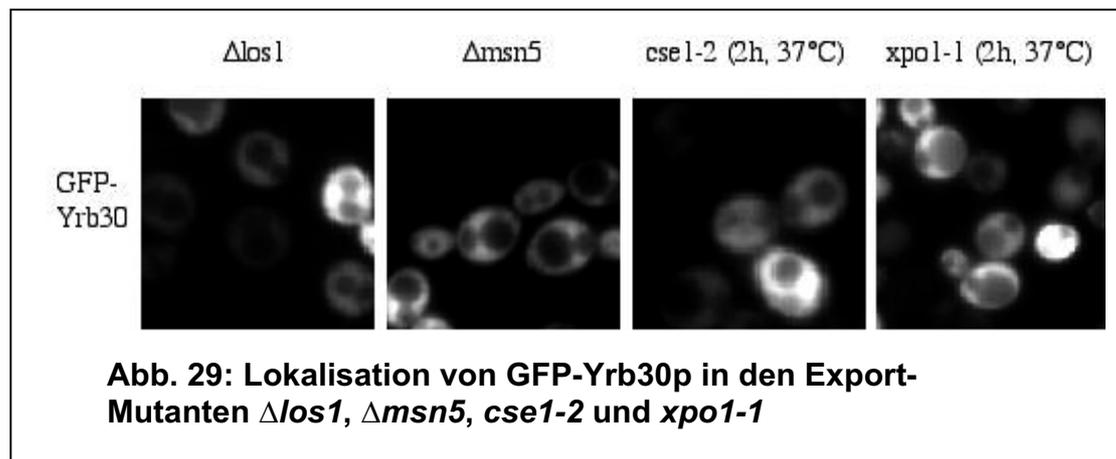


Untersucht man die Lokalisation von Hefe-Ran (Gsp1p) unter Wildtypbedingungen, so findet man Ran vorwiegend im Kern. Der im Kern vorhandene Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (RanGEF, Prp20p) wandelt dabei RanGDP in RanGTP um. Deshalb würde man erwarten, daß ein RanGTP-bindendes Protein eine nukleäre Lokalisation aufweist. Das mit der GTP-gebundenen Form von Gsp1p interagierende Protein Yrb1p besitzt allerdings wie Yrb30p eine ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation (siehe Abb. 28). Diese ist erklärbar durch die Funktion von Yrb1p, nämlich die Aktivierung der RanGAP-vermittelten Hydrolyse im Zytoplasma, die insbesondere bei der Dissoziation von Export-Komplexen eine wichtige Rolle spielt. Allerdings konnte gezeigt werden, daß Yrb1p kontinuierlich zwischen dem Zytoplasma

und dem Kern hin und her wandert und vermutlich im Komplex mit Gsp1pGTP und Xpo1p aus dem Kern exportiert wird (Künzler *et al.*, 2000). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im Folgenden überprüft, ob dies für Yrb30p ebenfalls zutrifft.

#### 4.9.2 Yrb30p wird durch Xpo1p vermittelt exportiert

Zur Überprüfung eines möglichen Pendelns von Yrb30p zwischen dem Kern und dem Zytoplasma wurde die Lokalisation von GFP-Yrb30p in verschiedenen Export-Mutanten bestimmt. Es konnte jedoch keinerlei Änderung der ausschließlich zytoplasmatischen Lokalisation festgestellt werden (siehe Abb.29).



Auch in den in der folgenden Tabelle aufgelisteten anderen Transportmutanten bzw. unter veränderten Bedingungen wurde keine Mislokalisierung von GFP-Yrb30p beobachtet (Tabelle 5).

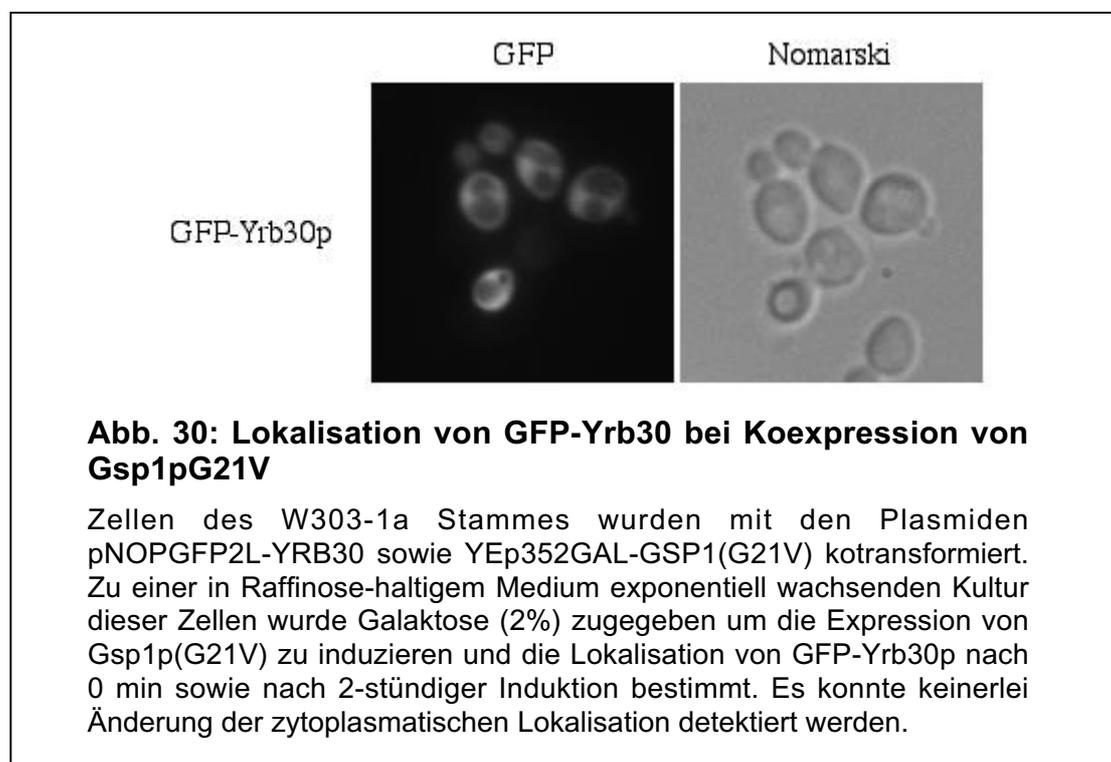
**Tabelle 5: Die Lokalisation von GFP-Yrb30p wurde in verschiedenen Transportmutanten und unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen untersucht**

Mutante	biologische Funktion
$\Delta$ yrb30	?
$\Delta$ yrb30/ $\Delta$ yrb30 diploid	?
xpo1-1	Exportin (s. Tabelle 1)
xpo1-1/xpo1-1 diploid	Exportin (s. Tabelle 1)
cse1-2	Exportin (s. Tabelle 1)
$\Delta$ los1	Exportin (s. Tabelle 1)
$\Delta$ msn5	Exportin (s. Tabelle 1)
$\Delta$ pdr6	Importin (s. Tabelle 1)
$\Delta$ sxm1	Importin (s. Tabelle 1)
rna1-1	RanGAP
prp20-1	RanGEF
$\Delta$ mog1	Nukleotid-Austausch auf Ran, Ablösung von RanGDP von NTF2,
yrb1-51	GTPase-aktivierendes Protein
$\Delta$ rip1	Nukleoporin
$\Delta$ nup188	Nukleoporin

Wachstumsbedingung
bei Koexpression von Gsp1G21V
nach Aktivierung des Pheromon-Signalweges durch Zugabe von $\alpha$ -Faktor
während der Sporulation

Als Beispiel sei hier die Lokalisation von GFP-Yrb30p im wt-Stamm bei Koexpression der GTP-gebundenen Hydrolyse-defizienten Gsp1G21V-Mutante dargestellt (Abb. 30).

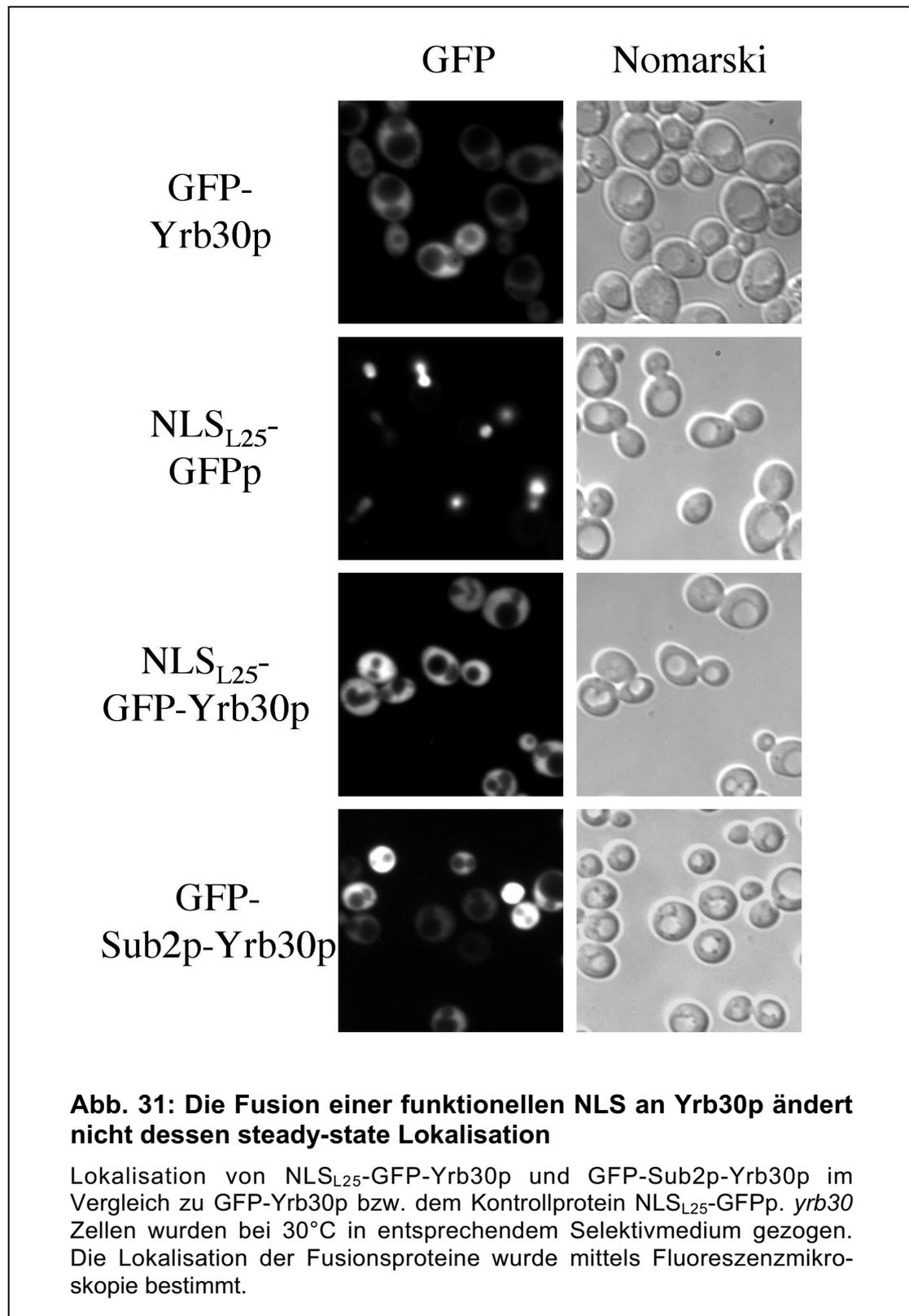


Diese Ergebnisse ließen vermuten, daß Yrb30p das zytoplasmatische Kompartiment nicht verläßt. Ein möglicher Grund hierfür könnte eine Toxizität von Yrb30p innerhalb des nukleären Kompartiments sein. Zur Überprüfung dieser These wurde Yrb30p mit einer externen NLS versehen, die Yrb30p in den Kern bringen sollte. Hierbei wurde auf die NLS des ribosomalen Proteins L25 zurückgegriffen. Nachdem mithilfe eines Westernblots unter Verwendung des GFP-Antikörpers bestätigt werden konnte, daß die gewünschten Fusionsproteine exprimiert wurden und das erwartete Molekulargewicht aufwiesen (ohne Bild), wurde deren Lokalisation im Wildtyp und yrb30-Disruptionsstamm untersucht.

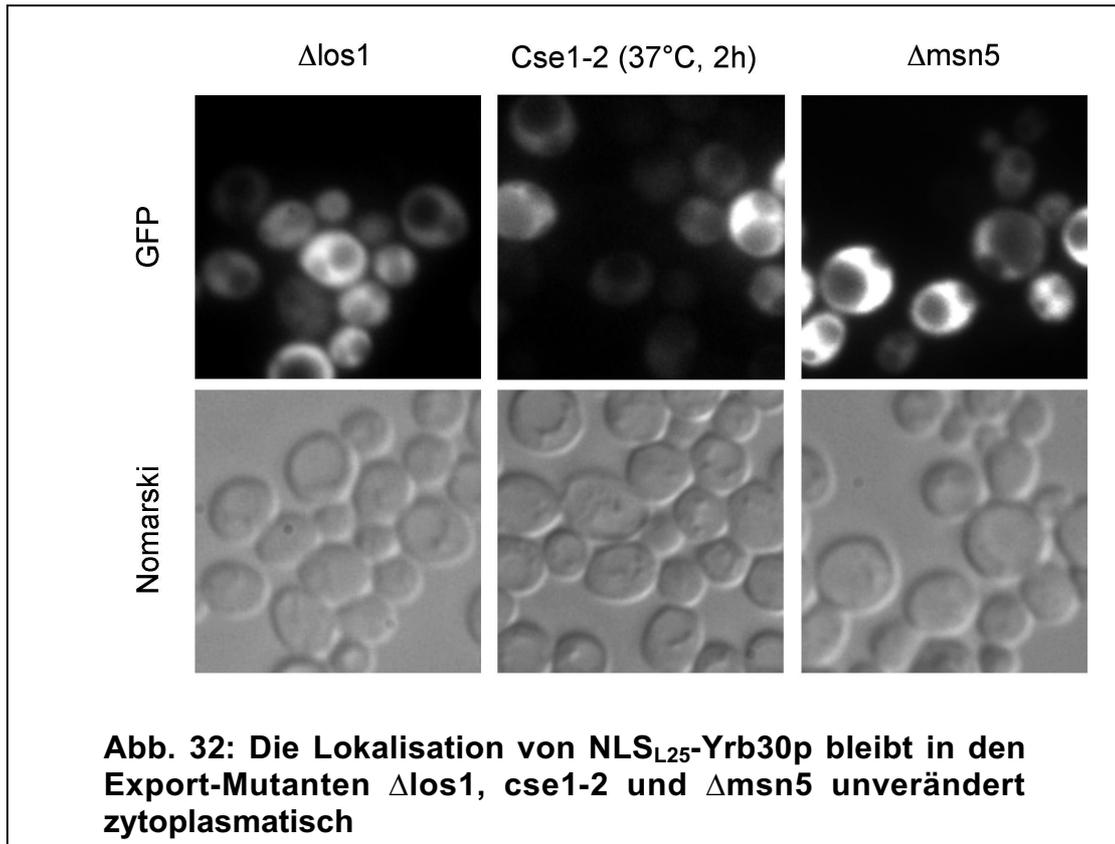
Als Kontrollplasmid diente ein Konstrukt, bei dem der ORF von *YRB30* in umgekehrter Orientierung in das Ausgangsplasmid inkloniert wurde. Da dies zu einem Abbruch der Translation schon nach 4 Aminosäuren führt, entspricht dieses Konstrukt praktisch einem NLS<sub>L25</sub>-GFP-Fusionsprotein.

Während das Produkt des Kontrollplasmids wie erwartet im Kern akkumulierte, wies das Yrb30-Fusionsprotein mit der funktionellen NLS von L25 überraschenderweise eine ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation auf, die sich nicht von der des GFP-Fusionsproteins ohne NLS unterschied (Abb. 30). Auch der Austausch der NLS von L25 durch den ORF des essentiellen nukleären Splicing-Faktors Sub2p zeigte keine Änderung dieser zellulären Verteilung (ohne Bild).

Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist, daß Yrb30p im Zytoplasma festgehalten wird und daher, trotz NLS, nicht in den Kern importiert werden kann. Andererseits würde ein Pendel-Mechanismus, bei dem das Protein zwar importiert, unmittelbar danach allerdings sehr effizient aus dem Kern wieder exportiert würde, zum gleichen Ergebnis führen.

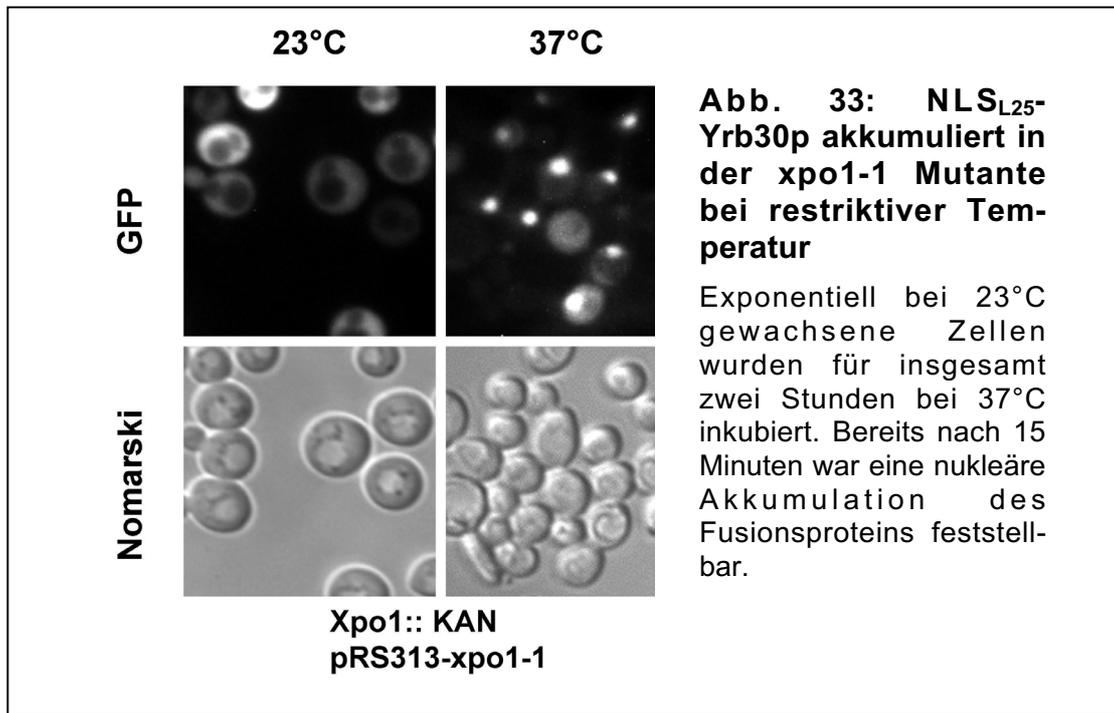


Um zwischen diesen zwei Möglichkeiten unterscheiden zu können, wurde die Lokalisation dieses Fusionsproteins mit externer NLS in den entsprechenden Export-Mutanten untersucht.

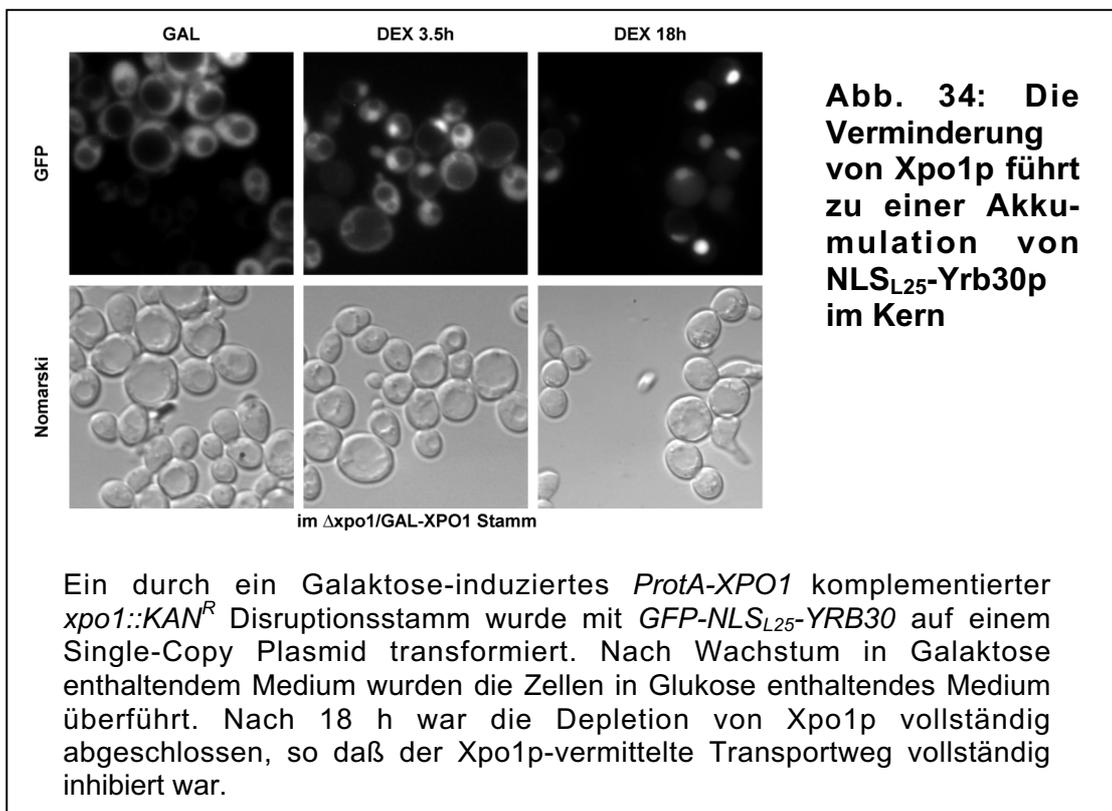


Sowohl in der  $\Delta los1$ -Mutante, als auch in der  $\Delta msn5$ -Mutante wurde keine Änderung des zytoplasmatischen Signals beobachtet, ebenso nicht in der thermosensitiven cse1-2-Mutante nach zweistündiger Inkubation der Kultur bei 37°C (Abb. 32).

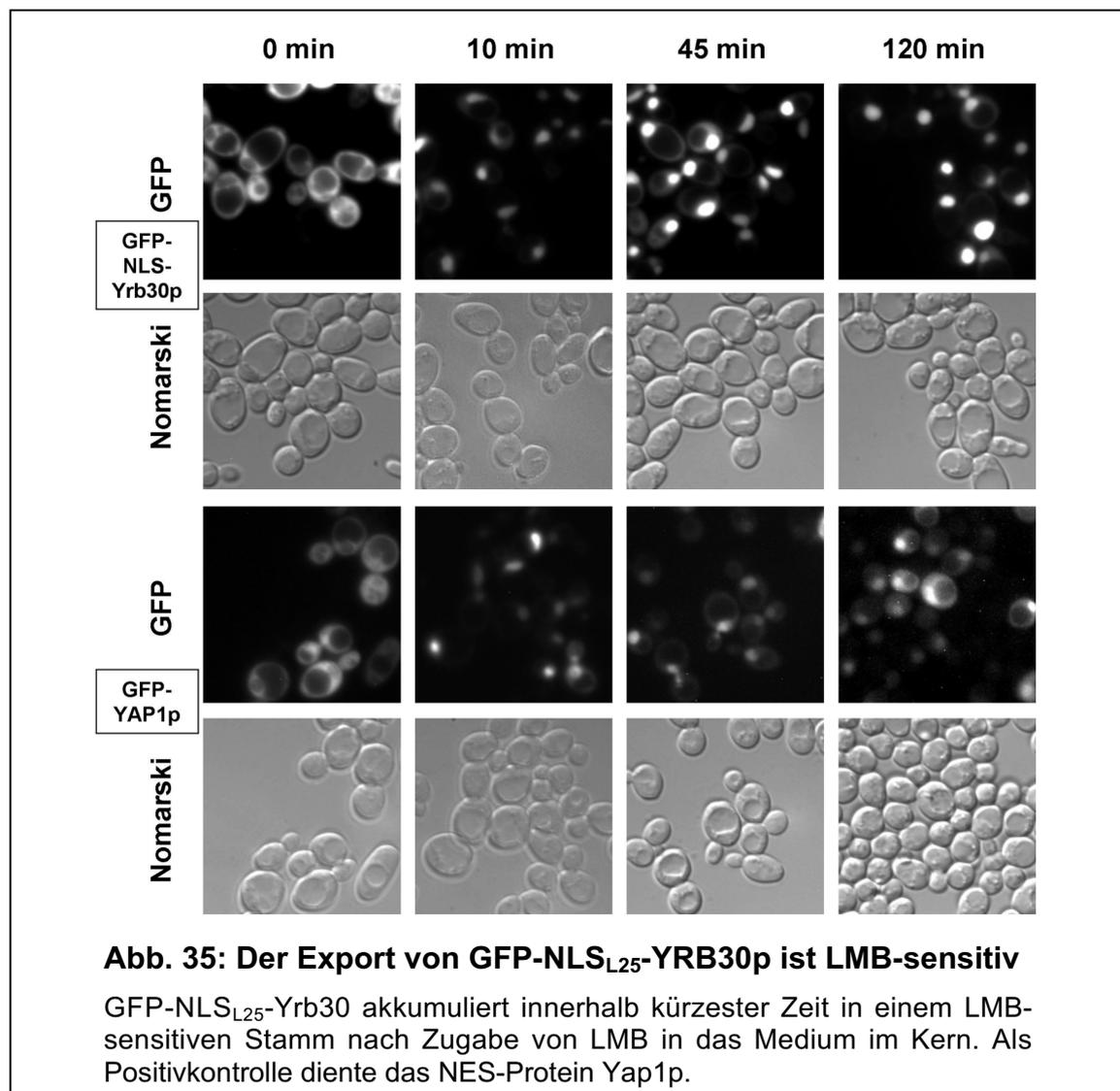
Ein völlig anderes Ergebnis erhielt man aber in einem Stamm, der das temperatur-sensitive *xpo1-1* Allel besitzt und in dem bei nicht-permissiver Temperatur Proteine mit einer klassischen, Leucin-reichen nukleären Export-Sequenz (NES) nicht mehr exportiert werden können. In diesem Stamm konnte bei nicht-permissiver Temperatur eine klare nukleäre Akkumulation des L25-NLS-GFP-Yrb30p Fusionsproteins beobachtet werden (Abb. 33). Dies lässt darauf schließen, daß zumindest das an eine NLS fusionierte Yrb30p Protein zwischen Zellkern und Zellplasma hin- und herwandert und Xpo1p für den nukleären Export von Yrb30p verantwortlich ist.



In einem zweiten Experiment wurde die Expression des essentiellen Xpo1p unter Kontrolle des regulierbaren *GAL1*-Promoters gestellt. Man konnte auch hier bei einem Abschalten der Expression durch Zugabe von Glukose ein nukleäres GFP-Signal des NLS-Yrb30p-Fusionsproteins detektieren (Abb. 34).



Leptomycin B (LMB), ein Metabolit der Bakteriengattung *Streptomyces*, ist eine Substanz, die mit CRM1 interagiert und die Erkennung und den Export klassischer NES-Sequenzen verhindert (Fornerod *et al.*, 1997; Askjaer *et al.*, 1998; Kudo *et al.*, 1998), nicht jedoch den Export von Yrb1p, welches zwar ebenfalls durch Xpo1p exportiert wird, jedoch keine klassische NES aufweist (Künzler *et al.*, 2000). In der verwendeten LMB-sensitiven *S. cerevisiae* *crm1*-Mutante (CRM1T539C) ist ein zentraler Threonin-Aminosäurerest zu einem Cystein mutiert (Neville und Rosbash, 1999). LMB alkyliert diesen Cystein-Rest selektiv und inaktiviert dadurch CRM1 (Kudo *et al.*, 1999). Bereits nach 10-minütiger Inkubation in Gegenwart von LMB konnte in dieser Mutante eine starke nukleäre Akkumulation des NLS-GFP-Yrb30-Fusionsproteins nachgewiesen werden. Auch das NES-Protein Yap1p zeigte, wie zuvor berichtet (Künzler *et al.*, 2000), bereits nach kurzer Zeit eine nukleäre Akkumulation (Abb. 35).



Es konnte jedoch nach LMB-Zugabe keine Anhäufung des GFP-Fusionsproteins von Yrb30p ohne externe NLS beobachtet werden (ohne Bild).

Die letztgenannten Ergebnisse belegen, daß nukleäres Yrb30p sich wie ein klassisches NES-Protein verhält und durch Xpo1p ins Zytoplasma zurückgebracht wird.

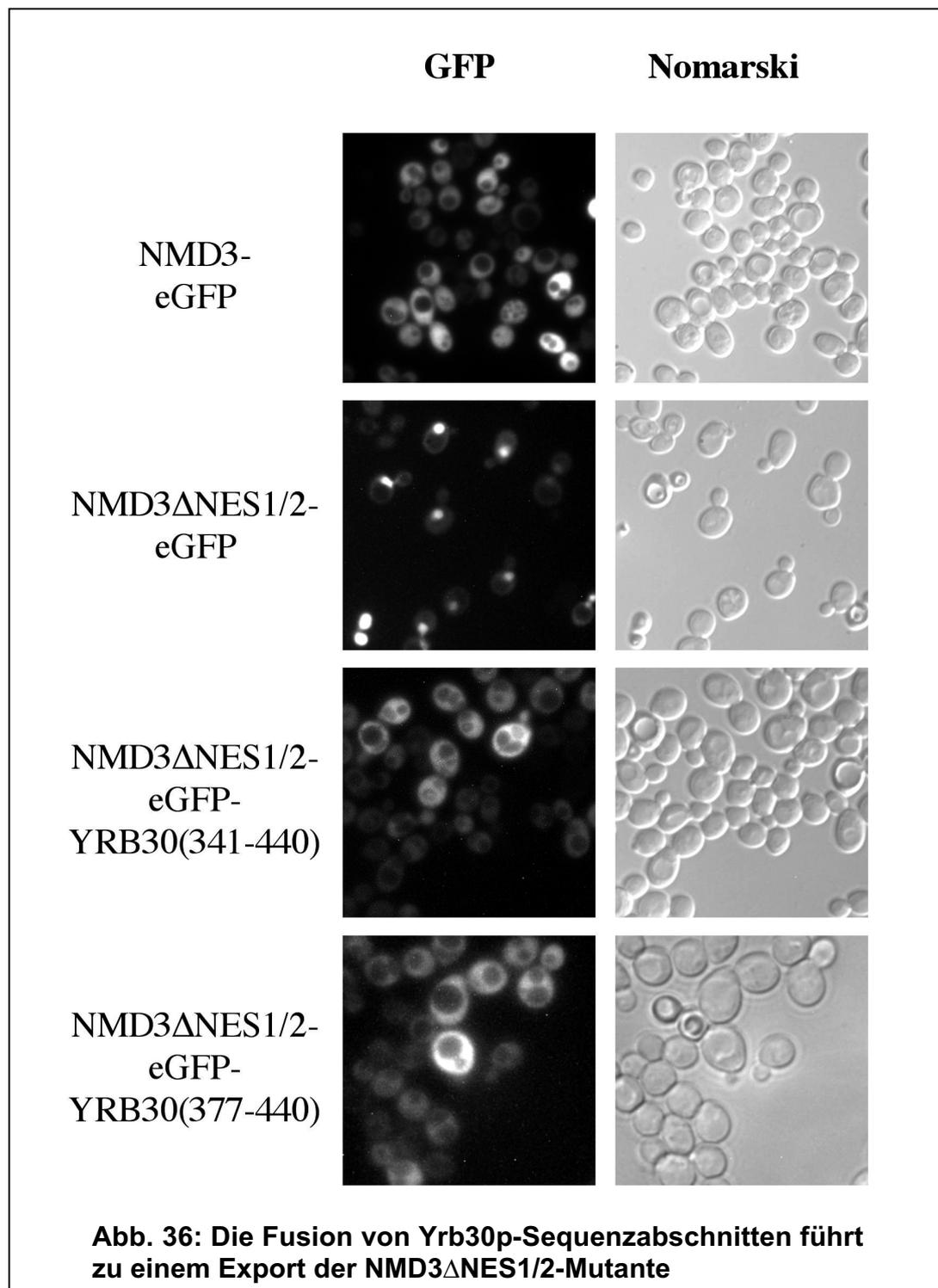
#### **4.9.3 Die im C-Terminus lokalisierte NES von Yrb30p ist auch in einem heterologen Kontext funktionell**

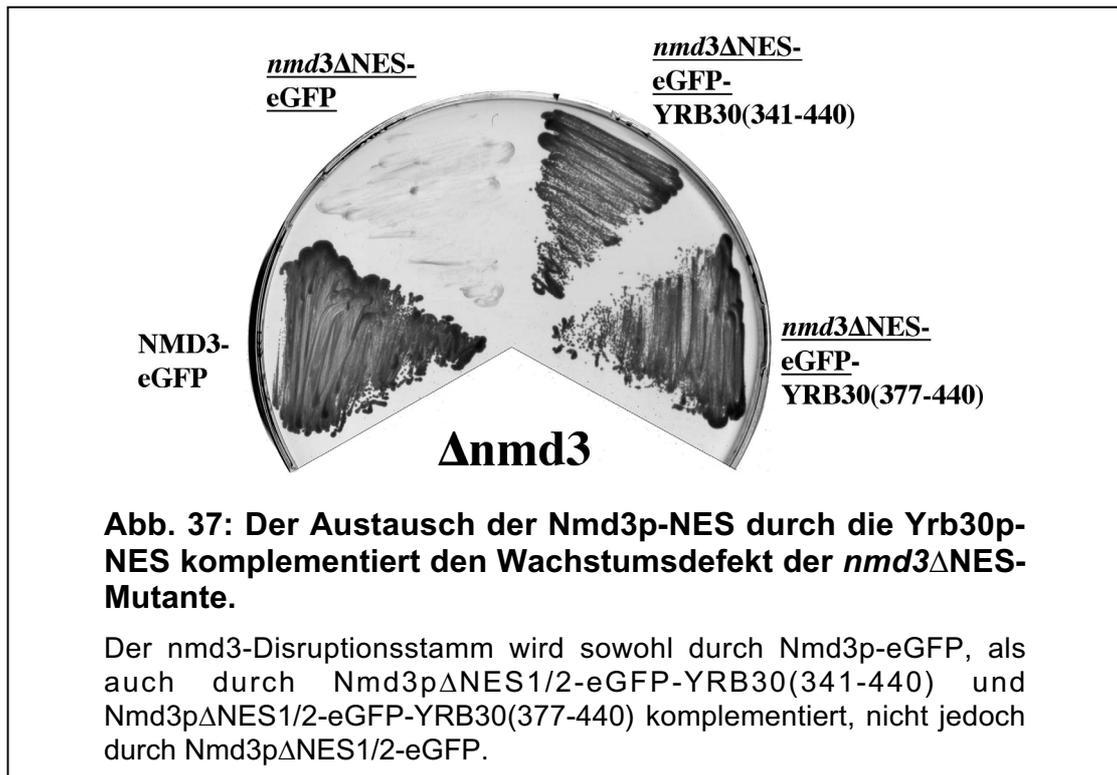
Zur Eingrenzung der für den Xpo1p-abhängigen Export erforderlichen NES (nuclear export sequence) wurde die Sequenz von Yrb30p nach besonders Leucin-reichen Regionen durchsucht. Dabei fiel besonders ein stark konservierter Sequenzbereich innerhalb der C-terminalen Domäne von Yrb30p (aa 377-413) auf. Im Folgenden wurde überprüft, ob ein nukleäres Reporterprotein durch Anfusionierung der entsprechenden Sequenz ins Zytoplasma dirigiert werden kann.

Hierzu wurde auf Nmd3p, ein essentielles Protein, welches zwischen dem Kern und dem Zytoplasma hin und her wandert, zurückgegriffen. Dieses Protein wird für den Xpo1p-vermittelten Export von 60S ribosomalen Untereinheiten aus dem Kern benötigt. Im C-Terminus besitzt Nmd3p zwei unabhängig voneinander funktionelle klassische Export-Sequenzen. Eine Deletion dieser beiden NESs führt zu einer nukleären Akkumulation und zu einem Funktionsverlust des Proteins. Die Fusion einer heterologen NES an das C-terminale Ende des Nmd3p $\Delta$ NES1/2-Proteins stellt jedoch die Funktion wieder her (Ho *et al.*, 2000; Gadal *et al.*, 2001b).

Somit war die Möglichkeit gegeben, durch Fusion von Yrb30p-Sequenzabschnitten an Nmd3p $\Delta$ NES1/2, die Funktionalität einer möglichen Export-Erkennungssequenz sowohl über Wiederherstellung einer zytoplasmatischen Lokalisation, als auch durch Aufhebung des Wachstumsdefekts der NMD3 $\Delta$ NES1/2-Mutante im *nmd3*-Disruptionsstamm zu belegen.

Die Fusionsproteine mit Yrb30(341-440) und Yrb30 (377-440) waren sowohl in der Lage, die nukleäre Lokalisation der NMD3-Mutante ins Zytoplasma zu verschieben (Abb. 35), als auch den Wachstumsdefekt der NMD3-NES-Mutante aufzuheben (Abb.36).





Ein Vergleich bereits bekannter, von Xpo1p erkannten klassischen Export-Signalsequenzen mit dem Leucin-reichen Sequenzabschnitt in der C-terminalen Domäne von Yrb30p und seinen Homologen (siehe Kapitel 5.3). läßt keine eindeutige Sequenzhomologie der erkannten Aminosäurereste erkennen. Die Diversität der bekannten NES-Sequenzen läßt jedoch den Schluß zu, daß neben der optimalen Erkennungssequenz ( $Lx_{2/3}(F/I/L/V/M)x_{1/2,3}Lx(I/V/L)$ ) (Macara, 2001) auch andere ähnliche Sequenzen, die jedoch einen hohen Anteil an hydrophoben Leucin- und Isoleucin-Resten aufweisen müssen, gut erkannt werden. Im Folgenden sind zwei mögliche Erkennungssequenzen der Yrb30p-Homologen angegeben.

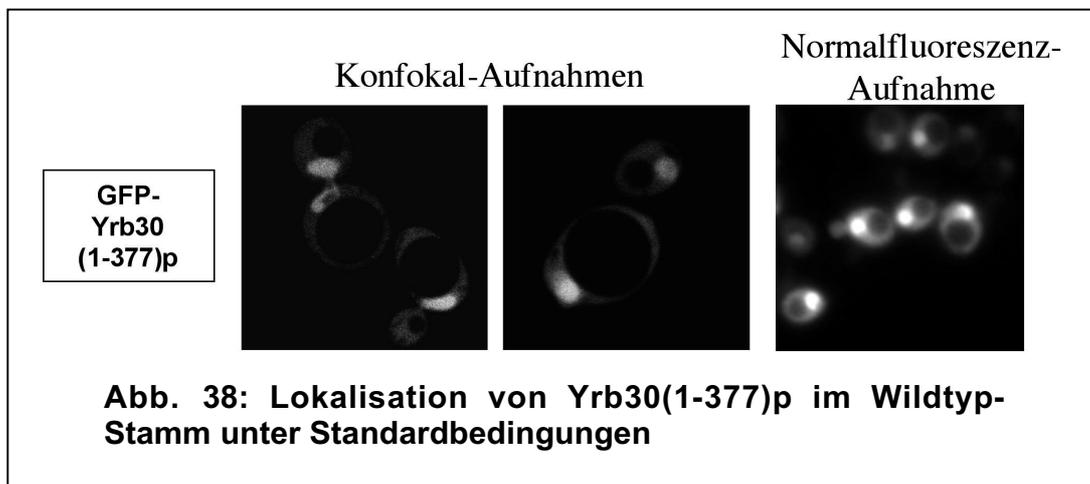
**Tabelle 6: Vergleich bekannter NES-Sequenzen mit der Leucin-reichen Sequenz der Yrb30-Homologen**

PKI: Protein-Kinase Inhibitor, HIV1-REV: human immunodeficiency virus type 1 Rev protein; MAPKK: mitogen-activated protein kinase kinase; MVM NS2: minute virus of mice NS2 protein; hcycB: human cyclin B1; NMD: Nonsense mediated decay; S.C. *Saccharomyces cerevisiae*; A. G.: *Ashbya gossypii*, C. A.: *Candida albicans*; S. P.: *Saccharomyces pombe*; N.C.: *Neurospora crassa*; \*: Im Folgenden mutierte Aminosäuren (s. Text)

PKI-NES	L	A	L	K	L	A	G	L	D	I		
HIV1-REV		L	P	P	L	E	R	L	T	L		
MAPKK	L	Q	K	K	L	E	E	L	E	L		
MVM NS2	M	T	K	K	F	G	T	L	T	I		
hcycB1	L	C	Q	A	F	S	D	V	I	L		
NMD3-1	Y	E	L	F	L	Q	E	L	E	E		
NMD3-2	I	D	E	L	L	D	E	L	D	E		
S.C.	Y	I	I	K	L*	T	S	L*	Q	S		
A.G.	Y	I	I	R	L	T	S	L	Q	N	mögliche NES- Erkennungs- sequenz 1 (Yrb30p 384-393)	
C.A.	Y	L	I	R	L	C	R	L	E	E		
S.P.-1	Y	L	I	R	L	C	A	L	Q	S		
S.P.-2	Y	L	L	R	L	C	S	L	Q	E		
N.G.	M	L	I	R	L	C	S	L	Q	E		
S.C.	L	L	E	Y	I*	I	K	L*	T	S	L*	mögliche NES- Erkennungs- sequenz 2 (Yrb30p 381-390)
A.G.	L	L	E	Y	I	I	R	L	T	S	L	
C.A.	L	L	E	Y	L	I	R	L	C	R	L	
S.P.-1	L	L	E	Y	L	I	R	L	C	A	L	
S.P.-2	L	L	E	Y	L	L	R	L	C	S	L	
N.G.	L	M	E	M	L	I	R	L	C	S	L	

Zur Verifikation einer Erkennungssequenz wurden die mit einem Stern markierten Aminosäuren zu Alanin mutiert. Die daraus hervorgegangenen Mutanten YRB30(L388A,L391A) sowie YRB30(I385A,L388A,L391A) zeigten eine unveränderte zytoplasmatische Lokalisation. Allerdings konnte durch Überprüfung der NES-Aktivität der Mutanten durch Fusion des Sequenzbereichs (aa) 377-440 an NMD3 $\Delta$ NES1/2 nachgewiesen werden, daß auch in diesem NMD3-Kontext keine Beeinträchtigung der NES-Aktivität durch diese Mutationen erreicht werden konnte. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, daß die restlichen meist hydrophoben Reste des Sequenzbereichs (aa) 377-414 für die Erkennung durch Xpo1p ausreichen. Hierzu findet sich ein ähnliches Beispiel bereits in der Literatur: Snurportin 1, welches zusammen mit Importin  $\beta$  den Import von m<sub>3</sub>G-markierten U snRNPs vermittelt, wird durch CRM1 (Xpo1p) exportiert. Dabei erkennt CRM1 nicht eine klassische NES auf Snurportin 1, sondern benötigt einen großen Sequenzabschnitt zur Interaktion (Paraskeva *et al.*, 1999).

Als weiteren Hinweis, daß es sich bei dieser Sequenz tatsächlich um eine funktionelle NES handelt, kann die Tatsache angesehen werden, daß eine Yrb30p $\Delta$ NES-Mutante bereits unter Wildtypbedingungen nukleäre Akkumulation aufweist (Abb. 38). Dies bedeutet allerdings auch, daß die erwähnte Mutante auf irgendeine Weise in das nukleoplasmatische Kompartiment gelangt. Eine Diffusion dieses im Vergleich zum Wildtyp-Protein um ca. 7 kDa kleinere Protein durch die Kernpore und anschließende Akkumulation im Kern kann mit dem bisher dargestellten Ergebnissen prinzipiell nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Möglicherweise findet jedoch auch ein aktiver Import der Yrb30 $\Delta$ NES-Mutante statt (siehe auch nächstes Kapitel).

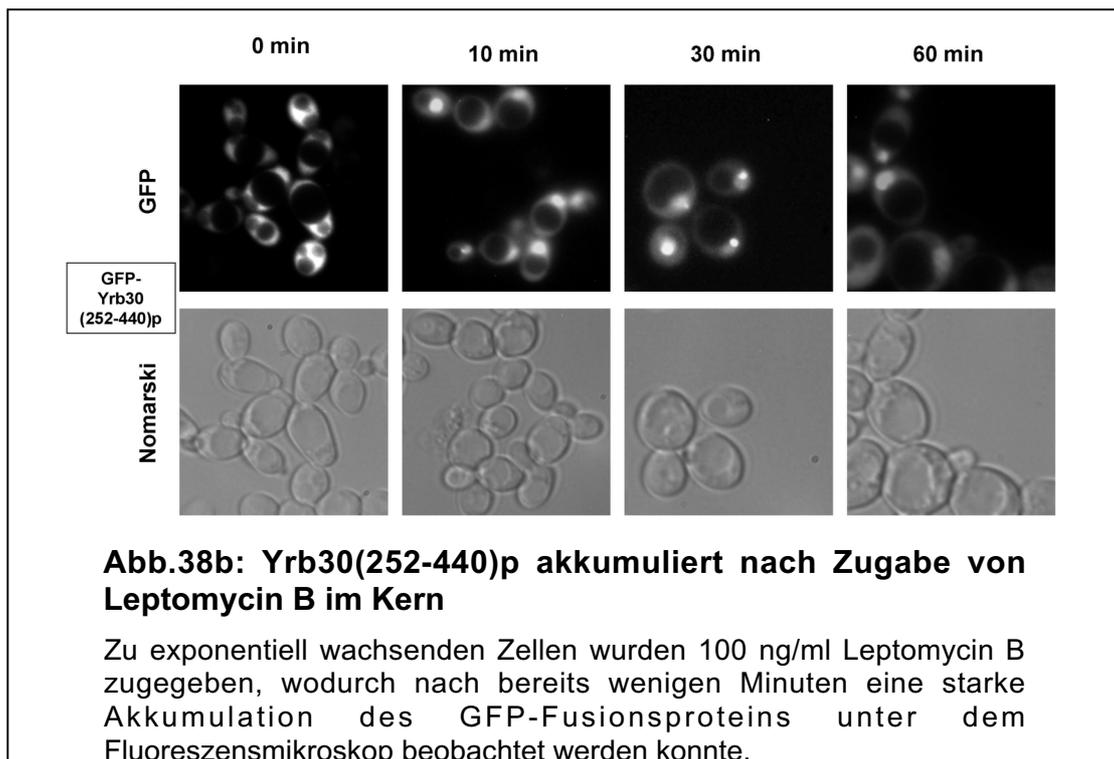


Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß Yrb30p im C-Terminus eine Leucin-reiche Exporterkennungssequenz besitzt, die sowohl ausreichend als auch notwendig für den Xpo1p-abhängigen Export von NLS-Yrb30p ist. Allerdings konnte – im Gegensatz zu Yrb1p – keine nukleäre Akkumulation des unfusionierten Gesamtproteins durch Inhibition des Xpo1p-abhängigen Transports beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wäre ein alternativer Exportweg, etwa über die RanGTP-Bindungsdomäne (siehe auch Diskussion).

#### 4.9.4 Eine N-terminal deletierte Yrb30p-Mutante pendelt zwischen Kern und Zytoplasma hin und her

Untermauert wurde die These eines über die RanGTP-Bindung vermittelten alternativen Transportweges für das Yrb30p-Gesamtprotein durch ein Experiment unter Verwendung einer N-terminal verkürzten Yrb30p-Mutante, die nicht mehr in der Lage ist Gsp1p direkt zu binden (siehe Abb. 18). Diese Mutante kann aufgrund ihrer NES-Sequenz im C-Terminus durch Xpo1p aus dem Kern exportiert werden, der postulierte RanGTP-vermittelte alternative Exportweg bleibt dieser Mutante jedoch verwehrt. Nach Inhibition des Xpo1p-vermittelten Exportweges durch Zugabe von Leptomycin B ändert sich die zytoplasmatische Lokalisation dieses Proteins drastisch, so daß bereits nach 5 Minuten eine deutliche Akkumulation im Kern zu beobachten war (Abb.38b).

Diese schnelle Akkumulation deutet eindeutig auf einen aktiven Transport dieses Proteins in den Kern hin, eine Diffusion in den Kern kann in diesem Experiment (im Gegensatz zum vorangegangenen Versuch) ausgeschlossen werden. Dies zeigt, daß Yrb30p eine funktionelle NLS in der C-terminalen Hälfte des Proteins besitzt. Unter der Annahme, daß die in Abb. 38 dargestellte Mutante (Yrb30 $\Delta$ NES) aufgrund aktiven Imports im Kern akkumuliert, ist eine NLS für Yrb30p im Sequenzbereich der Aminosäuren 252-377 zu postulieren.

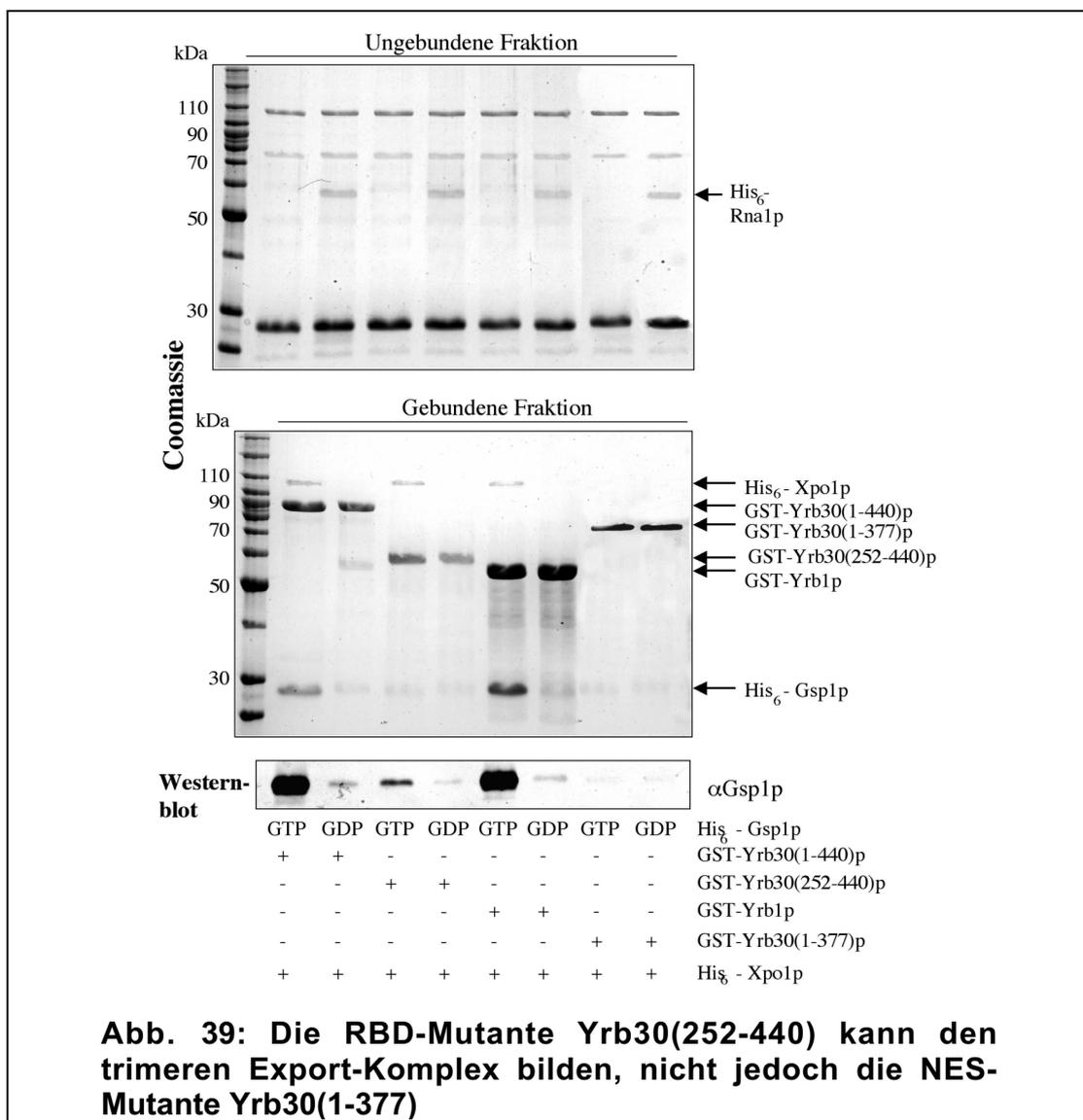


**Abb.38b: Yrb30(252-440)p akkumuliert nach Zugabe von Leptomycin B im Kern**

Zu exponentiell wachsenden Zellen wurden 100 ng/ml Leptomycin B zugegeben, wodurch nach bereits wenigen Minuten eine starke Akkumulation des GFP-Fusionsproteins unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden konnte.

#### 4.10 Die RanGTP-Bindung im Export-Komplex unterscheidet sich von der direkten Ran-Bindung

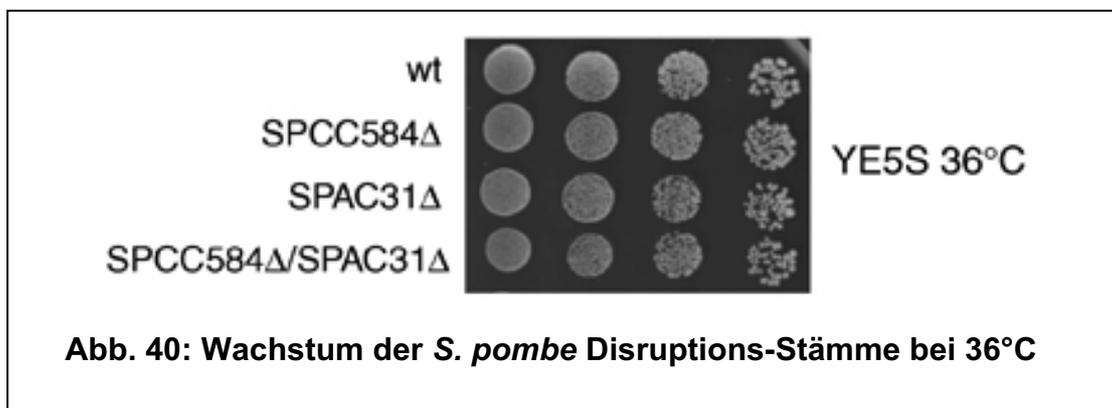
Da die beobachtete schnelle Akkumulation der Yrb30p-Mutante Yrb30(252-440)p nach Zugabe von Leptomycin B auf den blockierten Export dieses Proteins zurückzuführen ist, sollte es möglich sein, diesen Export-Komplex *in vitro* nachzuweisen. Dies ist insbesondere deshalb interessant, da diese Mutante im Gegensatz zum Gesamtprotein nicht in der Lage ist, Gsp1p direkt zu binden. Durch entsprechende Bindungsstudien konnte tatsächlich nachgewiesen werden, daß die Mutante Yrb30(252-440)p trotz fehlender direkter RanGTP-Bindung in der Lage ist, den trimeren Exportkomplex mit Xpo1p zu bilden, während die Yrb30 $\Delta$ NES-Mutante dies nicht kann (Abb. 39). Die schwächere Gsp1p-Bande im trimeren Komplex mit Yrb30p(252-440) ist durch die fehlende Bildung von dimeren Yrb30p-Gsp1pGTP-Komplexen zu



## 4.11 Analyse genetischer Beziehungen von YRB30 mit anderen Komponenten der Hefe

### 4.11.1 YRB30 ist nicht essentiell für vegetatives Wachstum unter verschiedenen Bedingungen und für verschiedene Prozesse (inklusive nukleozytoplasmatischem Transport)

Um die Funktion dieses neuen Ran-bindenden Proteins zu bestimmen, wurde zunächst das für Yrb30p kodierende Gen im W303-Stamm disruptiert (siehe Material und Methoden). Es zeigte sich, daß YRB30-disruptierte Zellen bei 16°C, 23°C, 30°C, 35°C und 37°C sowohl lebensfähig sind, als auch im Vergleich zum YRB30-wt-Stamm keinerlei Wachstumsdefekt aufweisen (siehe auch Abb. 41, Spur 1,2), . Übereinstimmend hiermit zeigen auch die Disruptionen der Yrb30-Homologen in *A. gossypii* und der beiden Yrb30-Homologen in *S. pombe* (Abb. 40) keinerlei Wachstumsdefekt. Die Lebensfähigkeit der YRB30-disruptierten Zellen deutet auf eine nicht-essentielle Funktion von Yrb30p hin.



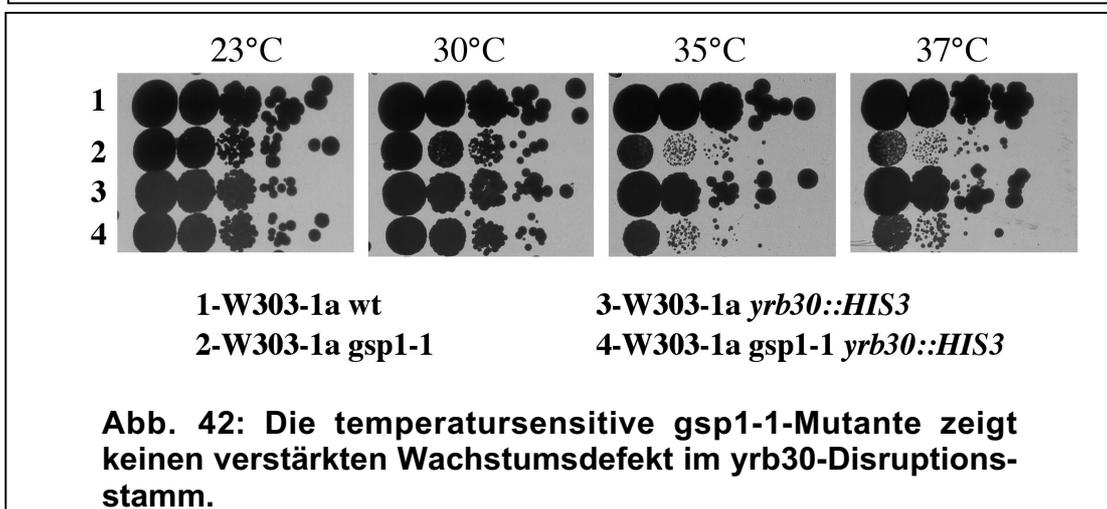
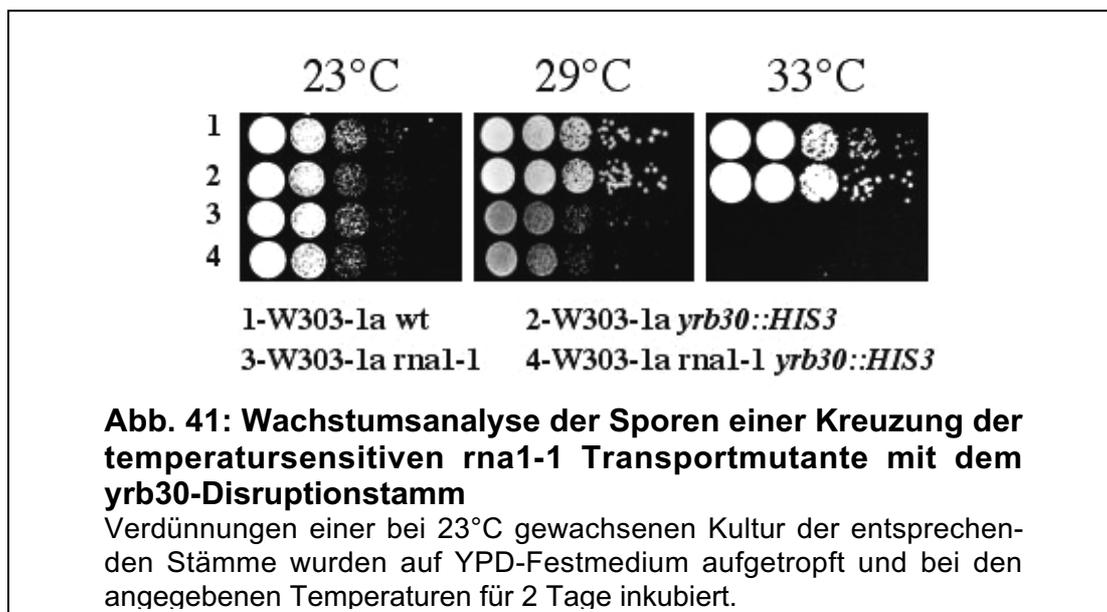
#### 4.11.1.1 Verschiedene Transportfaktoren zeigen in Kombination mit der Deletion von YRB30 keinen Wachstumsdefekt

Die Funktion von Ran im nukleozytoplasmatischen Transport ist die einzige klar etablierte Funktion von Ran in Hefe. Um eine Transportfunktion von Yrb30p nachzuweisen, wurde der yrb30-Disruptionsstamm (W303-1a yrb30::*HIS3*) mit verschiedenen Transportmutanten gekreuzt (Tabelle 7) und eventuelle Wachstumsdefekte der Doppelmutanten durch Verdünnungsreihen auf entsprechendem Festkulturmedium analysiert.

**Tabelle 7: Verschiedene Transportmutanten zeigen in Kombination mit der *yrb30*-Disruption keinen Wachstumsdefekt**

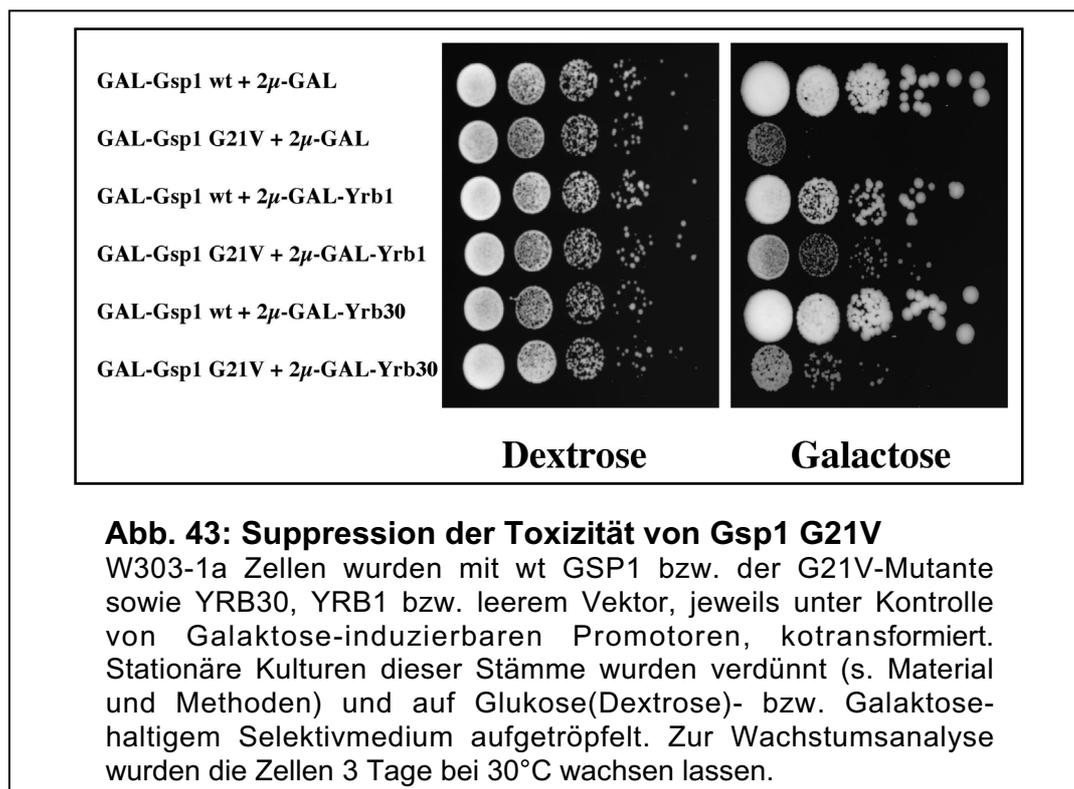
Transportmutante	Funktion
<i>gsp1-1</i> (siehe Abb. 42)	Ran
<i>rna1-1</i> (siehe Abb. 41)	RanGTPase-aktivierendes Protein (RanGAP)
<i>prp20-1</i>	Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor
<i>yrb1-51, -52</i>	Koaktivator der RanGA
$\Delta$ <i>mog1</i>	Ran-bindendes Protein
$\Delta$ <i>kap123</i>	Importin (s. Tabelle 1)
<i>srp1-31</i>	Adaptor an Importin $\beta$
<i>xpo1-1, -2, -3</i>	Exportin (s. Tabelle 1)
$\Delta$ <i>los1</i>	Exportin (s. Tabelle 1)
$\Delta$ <i>msn5</i>	Exportin (s. Tabelle 1)
<i>cse1-2</i>	Exportin (s. Tabelle 1)
$\Delta$ <i>nup2</i>	Nukleoporin, RanGTP-bindendes Protein
$\Delta$ <i>yrb2</i>	Strukturelle Funktion, Beteiligung beim Export
$\Delta$ <i>nup42</i>	Nukleoporin

Als Beispiel sei die Wachstumsanalyse der Transportmutanten *rna1-1* (Abb. 41) sowie *gsp1-1* (Abb. 42) im *yrb30*-Disruptionsstamm dargestellt.



#### 4.11.1.2 Die Überexpression von Yrb30p supprimiert partiell die Toxizität der Gsp1pG21V-Mutante

Durch Überexpression von Yrb30p konnte hingegen partiell die Toxizität der Gsp1pG21V-Mutante, die durch die fehlende GTP-Hydrolyse dieser Mutante hervorgerufen ist, ähnlich wie im Fall von Yrb1p supprimiert werden (Abb. 43). Dies bestätigt genetisch die identifizierte physikalische Interaktion von Yrb30p und Gsp1p.



Allerdings konnte durch Überexpression von Yrb30p in verschiedenen Transportmutanten kein weiterer Phänotyp detektiert werden.

**Tabelle 8: Überexpression von Yrb30p in verschiedenen Transportmutanten**

getestete Transportmutanten bei Überexpression von Yrb30p	Funktion
$\Delta$ kap123	Importin (s. Tabelle 1)
$\Delta$ nmd5	Importin (s. Tabelle 1)
$\Delta$ sxm1	Importin (s. Tabelle 1)
$\Delta$ lhp1	Importin (s. Tabelle 1)
$\Delta$ pdr6	Importin (s. Tabelle 1)
$\Delta$ los1	Exportin (s. Tabelle 1)
$\Delta$ rip1	Nukleoporin
$\Delta$ nup188	Nukleoporin
prp20-1	Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor
rna1-1	RanGTPase-aktivierendes Protein

#### 4.11.1.3 Überprüfung von Sensitivitäten auf bestimmte Zellgifte bzw. Wachstum unter speziellen Bedingungen

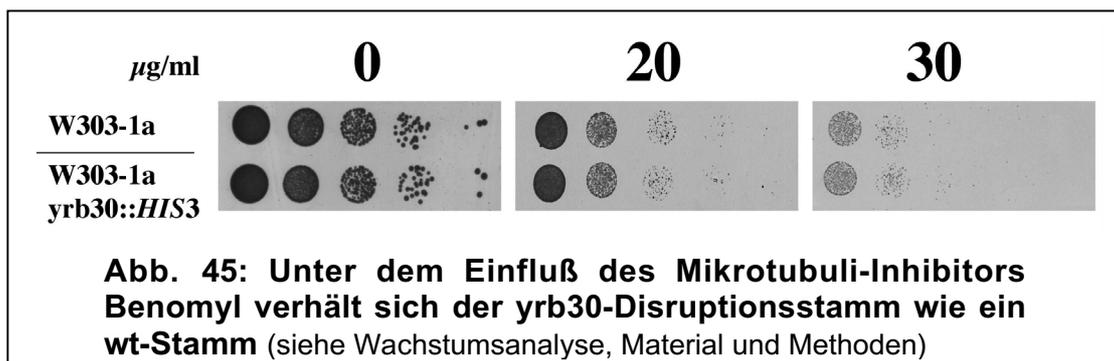
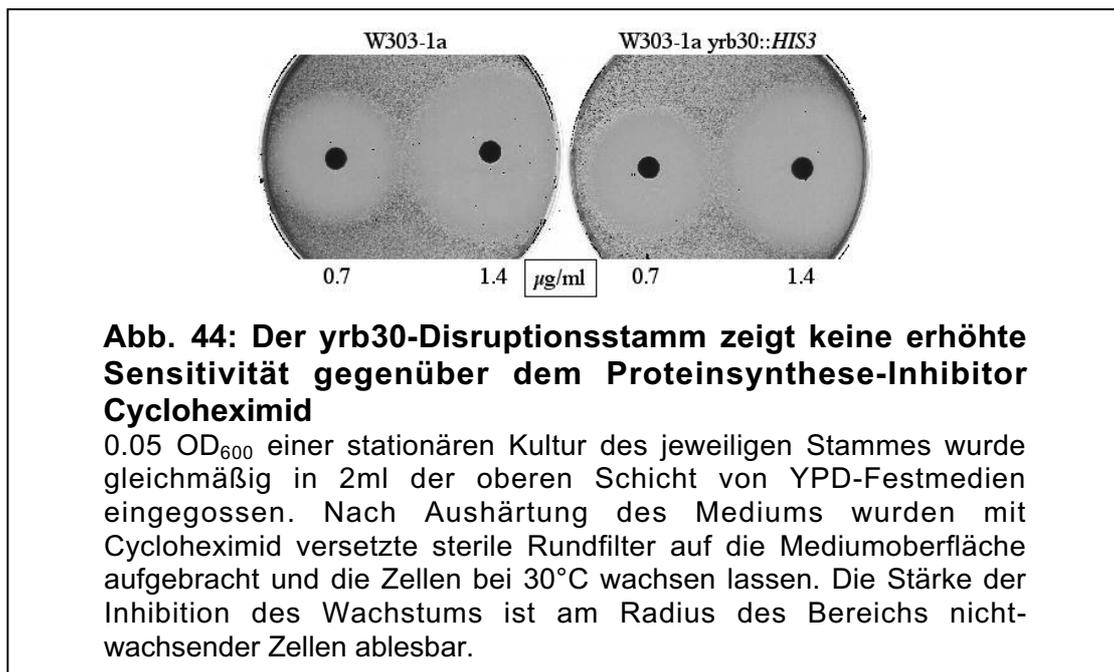
Um auf eine andere Weise Hinweise auf die biologische Funktion eines gegebenen Proteins zu erhalten, kann man das Wachstumsverhalten eines Wildtyp-Stammes im Vergleich zum Disruptionsstamm unter dem Einfluß bestimmter Zellgifte bzw. spezieller Wachstumsbedingungen untersuchen. Zur Bestimmung der zellulären Funktion von Yrb30p wurden folgende Wachstumsbedingungen getestet.

**Tabelle 9: Untersuchung spezieller Wachstumsbedingungen**

Wachstums- bedingung	Bemerkung (Wirkungsweise bzw. Test auf...)	Bedingungen
Cycloheximid (siehe Abb. 44)	Resistenz gegenüber geringen Mengen ist meist assoziiert mit Proteinen der Protein-Synthese, des Zell-Zyklus und der Zellwand.	Filter auf YPD-Medium mit 0.5-1.5 µg/ml Cycloheximid
Benomyl (siehe Abb.45)	Mikrotubuli-Inhibitor	YPD + 5-30 µg/ml
Nocodazol	Actin-Depolymerisator	YPD + 15 µg/ml
Ethanol	Defekte in der Protein-Stabilität (evtl. Verbindung zu Hitze-Schock-Proteinen)	YPD + 1.5-6% EtOH
Formamid	allgemeiner Protein-Defekt	YPD + 1.5-4.5% Formamid
Wasserstoff- peroxid	Oxidativer Stress	Filter auf YPD-Medium mit 1.5 – 6 µl 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Hochsalz NaCl	Defekt meist assoziiert mit Defekten der Zellwand bzw. des Zytoskeletts	YPD + 1.2 M NaCl
Hochsalz LiCl	s. o.	YPD + 1.2 M LiCl
Calcofluor- weiß	Defekte in der Zellwand-Biosynthese	YPD (pH 6.5) + 20 µg/ml Calcofluorweiß
Sorbitol	Zellwand- bzw. Zytoskelett-Defekte (osmotischer Stress)	YPD + 1-1.5 M Sorbitol
geringe Ca <sup>2+</sup> - Konzentration	Abhängigkeit von Ca <sup>2+</sup> -Ionen	YPD + 15 mM EGTA
Cu <sup>2+</sup>	Abhängigkeit (der Expression bzw. Stabilität) von Cu <sup>2+</sup> -Ionen	YPD + 10-500µM CuSO <sub>4</sub>
YPGal	Defekt in der Galaktose-Fermentation	YPGal
YPRaff	Defekt in der Raffinose-Fermentation	YPRaff
YPGlycerin	Defekte bei der Zellatmung	3% Glycerin als alleinige Kohlenstoffquelle
3-AT	Defekt in der Allgemeinen Kontrollantwort (induziert Histidin-Mangel)	SDC-his + 10-50 mM 3-AT

(nach (Hampsey, 1997))

Unter allen getesteten Wachstumsbedingungen konnte kein bzw. kein verstärkter Defekt mit dem *yrb30*-Disruptionsstamm beobachtet werden.

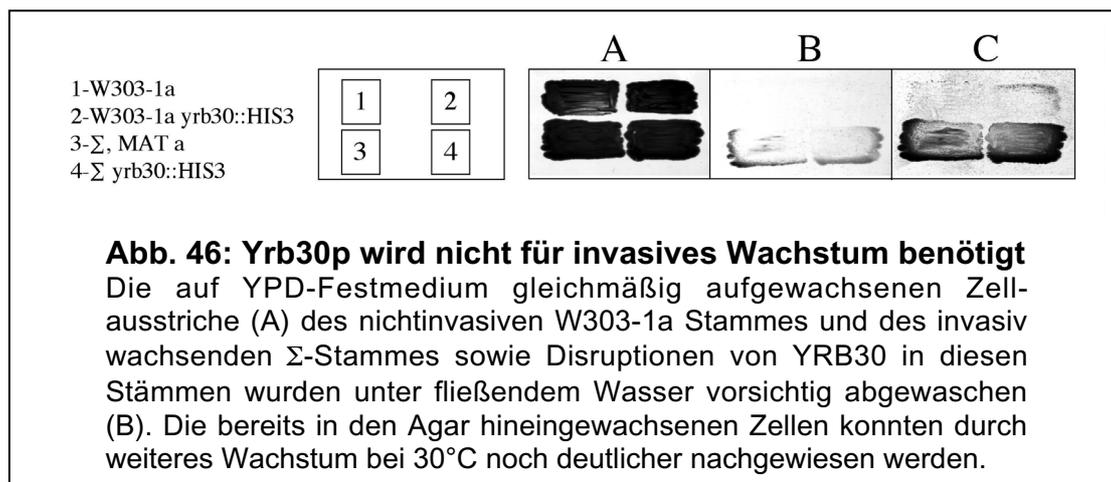


#### 4.11.1.4 Überprüfung Hefe-spezifischer Funktionen

Auch Defekte des Disruptionsstammes in Hefe-spezifischen Prozessen wurden untersucht:

**Tabelle 10: Überprüfung Hefe-spezifischer Funktionen**

Funktion	Untersuchungsmethode
Konjugation	Konjugation auf YPD-Festmedien für 0.5h, 1h, 2h, 3h
Sporulation	Bestimmung der Sporulationseffizienz auf Sporulationsmedium sowie in Flüssigkultur (Vergleich mit wt-Stamm unter dem Lichtmikroskop)
Invasives Wachstum	(siehe Abb. 46)



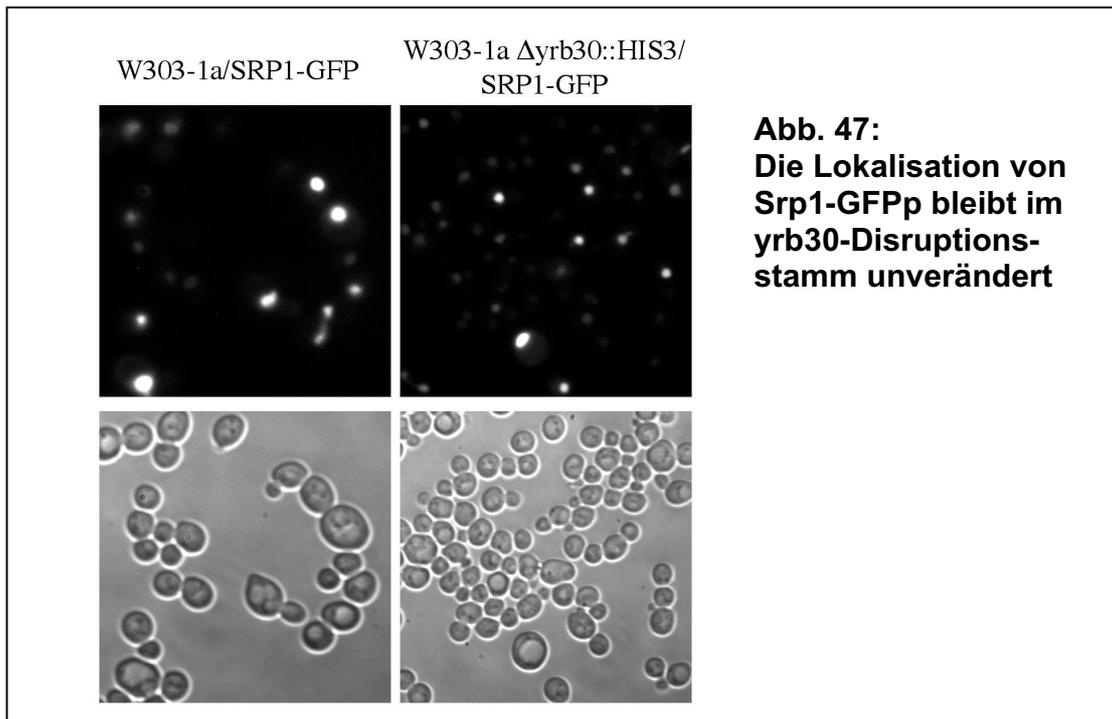
#### 4.11.1.5 Überprüfung von Transportdefekten in $\Delta$ yrb30-Zellen mithilfe verschiedener Reporterproteine

Eine Beteiligung von Yrb30p in verschiedenen zellulären Prozessen wurde auch über eine durch Disruption von YRB30 verursachte Mislokalisierung verschiedener Reporterproteine überprüft (Tabelle 11).

**Tabelle 11: Die Disruption von YRB30 führt nicht zu einer Mislokalisierung der angegebenen Reporterproteine**

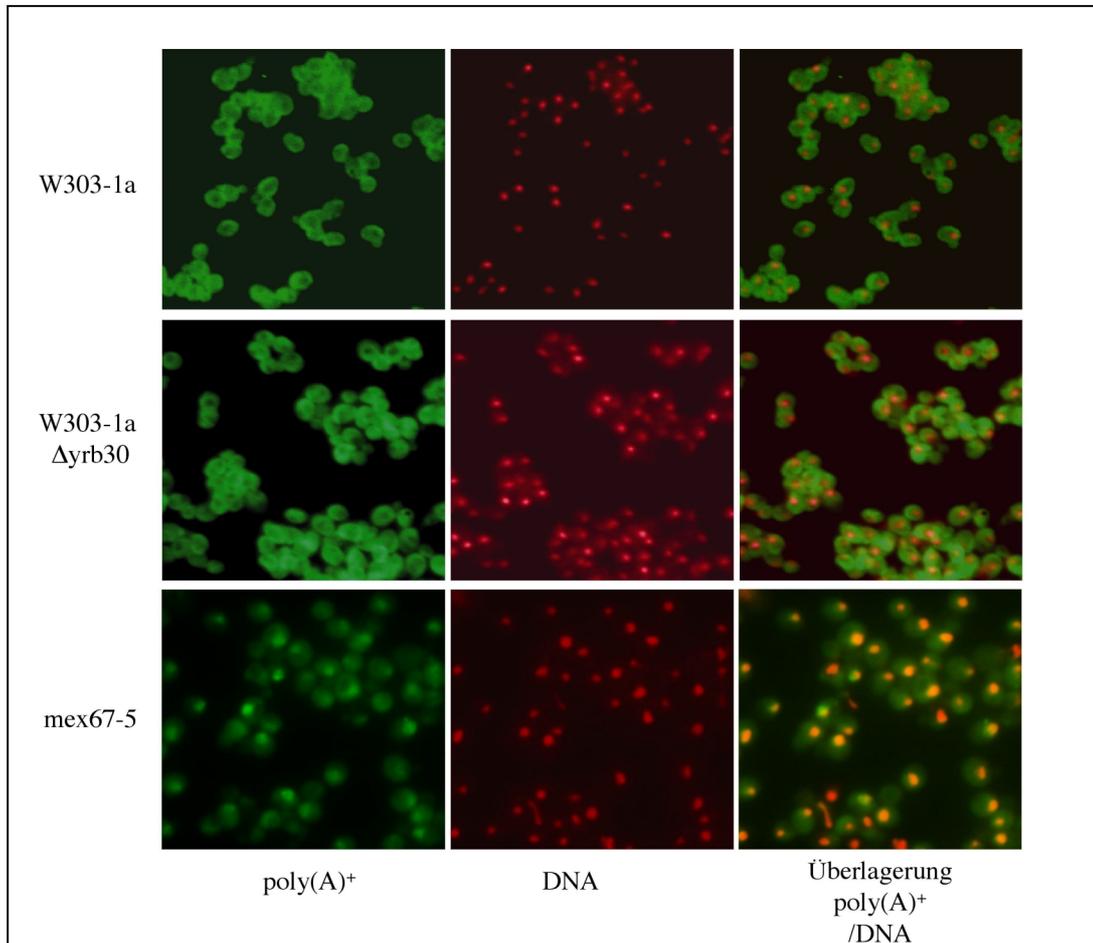
Reporterprotein	Funktion	Lokalisation unter Wildtypbedingungen
Bub3p	'Checkpoint'-Protein, Zell-Zyklus-Arrest	Nuk
Sec13p	Komponente der COPII-Schicht endoplasmatischer Vesikel	NPC-L (Nuk)
Gcd11p	Gamma-Untereinheit des Translations-Initiations-Faktors eIF2	Zyt
Hog1p	Komponente des Signalswegs zur Antwort auf hohe Osmolarität	(Zyt)+Nuk
Srp1p (siehe Abb. 47)	Karyopherin-alpha, als Adapter beim Import NLS-haltiger Proteine beteiligt	Nuk
Rpl25p	Ribosomales Protein, assembliert im Kern mit 60S-Untereinheit des Ribosoms	Zyt
Mtr10p	Karyopherin (Importin)	Nuk
Yap1p	Transkriptionsfaktor	Zyt
NLS-NES-GFPp	(synthetisches pendelndes Protein)	Zyt + (Nuk)
Spo7p	für Mitose erforderliches Protein	NPC-L
Yrb1p	RanGAP-aktivierendes Protein	Zyt
Ste5p	beteiligt beim Pheromon-Signalweg	Zyt+Nuk
SV40NLS-GFP (pGADGFP)	NLS-Reporterprotein	Nuk
Mtr2p	beim mRNA-Export beteiligtes Protein	Nuk
Mex67p	beim mRNA-Export beteiligtes Protein	Nuk+NPC-L

Zyt = Zytoplasmatisch, Nuk = Nukleär, NPC-L = Lokalisation an Kernpore



Einige mRNA-Exportfaktoren, wie z.B. Npl3p, werden nach erfolgreichem mRNA-Export, gebunden an Importrezeptoren, als klassische Proteinimportkomplexe in den Kern zurück gebracht. Da dieser Re-Import Ran-abhängig ist, führt ein defektes Ran-System zu einem mRNA-Exportdefekt. Daher sollten Mutationen nicht nur in direkt beim mRNA-Export beteiligten Komponenten, sondern auch in indirekt beim Re-Import von mRNA-Exportfaktoren involvierten Proteinen, zu einer Akkumulation von mRNA im Kern führen. Um zu testen, ob Yrb30p eine direkte oder indirekte Rolle beim mRNA-Export spielt, wurde daher die Lokalisation von polyadenylierter mRNA im Wildtyp-Stamm mit der im yrb30-Disruptionsstamm verglichen (Abb. 48).

Die Tatsache, daß auch im yrb30-Disruptionsstamm mRNA in gleicher Weise ins Zytoplasma exportiert werden kann, deutet darauf hin, daß Yrb30p keinerlei Einfluß auf die Lokalisation von mRNA ausübt.



**Abb. 48: Der Export polyadenylierter mRNA ist im yrb30-Disruptionsstamm nicht beeinträchtigt**

Wildtyp und  $\Delta$ yrb30-Zellen wurden bei 30°C wachsen lassen und die Lokalisierung der polyadenylierten-RNA mittels Oligo(dT)-*in-situ*-Hybridisierung bestimmt. Als Positivkontrolle diente der einen mRNA-Exportdefekt aufweisende temperatursensitive mex67-5 Stamm, dessen bei 30°C gewachsene Kultur vor Bestimmung der Lokalisation polyadenylierter mRNA 5 Minuten bei 37°C inkubiert wurde. Die DNA wurde durch DAPI angefärbt. Eine Überlagerung der beiden Signale belegte, daß der Export von mRNA ins Zytoplasma in  $\Delta$ yrb30-Zellen voll funktionell ist.

#### **4.12 Durchmusterung des Genoms auf synthetisch letale Beziehungen von YRB30 mit verschiedenen Transportmutanten ('SL-Screen')**

Der Begriff Synthetische Lethalität bezeichnet den Zelltod aufgrund Kombination zweier nicht-letaler Mutationen. Bender und Pringle entwickelten hierzu 1991 eine Methode, um das Genom auf miteinander genetisch interagierende Gene zu durchmustern (Bender und Pringle, 1991).

Unter Verwendung der yrb30-Deletionsmutante wurde eine solche genetische Durchmusterung des Genoms, wie in Kapitel 3.2.2.10 beschrieben, durchgeführt. Dabei wurden 125.000 Transformanten analysiert. 26 Transformanten hatten die Fähigkeit zu sektorieren verloren und zeigten eine rote Kolonienfarbe auf. Allerdings konnten alle 26 roten Kolonien das Plasmid verlieren und somit auf FOA wachsen, so daß keine wirklichen mit  $\Delta$ yrb30 synthetisch lethalen Mutationen erzeugt werden konnten.

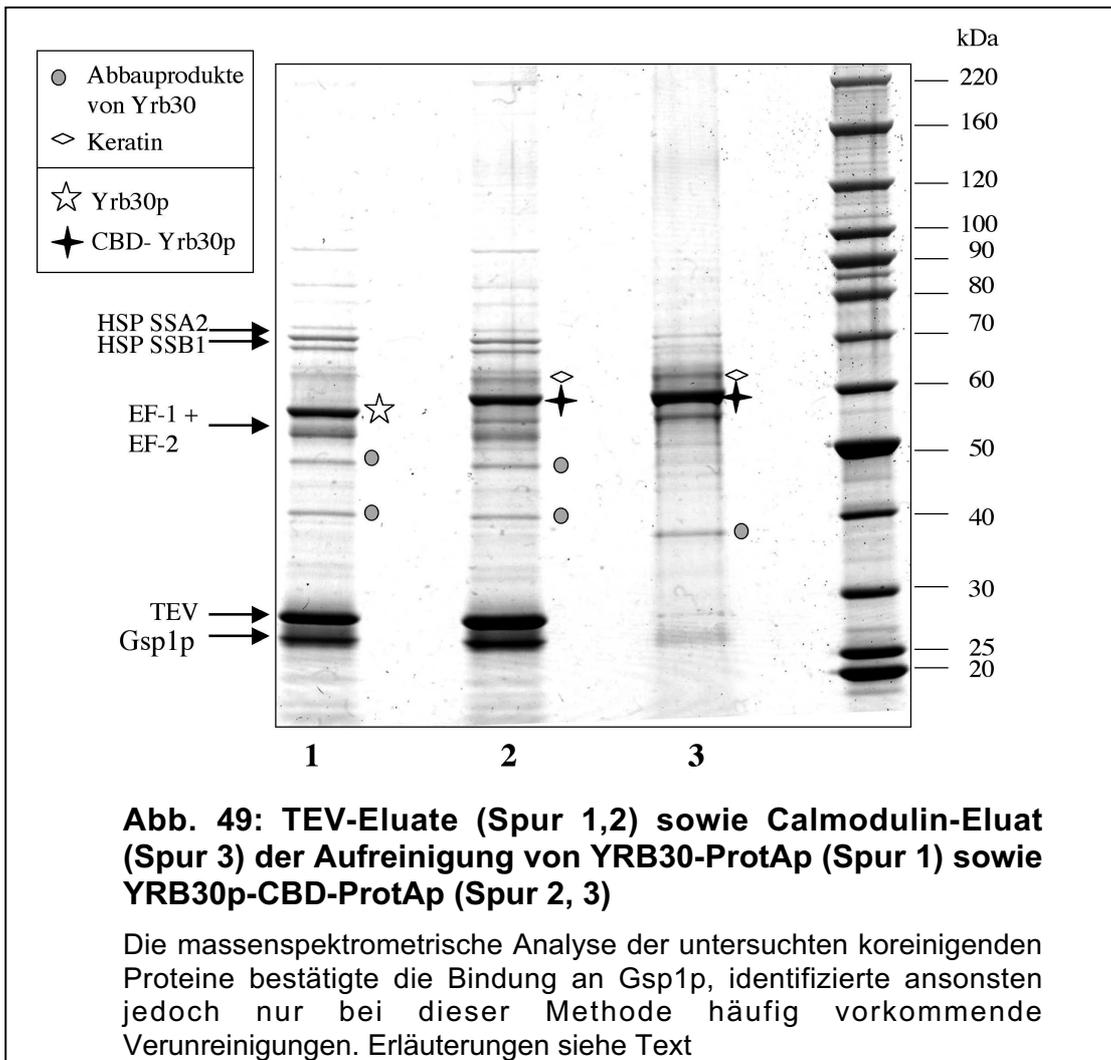
#### **4.13 Durchmusterung des Hefegenoms nach weiteren Bindungspartnern von Yrb30p mittels der Zwei-Hybrid-Technik**

Aufgrund der guten Resultate bei der Durchmusterung des Hefegenoms nach neuen Ran-Interaktoren (Kapitel 4.2) wurde eine entsprechende Analyse in Zusammenarbeit mit Micheline Fromont-Racine (Institute Pasteur, Paris) auch mit Yrb30p als Beute durchgeführt. Obwohl sehr viele diploide Transformanten auf Interaktion getestet werden konnten (58 Millionen), wurde lediglich das Protein Xdj1p identifiziert.

Xdj1p ist homolog zum bakteriellen Chaperon DnaJ. Die Tatsache, daß dieses Protein in vielen Zwei-Hybrid-Analysen detektiert wurde, deutet darauf hin, daß es sich dabei um eine unspezifische Interaktion handelt.

#### 4.14 Biochemische Versuche zur Identifizierung von Proteinen, die mit Yrb30p interagieren

Zur biochemischen Identifizierung von weiteren Bindungspartnern von Yrb30p wurden verschiedene Ansätze gewählt. Als einer dieser Ansätze wurde Yrb30p als ProtA- (bzw. ProtA-CBD-) Fusionsprotein aus Hefe aufgereinigt und koreinigende Proteinbanden massenspektrometrisch analysiert. Dabei erfolgte die Elution der Fusionsproteine von der IgG-Affinitätsmatrix durch proteolytische Abspaltung des bindenden ProtA durch die TEV-Protease (TEV-Eluat). Im Fall des eluierten Yrb30-CBDp wurde durch Anbindung, Waschen der Matrix und Elution der gebundenen Proteine an eine Calmodulin-Matrix das TEV-Eluat weiter aufgereinigt. Die jeweiligen Fusionsproteine konnten in allen Fällen gut aufgereinigt werden (Abb. 49).



Einige der koreinigenden Banden wurden massenspektrometrisch analysiert. Dabei wurden neben Gsp1p (und Abbaubanden von Yrb30p) jedoch nur bei

dieser Methode bekannte Verunreinigungen, wie die Hitzeschockproteine Ssa2p und Ssb1p, Keratin, sowie die Translationselongationsfaktoren Ef1p und Ef2p identifiziert. Daher ist davon auszugehen, daß es sich um keine spezifische Bindung dieser Proteine an Yrb30p handelt. Verwunderlich ist, daß durch die zusätzliche Aufreinigung an einer Calmodulin-Matrix, große Mengen des spezifisch an Yrb30p bindenden Gsp1p verloren gehen. Zwar konnte durch einen Western-Blot Gsp1p spezifisch nachgewiesen werden (ohne Bild), jedoch könnte die relativ geringe Menge koreinigenden Gsp1p durch eine möglicherweise zu hohe Salzkonzentration im Puffer bzw. zu hohem Gehalt an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (die zur Elution der gebundenen Proteine führen) erklärt werden. Durch Optimierung der Bedingungen des zweiten Aufreinigungsschrittes könnte dies wahrscheinlich verbessert werden.

Rekombinant hergestelltes GST-Yrb30p war – wie in Kapitel 3.4.2 erwähnt – in der Lage, Gsp1p spezifisch aus  $\text{GTP}\gamma\text{S}$ -beladenem Hefeextrakt aufzureinigen. Neben Gsp1p wurden auch andere koreinigende Proteinbanden dieses Experiments analysiert. Neben bekannten Verunreinigungen konnte hierbei lediglich die ubiquitäre Alkoholdehydrogenase (Adh1p) identifiziert werden.

Zur Überprüfung, ob Yrb30p hochmolekulare Komplexe bildet, wurde Hefelysate in einem Saccharose-Gradienten aufgetrennt und mithilfe des Yrb30p-Antikörpers Yrb30p in den einzelnen Fraktionen nachgewiesen (siehe Material und Methoden). Da Yrb30p ausschließlich bei geringster Saccharose-Konzentration nachgewiesen werden konnte (ohne Bild), deutet dies darauf hin, daß Yrb30p keine hochmolekularen Komplexe mit Ribosomenuntereinheiten bildet.

Die Fähigkeit zur Ausbildung eines Homodimers wurde überprüft, indem rekombinantes GST-Yrb30p (ca. 90 kDa) mit His-Yrb30p (ca. 64 kDa) inkubiert wurde und die an GSH-Sepharose gebundenen Proteine auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert wurden. Es konnte keinerlei Dimerbildung beobachtet werden.

Die Tatsache, daß keine Komplexe mit anderen Proteinen identifiziert werden konnten, deutet möglicherweise darauf hin, daß Yrb30p nur transiente instabile Komplexe ausbildet.

## 5 Diskussion

### 5.1 Yrb30p ist ein neuer Modulator des RanGTPase-Zyklus

Mutationen der kleinen Ras-ähnlichen GTPase Ran führen zu unterschiedlichen zellulären Defekten: Neben einem gestörten nukleozytoplasmatischen Transport konnte man auch Defekte bei der Prozessierung von mRNA, der DNA-Replikation, der Initiierung der Transkription, des Zellzyklus, der Reaktion auf Pheromone, der Chromosomen-Segregation, der Ausbildung von Mikrotubuli sowie der Neubildung einer Kernmembran am Ende der Mitose beobachten (Kornbluth *et al.*, 1994; Hughes *et al.*, 1998; Fleig *et al.*, 2000; Moore, 2001).

Zu Beginn dieser Arbeit war unklar, in wieweit die beobachteten Phänomene die Folge eines gestörten nukleozytoplasmatischen Transports sind bzw. direkt durch Ran gesteuerte Prozesse reflektieren. Durch unterschiedliche Bindungspartner der nukleotidgebundenen Formen der kleinen Ras-ähnlichen GTPase Ran, stellt dieses Protein prinzipiell einen idealen Regulator zur Steuerung zellulärer Prozesse dar. Daher ist es durchaus denkbar, daß viele unterschiedliche Effektoren von Ran für die Steuerung bestimmter zellulärer Prozesse verantwortlich sind.

Mittlerweile konnte gezeigt werden, daß bei der Ausbildung von Mikrotubuli-Astern sowie der Kernmembran die Karyopherine als Ran-Effektoren eine entscheidende Rolle spielen (Nachury *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002). Trotzdem existieren noch andere Ran-bindende Proteine, insbesondere die Familie der RanBP1-verwandten Proteine (Yrb1p, Yrb2p, Nup2p in *S. cerevisiae*), die als Modulatoren des RanGTPase Zyklus einen wichtigen Einfluß auf diese Prozesse ausüben. Darauf deutet z.B. auch die Tatsache hin, daß die Yrb1p-Konzentration in der Telophase, bei Neubildung der Kernmembran, stark absinkt (Guarguaglini *et al.*, 2000).

Ob auch noch andere Prozesse direkt – also unabhängig von einem funktionellen nukleozytoplasmatischen Transport - durch Ran gesteuert werden, ist bislang unklar.

Zur Identifizierung neuer Ran-Bindungspartner in der Hefe *S. cerevisiae* wurde in dieser Arbeit eine Zwei-Hybrid-Durchmusterung des Genoms eingesetzt. Die Tatsache, daß bereits bekannte Ran-bindende Proteine wie Karyopherine, Yrb1p und Mog1p identifiziert wurden zeigt, daß der Versuchsansatz und die gewählten Bedingungen gut geeignet sind, neue Ran-bindende Proteine zu finden. Interessanterweise wurde Mog1p in der Studie mit der Gsp1T26N-Mutante als Beute identifiziert, die als nukleotidfrei bzw. als GDP-gebunden angesehen wird. Übereinstimmend hierzu wurde Mog1p kürzlich mit der Ablösung von RanGDP von seinem Importrezeptor NTF2 sowie mit dem Nukleotidaustausch auf Ran durch RanGEF in Verbindung gebracht (Steggerda und Paschal, 2000; Nicolas *et al.*, 2001). Als einziges neues physikalisch mit Ran interagierendes Protein konnte YGL164c identifiziert werden, das Yrb30p genannt wurde. Dieses in der Analyse mit der hydrolysedefizienten und daher GTP-gebundenen Gsp1G21V-Mutante identifizierte Protein bindet mit einer hohen Affinität (10 nM) spezifisch an die GTP-gebundene Form von Hefe-Ran (Gsp1p). Die Bindungsstelle auf Gsp1pGTP überlappt dabei mit der von Yrb1p und unterscheidet sich von derjenigen von Importin- $\beta$ . Trotz dieser Ähnlichkeit zu Yrb1p inhibiert Yrb30p im Gegensatz zum koaktivierenden Yrb1p die RanGAP-vermittelte GTP-Hydrolyse von Ran und ähnelt in diesem Punkt mehr den Karyopherinen.

## **5.2 Yrb30p pendelt möglicherweise zwischen Kern und Zytoplasma**

Die Existenz einer durch den Exportrezeptor Xpo1p (CRM1) erkannten funktionellen NES in Yrb30p, die unter den Homologen hochkonserviert ist, läßt vermuten, daß dieses Protein trotz zytoplasmatischer Lokalisation unter Wildtypbedingungen zwischen Kern und Zytoplasma hin und her pendelt. Diese Vermutung wurde zum einen untermauert durch die nukleäre Lokalisation eines C-terminal verkürzten Protein, welches weder RanGTP direkt binden kann, noch die NES besitzt. Des weiteren konnte ein N-terminal verkürztes Protein, das unter Wildtypbedingungen zytoplasmatische Lokalisation aufweist, über die C-terminal gelegene NES exportiert werden, jedoch RanGTP nicht direkt binden kann, durch Inhibition des Xpo1p-

vermittelten Exports im Kern akkumuliert werden. Das Ausbleiben einer nukleären Akkumulation des Gesamtproteins nach Inhibition des Xpo1p-abhängigen Exportweges könnte daher durch die Existenz eines alternativen, über die RanGTP-Bindedomäne vermittelten Exports erklärt werden.

### 5.3 Yrb30p übt möglicherweise eine Pilz-spezifische Funktion aus

Zur Identifizierung von homologen Proteinen in anderen Organismen wurde die Datenbank BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) nach Sequenz-homologen durchsucht. Auf diese Weise konnten Homologe in Hefen und anderen filamentösen Pilzen festgestellt werden (Abb. 50). Interessanterweise besitzt die Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* zwei Sequenzhomologe, die durch die Gene SPCC584.03C (S.p.-1) bzw. SPAC31A2.10 (S.p.-2) kodiert werden und 30 bzw. 31% Sequenzidentität aufweisen. Ein homologes Protein in *Candida albicans* (kodiert von Orf6.8006p) zeigt 40%-ige Sequenzidentität zu Yrb30p, ein weiteres Homologes in *Neurospora crassa* (B23I11.70) 22%-Identität. Die unvollständige Sequenz eines Gens von *Candida glabrata* läßt aufgrund seiner starken Homologie vermuten, daß auch in diesem Organismus ein Homologes zu Yrb30 existiert. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Professor Peter Philippsen (Biozentrum Basel) wurde ein weiteres Homologes in dem filamentösen Pilz *Ashbya gossypii* entdeckt.

Die Primärsequenz von Yrb30p und seinen Homologen weist keine Ähnlichkeit mit der Primärsequenz von anderen bekannten Ran-bindenden Proteinen auf. Auch seine Ran-Bindungsdomäne (in Abb. 50 flankiert von roten Pfeilen) läßt kein gemeinsames Motiv zur Ran-Bindungsdomäne von Karyopherinen oder RanBP1 erkennen, was auf eine neue Erkennungssequenz der RanGTP-Bindung hindeutet. Nicht auszuschließen ist jedoch, daß das sowohl in der Ran-Bindedomäne von Yrb1p und Yrb30p hochkonservierte 'WKE'-Motiv in beiden Fällen entscheidend zur RanGTP-Bindung beiträgt.

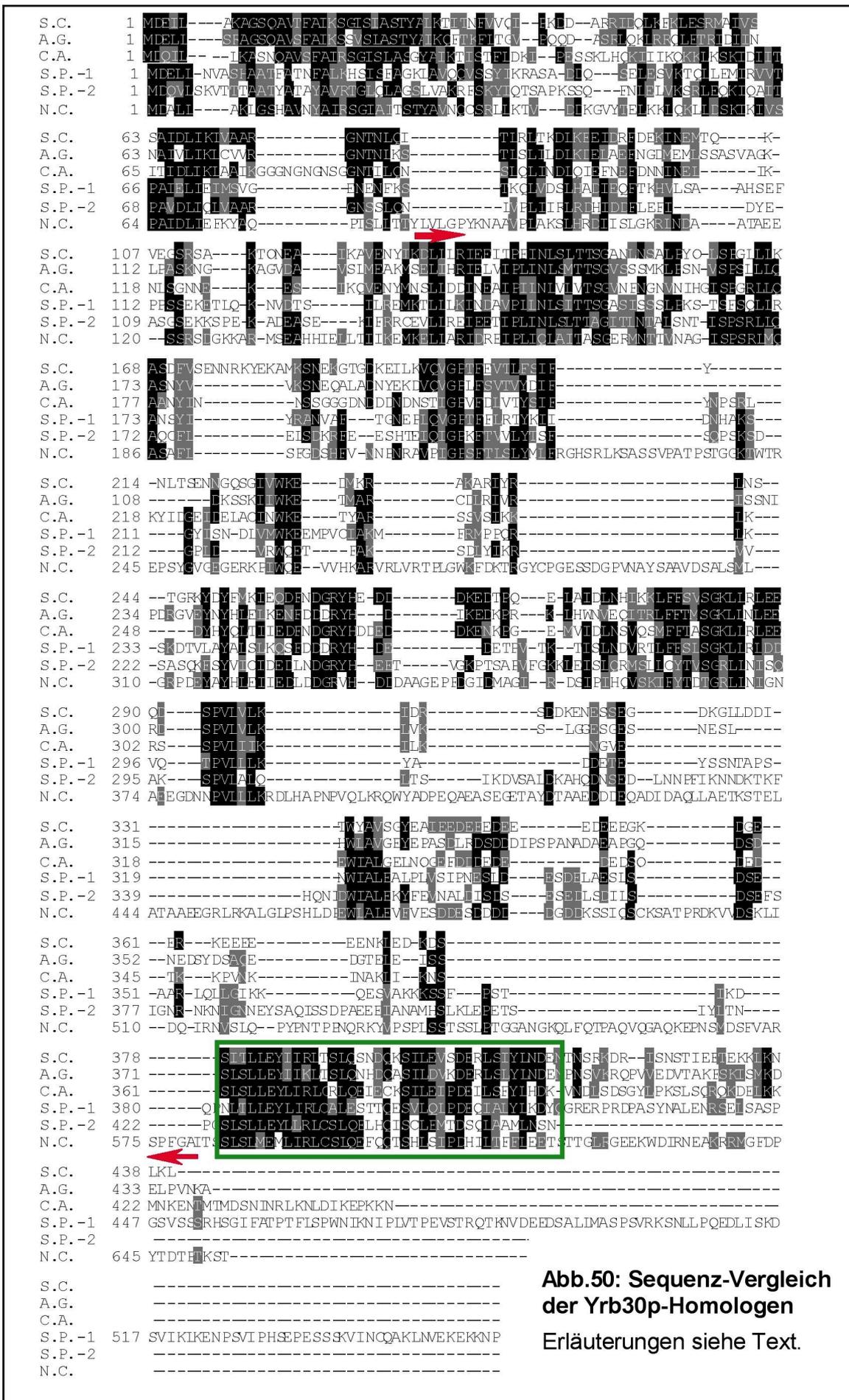


Abb.50: Sequenz-Vergleich der Yrb30p-Homologen  
Erläuterungen siehe Text.

Gut konservierte Sequenzabschnitte befinden sich insbesondere am N-terminalen Ende sowie in drei weiteren Bereichen innerhalb der RBD. Der am weitesten C-terminal gelegene Bereich hiervon konnte als funktionelle NES identifiziert werden (in Abb. 50 grün eingerahmt). Ob die andern hoch konservierten Sequenzabschnitte Bindungsbereiche für andere mit Yrb30p interagierende Proteine darstellen, ist bislang unbekannt.

Yrb30p und seine Homologen sind durchweg saure Proteine. So variiert deren isoelektrischer Punkt zwischen 4.6 (S.C.) und 5.3 (S.P.-2). Insbesondere Yrb30p und sein Homologes aus *Candida albicans* besitzen einen extrem sauren Sequenzabschnitt vor der im C-Terminus gelegenen NES. Interessanterweise weist die Sequenz von Rna1p (yRanGAP1) im C-Terminus ebenfalls einen sehr sauren Bereich auf, dem strukturelle Ähnlichkeiten mit dem erwähnten Bereich bei Yrb30p zugeschrieben werden (RCSB Protein Databank, YGL164C—1K5G(chain L)).

Die Frage nach der Funktion dieses neuen Ran-Modulators konnte nicht abschließend geklärt werden. Allerdings gibt es Hinweise auf eine mögliche Funktion von Yrb30p. So konnte gezeigt werden, daß Yrb30p und Yrb1p zwar an das gleiche Epitop auf RanGTP binden, jedoch einen gegenteiligen Effekt auf Rna1p (RanGAP1) ausüben: Während Yrb1p als Koaktivator der RanGAP-vermittelten Hydrolyse wirkt, inhibiert Yrb30p die Hydrolyse. Zudem kann Yrb30p mit RanGTP und verschiedenen Karyopherinen Komplexe bilden, so daß Yrb30p möglicherweise bestimmte Exportkomplexe vor der Dissoziation durch Yrb1p und Rna1p im Zytoplasma stabilisieren kann. Ein solcher Exportkomplex könnte undissoziiert dann zu seinem Bestimmungsort im Zytoplasma transportiert werden. Diese Einflußnahme auf den RanGTPase-Zyklus scheint jedoch für vegetatives Wachstum nicht unentbehrlich zu sein, da Disruptionen von YRB30 bzw. seinen Homologen keinen ersichtlichen Defekt aufweisen. Die Tatsache, daß keine Homologen von Yrb30p in höheren Organismen gefunden werden konnten, deutet darauf hin, daß Yrb30p möglicherweise eine spezielle Hefe- bzw. Pilz-spezifische Funktion ausübt, die in höheren Organismen nicht benötigt wird. Eine dieser Pilz-spezifischen Prozesse ist das Durchlaufen einer geschlossenen Mitose, im Gegensatz zu höheren Eukaryonten mit einer offenen Mitose. Nachdem in

höheren Organismen eine regulatorische mitotische Funktion von Ran nachgewiesen wurde, gibt es in Hefe keinen Hinweis auf eine mitotische Funktion. Auch für Yrb30p, dessen Expression während des Zellzyklus unverändert bleibt, konnte keine mitotische Funktion im Zusammenhang mit Ran nachgewiesen werden.

## 5.4 Ausblick

Mittels Punktmutationen in der Ran-Bindedomäne von Yrb30p, die zu einem Verlust der direkten Bindung an Gsp1p führen, die Bildung eines Yrb30p-Gsp1pGTP-Xpo1p-Komplexes jedoch nicht beeinträchtigen, könnte zweifelsfrei der postulierte Pendelmechanismus am Gesamtprotein verifiziert bzw. falsifiziert werden. Da unklar ist, welche Aminosäuren essentiell für die Ran-Bindung sind, muß jedoch zunächst geklärt werden, ob die Ran-Bindung durch einzelne Punktmutationen überhaupt verhindert werden kann bzw. wo diese Mutationen erfolgen sollten. Wenn ein Pendeln des Gesamtproteins zwischen Kern und Zytoplasma nachgewiesen werden könnte, wäre die Identifizierung der NLS, des den Import vermittelten Transportrezeptors sowie Studien zur Charakterisierung des postulierten RBD-vermittelten Exportweges sehr interessant. Auch funktionelle Analysen unter Verwendung der Yrb30 $\Delta$ NES-Mutante könnten neue Einblicke in die zelluläre Funktion von Yrb30p verschaffen. Auf der bisherigen Grundlage ist jedoch eine Retention des Gesamtproteins im Zytoplasma nicht vollkommen auszuschließen (auch wenn die Ergebnisse mit Deletionsmutanten für einen Pendelmechanismus sprechen). Daher wäre bei einer Falsifizierung des Pendelmechanismus eine genetische Analyse zur Identifikation der zur Retention von Yrb30p führenden cytoplasmatischen Faktoren sinnvoll.

Interessant ist eine kürzlich aus mehreren groß angelegten Expressionstudien heraus zu lesende (allerdings nicht sehr spezifische) Hochregulation der Expression von Yrb30p in Zellen, die Pseudohyphen-Wachstum zeigen. Daher sollte auch dies in entsprechend befähigten Hefestämmen bei weiteren Untersuchungen unbedingt überprüft werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adam, S. A. (1999). Transport pathways of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol* 11(3), 402-406.
- Allen, N. P., Huang, L., Burlingame, A. und Rexach, M. (2001). Proteomic analysis of nucleoporin interacting proteins. *J Biol Chem* 276(31), 29268-29274.
- Allen, T. D., Cronshaw, J. M., Bagley, S., Kiseleva, E. und Goldberg, M. W. (2000). The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. *J Cell Sci* 113, 1651-1659.
- Arts, G. J., Fornerod, M. und Mattaj, I. W. (1998a). Identification of a nuclear export receptor for tRNA. *Curr Biol* 8(6), 305-314.
- Arts, G. J., Kuersten, S., Romby, P., Ehresmann, B. und Mattaj, I. W. (1998b). The role of exportin-t in selective nuclear export of mature tRNAs. *Embo J* 17(24), 7430-7441.
- Askjaer, P., Bachi, A., Wilm, M., Bischoff, F. R., Weeks, D. L., Ogniewski, V., Ohno, M., Niehrs, C., Kjems, J., Mattaj, I. W. und Fornerod, M. (1999). RanGTP-regulated interactions of CRM1 with nucleoporins and a shuttling DEAD-box helicase. *Mol Cell Biol* 19(9), 6276-6285.
- Askjaer, P., Jensen, T. H., Nilsson, J., Englmeier, L. und Kjems, J. (1998). The specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP. *J Biol Chem* 273(50), 33414-33422.
- Azuma, Y. und Dasso, M. (2000). The role of Ran in nuclear function. *Curr Opin Cell Biol* 12(3), 302-307.
- Bartel, P. L. und Fields, S. (1995). Analyzing protein-protein interactions using two-hybrid system. *Methods Enzymol* 254, 241-263.
- Baßler, J. (2001). Isolierung eines nukleären 60S-Präribosoms, das ein Exportintermediat ins Zytoplasma darstellt. Doktorarbeit, Universität Heidelberg,
- Bäumer, M., Künzler, M., Steigemann, P., Braus, G. H. und Irniger, S. (2000). Yeast Ran-binding protein Yrb1p is required for efficient proteolysis of the cell cycle regulatory proteins Pds1p and Sic1p. *J Biol Chem* 275, 38929-38937.
- Bayliss, R., Littlewood, T. und Stewart, M. (2000). Structural basis for the interaction between FxFG nucleoporin repeats and importin-beta in nuclear trafficking. *Cell* 102(1), 99-108.
- Belhumeur, P., Lee, A., Tam, R., DiPaolo, T., Fortin, N. und Clark, M. W. (1993). GSP1 and GSP2, genetic suppressors of the prp20-1 mutant in *Saccharomyces cerevisiae*: GTP-binding proteins involved in the maintenance of nuclear organization. *Mol Cell Biol* 13(4), 2152-2161.
- Ben-Efraim, I. und Gerace, L. (2001). Gradient of increasing affinity of importin beta for nucleoporins along the pathway of nuclear import. *J Cell Biol* 152(2), 411-417.

- Bender, A. und Pringle, J. R. (1991). Use of a screen for synthetic lethal and multicopy suppressor mutants to identify two new genes involved in morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 11(3), 1295-305.
- Bilbao-Cortés, D., Hetzer, M., Längst, G., Becker, P. B. und Mattaj, I. W. (2002). Ran Binds to Chromatin by Two Distinct Mechanisms. *Curr Biol* 12, 1151-1156.
- Bischoff, F. R. und Görlich, D. (1997). RanBP1 is crucial for the release of RanGTP from importin beta-related nuclear transport factors. *FEBS Lett* 419(2-3), 249-254.
- Bischoff, F. R., Klebe, C., Kretschmer, J., Wittinghofer, A. und Ponstingl, H. (1994). RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear Ras-related Ran. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(7), 2587-2591.
- Bischoff, F. R., Krebber, H., Smirnova, E., Dong, W. und Ponstingl, H. (1995). Co-activation of RanGTPase and inhibition of GTP dissociation by Ran- GTP binding protein RanBP1. *Embo J* 14(4), 705-715.
- Bischoff, F. R. und Ponstingl, H. (1991). Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature* 354(6348), 80-82.
- Bischoff, F. R. und Ponstingl, H. (1995). Catalysis of guanine nucleotide exchange of Ran by RCC1 and stimulation of hydrolysis of Ran-bound GTP by Ran-GAP1. *Methods Enzymol* 257, 135-144.
- Bischoff, F. R. und Postingl, H. (1991). Mitotic regulator protein RCC1 is complexed with a nuclear ras-related polypeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 10830-10834.
- Black, B. E., Holaska, J. M., Levesque, L., Ossareh-Nazari, B., Gwizdek, C., Dargemont, C. und Paschal, B. M. (2001). NXT1 Is Necessary for the Terminal Step of Crm1-mediated Nuclear Export. *J Cell Biol* 152(1), 141-156.
- Black, B. E., Levesque, L., Holaska, J. M., Wood, T. C. und Paschal, B. M. (1999). Identification of an NTF2-related factor that binds Ran-GTP and regulates nuclear protein export. *Mol Cell Biol* 19(12), 8616-8624.
- Blondel, M., Alepuz, P. M., Huang, L. S., Shaham, S., Ammerer, G. und Peter, M. (1999). Nuclear export of Far1p in response to pheromones requires the export receptor Msn5p/Ste21p. *Genes Dev* 13(17), 2284-2300.
- Bodoor, K., Shaikh, S., Salina, D., Raharjo, W. H., Bastos, R., Lohka, M. und Burke, B. (1999). Sequential recruitment of NPC proteins to the nuclear periphery at the end of mitosis. *J Cell Sci* 112, 2253-2264.
- Booth, J. W., Belanger, K. D., Sannella, M. I. und Davis, L. I. (1999). The yeast nucleoporin Nup2p is involved in nuclear export of importin alpha/Srp1p. *J Biol Chem* 274, 32360-32367.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A. und McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349, 117-127.

- Butty, A. C., Pryciak, P. M., Huang, L. S., Herskowitz, I. und Peter, M. (1998). The role of Far1p in linking the heterotrimeric G protein to polarity establishment proteins during yeast mating. *Science* 282(5393), 1511-1516.
- Carazo-Salas, R. E., Guarguaglini, G., Gruss, O. J., Segref, A., Karsenti, E. und Mattaj, I. W. (1999). Generation of GTP-bound Ran by RCC1 is required for chromatin-induced mitotic spindle formation. *Nature* 400(6740), 178-181.
- Chaillan-Huntington, C., Braslavsky, C. V., Kuhlmann, J. und Stewart, M. (2000). Dissecting the interactions between NTF2, RanGDP, and the nucleoporin XFXFG repeats [In Process Citation]. *J Biol Chem* 275(8), 5874-5879.
- Chaillan-Huntington, C., Butler, P. J., Huntington, J. A., Akin, D., Feldherr, C. und Stewart, M. (2001). NTF2 monomer-dimer equilibrium. *J Mol Biol* 314(3), 465-477.
- Chook, Y. M. und Blobel, G. (1999). Structure of the nuclear transport complex karyopherin-beta2-Ran x GppNHp [see comments]. *Nature* 399(6733), 230-237.
- Clarkson, W. D., Corbett, A. H., Paschal, B. M., Kent, H. M., McCoy, A. J., Gerace, L., Silver, P. A. und Stewart, M. (1997). Nuclear protein import is decreased by engineered mutants of nuclear transport factor 2 (NTF2) that do not bind GDP-Ran. *J Mol Biol* 272(5), 716-730.
- Clouse, K. N., Luo, M. J., Zhou, Z. und Reed, R. (2001). A Ran-independent pathway for export of spliced mRNA. *Nat Cell Biol* 3(1), 97-99.
- Corbett, A. H. und Silver, P. A. (1996). The NTF2 gene encodes an essential, highly conserved protein that functions in nuclear transport in vivo. *J Biol Chem* 271(31), 18477-18484.
- Cronshaw, J. M., Krutchinsky, A. N., Zhang, W., Chait, B. T. und Matunis, M. J. (2002). Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol* 158(5), 915-927.
- Dasso, M. (2001). Running on Ran: nuclear transport and the mitotic spindle. *Cell* 104(3), 321-324.
- Dasso, M., Seki, T., Azuma, Y., Ohba, T. und Nishimoto, T. (1994). A mutant form of the Ran/TC4 protein disrupts nuclear function in *Xenopus laevis* egg extracts by inhibiting the RCC1 protein, a regulator of chromosome condensation. *Embo J* 13(23), 5732-5744.
- Deane, R., Schafer, W., Zimmermann, H. P., Mueller, L., Görlich, D., Prehn, S., Ponstingl, H. und Bischoff, F. R. (1997). Ran-binding protein 5 (RanBP5) is related to the nuclear transport factor importin-beta but interacts differently with RanBP1. *Mol Cell Biol* 17(9), 5087-5096.
- Denning, D., Mykytka, B., Allen, N. P., Huang, L., Ai, B. und Rexach, M. (2001). The nucleoporin Nup60p functions as a Gsp1p-GTP-sensitive tether for Nup2p at the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 154(5), 937-950.
- Doye, V. und Hurt, E. C. (1995). Genetic approaches to nuclear pore structure and function. *Trends Genet* 11(6), 235-241.

- Enenkel, C., Blobel, G. und Rexach, M. (1995). Identification of a yeast karyopherin heterodimer that targets import substrate to mammalian nuclear pore complexes. *J Biol Chem* 270(28), 16499-16502.
- Englmeier, L., Olivo, J. C. und Mattaj, I. W. (1999). Receptor-mediated substrate translocation through the nuclear pore complex without nucleotide triphosphate hydrolysis. *Curr Biol* 9(1), 30-41.
- Fabre, E. und Hurt, E. (1997). Yeast genetics to dissect the nuclear pore complex and nucleocytoplasmic trafficking. *Annu Rev Genet* 31, 277-313.
- Feldherr, C. M., Kallenbach, E. und Schultz, N. (1984). Movement of a karyophilic protein through the nuclear pores of oocytes. *J Cell Biol* 99, 2216-2222.
- Feng, W., Benko, A. L., Lee, J. H., Stanford, D. R. und Hopper, A. K. (1999). Antagonistic effects of NES and NLS motifs determine *S. cerevisiae* Rna1p subcellular distribution. *J Cell Sci* 112(Pt 3), 339-347.
- Ferrigno, P., Posas, F., Koepp, D., Saito, H. und Silver, P. A. (1998). Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1. *Embo J* 17(19), 5606-5614.
- Fields, S. und Song, O. K. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246.
- Fleig, U., Salus, S. S., Karig, I. und Sazer, S. (2000). The fission yeast ran GTPase is required for microtubule integrity. *J Cell Biol* 151(5), 1101-1112.
- Floer, M., Blobel, G. und Rexach, M. (1997). Disassembly of RanGTP-karyopherin beta complex, an intermediate in nuclear protein import. *J Biol Chem* 272(31), 19538-19546.
- Fontoura, B. M., Blobel, G. und Yaseen, N. R. (2000). The nucleoporin Nup98 is a site for GDP/GTP exchange on ran and termination of karyopherin beta 2-mediated nuclear import. *J Biol Chem* 275(40), 31289-31296.
- Fornierod, M., Ohno, M., Yoshida, M. und Mattaj, I. W. (1997). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 90(6), 1051-1060.
- Fribourg, S., Braun, I. C., Izaurralde, E. und 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(3), 645-656.
- Gadal, O., Strauss, D., Braspenning, J., Hoepfner, D., Petfalski, E., Philippsen, P., Tollervey, D. und Hurt, E. (2001a). A nuclear AAA-type ATPase (Rix7p) is required for biogenesis and nuclear export of 60S ribosomal subunits. *Embo J* 20(14), 3695-3704.
- Gadal, O., Strauss, D., Kessler, J., Trumppower, B., Tollervey, D. und Hurt, E. (2001b). Nuclear export of 60s ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence-containing factor, Nmd3p, that associates with the large subunit protein Rpl10p. *Mol Cell Biol* 21(10), 3405-3415.

- Galy, V., Olivo-Marin, J. C., Scherthan, H., Doye, V., Rascalou, N. und Nehrbass, U. (2000). Nuclear pore complexes in the organization of silent telomeric chromatin. *Nature* 403(6765), 108-112.
- Görlich, D., Kostka, S., Kraft, R., Dingwall, C., Laskey, R. A., Hartmann, E. und Prehn, S. (1995). Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. *Curr Biol* 5(4), 383-392.
- Görlich, D. und Kutay, U. (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 607-660.
- Grosshans, H., Deinert, K., Hurt, E. und Simos, G. (2001). Biogenesis of the signal recognition particle (SRP) involves import of SRP proteins into the nucleolus, assembly with the SRP-RNA, and Xpo1p-mediated export. *J Cell Biol* 153(4), 745-762.
- Grosshans, H., Hurt, E. und Simos, G. (2000a). An aminoacylation-dependent nuclear tRNA export pathway in yeast. *Genes Dev* 14(7), 830-840.
- Grosshans, H., Simos, G. und Hurt, E. (2000b). Review: transport of tRNA out of the nucleus-direct channeling to the ribosome? *J Struct Biol* 129(2-3), 288-294.
- Gruss, O. J., Carazo-Salas, R. E., Schatz, C. A., Guarguaglini, G., Kast, J., Wilm, M., Le Bot, N., Vernos, I., Karsenti, E. und Mattaj, I. W. (2001). Ran Induces Spindle Assembly by Reversing the Inhibitory Effect of Importin alpha on TPX2 Activity. *Cell* 104(1), 83-93.
- Guarguaglini, G., Renzi, L., D'Ottavio, F., Di Fiore, B., Casenghi, M., Cundari, E. und Lavia, P. (2000). Regulated Ran-binding protein 1 activity is required for organization and function of the mitotic spindle in mammalian cells in vivo. *Cell Growth Differ* 11(8), 455-465.
- Guzik, B. W., Levesque, L., Prasad, S., Bor, Y. C., Black, B. E., Paschal, B. M., Rekosh, D. und Hammarskjöld, 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(7), 2545-2554.
- Hampsey, M. (1997). A review of phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13(12), 1099-1133.
- Haraguchi, T., Koujin, T., Hayakawa, T., Kaneda, T., Tsutsumi, C., Imamoto, N., Akazawa, C., Sukegawa, J., Yoneda, Y. und Hiraoka, Y. (2000). Live fluorescence imaging reveals early recruitment of emerin, LBR, RanBP2, and Nup153 to reforming functional nuclear envelopes. *J Cell Sci* 113, 779-794.
- Hellmuth, K., Lau, D. M., Bischoff, F. R., Künzler, M., Hurt, E. und Simos, G. (1998). Yeast Los1p has properties of an exportin-like nucleocytoplasmic transport factor for tRNA. *Mol Cell Biol* 18(11), 6374-6386.
- Herold, A., Suyama, M., Rodrigues, J. P., Braun, I. C., Kutay, U., Carmo-Fonseca, M., Bork, P. und Izaurralde, E. (2000). TAP (NXF1) belongs to a multigene family of putative RNA export factors with a conserved modular architecture. *Mol Cell Biol* 20(23), 8996-9008.

- Hetzer, M., Bilbao-Cortes, D., Walther, T. C., Gruss, O. J. und Mattaj, I. W. (2000). GTP hydrolysis by Ran is required for nuclear envelope assembly. *Mol Cell* 5(6), 1013-1024.
- Hetzer, M., Gruss, O. J. und Mattaj, I. W. (2002). The Ran GTPase as a marker of chromosome position in spindle formation and nuclear envelope assembly. *Nature Cell Biol* 4, E177-E184.
- Hetzer, M. und Mattaj, I. W. (2000). An ATP-dependent, Ran-independent mechanism for nuclear import of the U1A and U2B" spliceosome proteins. *J Cell Biol* 148(2), 293-303.
- Hetzer, M., Meyer, H. H., Walther, T. C., Bilbao-Cortes, D., Warren, G. und Mattaj, I. W. (2001). Distinct AAA-ATPase p97 complexes function in discrete steps of nuclear assembly. *Nat Cell Biol* 3(12), 1086-1091.
- Hillig, R. C., Renault, L., Vetter, I. R., Drell, T. t., Wittinghofer, A. und Becker, J. (1999). The crystal structure of rna1p: a new fold for a GTPase-activating protein. *Mol Cell* 3(6), 781-791.
- Ho, J. H., Kallstrom, G. und Johnson, A. W. (2000). Nmd3p is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit. *J Cell Biol* 151(5), 1057-1066.
- Hood, J. K., Casolari, J. M. und Silver, P. A. (2000). Nup2p is located on the nuclear side of the nuclear pore complex and coordinates Srp1p/importin-alpha export. *J Cell Sci* 113(Pt 8), 1471-1480.
- Huber, J., Cronshagen, U., Kadokura, M., Marshallsay, C., Wada, T., Sekine, M. und Luhrmann, R. (1998). Snurportin1, an m3G-cap-specific nuclear import receptor with a novel domain structure. *Embo J* 17(14), 4114-4126.
- Huber, J., Dickmanns, A. und Luhrmann, R. (2002). The importin- $\beta$  binding domain of snurportin1 is responsible for the Ran- and energy-independent nuclear import of spliceosomal U snRNPs in vitro. *J Cell Biol* 156(3), 467-479.
- Hughes, M., Zhang, C., Avis, J. M., Hutchison, C. J. und Clarke, P. R. (1998). The role of the ran GTPase in nuclear assembly and DNA replication: characterisation of the effects of Ran mutants. *J Cell Sci* 111(Pt 20), 3017-3026.
- Hurt, D. J., Wang, S. S., Lin, Y. H. und Hopper, A. K. (1987). Cloning and characterization of LOS1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene that affects tRNA splicing. *Mol Cell Biol* 7(3), 1208-1216.
- Hurt, E., Hannus, S., Schmelzl, B., Lau, D., Tollervey, D. und Simos, G. (1999). A Novel In Vivo Assay Reveals Inhibition of Ribosomal Nuclear Export in Ran-Cycle and Nucleoporin Mutants. *J Cell Biol* 144(3), 389-401.
- Hurt, E. C. (1996). Importins/Karyopherins Meet Nucleoporins. *Cell* 84, 509-515.
- Ito, H., Fukada, Y., Murata, K. und Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells with alkali cations. *J Bacteriol* 153, 163-168.

- Izaurrealde, E., Stepinski, J., Darzynkiewicz, E. und Mattaj, I. W. (1992). A cap binding protein that may mediate nuclear export of RNA polymerase II-transcribed RNAs. *J Cell Biol* 118(6), 1287-1295.
- Jäkel, S., Mingot, J. M., Schwarzmaier, P., Hartmann, E. und Görlich, D. (2002). Importins fulfil a dual function as nuclear import receptors and cytoplasmic chaperones for exposed basic domains. *Embo J* 21(3), 377-386.
- Joseph, J., Tan, S. H., Karpova, T. S., McNally, J. G. und Dasso, M. (2002). SUMO-1 targets RanGAP1 to kinetochores and mitotic spindles. *J Cell Biol* 156(4), 595-602.
- Kadowaki, T., Chen, S., Hitomi, M., Jacobs, E., Kumagai, C., Liang, S., Schneiter, R., Singleton, D., Wisniewska, J. und Tartakoff, A. M. (1994). Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mRNA transport-defective (mtr) mutants. *J Cell Biol* 126(3), 649-659.
- Kalab, P., Pu, R. T. und Dasso, M. (1999). The ran GTPase regulates mitotic spindle assembly. *Curr Biol* 9(9), 481-484.
- Kalab, P., Weis, K. und Heald, R. (2002). Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic *Xenopus* egg extracts. *Science* 295(5564), 2452-2456.
- Katahira, J., Strasser, K., Podtelejnikov, A., Mann, M., Jung, J. U. und Hurt, E. (1999). The Mex67p-mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human. *Embo J* 18(9), 2593-2609.
- Kehlenbach, R. H., Dickmanns, A., Kehlenbach, A., Guan, T. und Gerace, L. (1999). A Role for RanBP1 in the Release of CRM1 from the Nuclear Pore Complex in a Terminal Step of Nuclear Export. *J Cell Biol* 145(4), 645-657.
- Klebe, C., Bischoff, F. R., Ponstingl, H. und Wittinghofer, A. (1995). Interaction of the nuclear GTP-binding protein Ran with its regulatory proteins RCC1 and RanGAP1. *Biochemistry* 34, 639-647.
- Kornbluth, S., Dasso, M. und Newport, J. (1994). Evidence for a dual role for TC4 protein in regulating nuclear structure and cell cycle progression. *J Cell Biol* 125(4), 705-719.
- Kosova, B., Pante, N., Rollenhagen, C., Podtelejnikov, A., Mann, M., Aebi, U. und Hurt, E. (2000). Mlp2p, a component of nuclear pore attached intranuclear filaments, associates with nic96p. *J Biol Chem* 275(1), 343-350.
- Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E. P., Wolff, B., Yoshida, M. und Horinouchi, S. (1999). Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region [In Process Citation]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(16), 9112-9117.
- Kudo, N., Wolff, B., Sekimoto, T., Schreiner, E. P., Yoneda, Y., Yanagida, M., Horinouchi, S. und Yoshida, M. (1998). Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Exp Cell Res* 242(2), 540-547.

- Künzler, M., Gerstberger, T., Stutz, F., Bischoff, F. R. und Hurt, E. (2000). Yeast Ran-binding protein 1 (Yrb1) shuttles between the nucleus and cytoplasm and is exported from the nucleus via a CRM1 (XPO1)-dependent pathway. *Mol Cell Biol* 20(12), 4295-4308.
- Künzler, M. und Hurt, E. (2001). Targeting of Ran: variation on a common theme? *J Cell Sci* 114(Pt 18), 3233-3241.
- Künzler, M. und Hurt, E. C. (1998). Cse1p functions as the nuclear export receptor for importin alpha in yeast. *FEBS Lett* 433(3), 185-190.
- Künzler, M., Trueheart, J., Sette, C., Hurt, E. und Thorner, J. (2001). Mutations in the yrb1 gene encoding yeast ran-binding-protein-1 that impair nucleocytoplasmic transport and suppress yeast mating defects. *Genetics* 157(3), 1089-1105.
- Kutay, U., Bischoff, F. R., Kostka, S., Kraft, R. und Görlich, D. (1997). Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell* 90(6), 1061-1071.
- Kutay, U., Lipowsky, G., Izaurralde, E., Bischoff, F. R., Schwarzmaier, P., Hartmann, E. und Görlich, D. (1998). Identification of a tRNA-specific nuclear export receptor. *Mol Cell* 1(3), 359-369.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of head bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lau, D., Künzler, M., Braunwarth, A., Hellmuth, K., Podtelejnikov, A., Mann, M. und Hurt, E. (2000). Purification of protein A-tagged yeast ran reveals association with a novel karyopherin beta family member, Pdr6p. *J Biol Chem* 275(1), 467-471.
- Lee, D. C. und Aitchison, J. D. (1999). Kap104p-mediated nuclear import. Nuclear localization signals in mrna- binding proteins and the role of ran and rna [In Process Citation]. *J Biol Chem* 274(41), 29031-29037.
- Legrain, P. und Rosbash, M. (1989). Some cis- and trans-acting mutants for splicing target pre-mRNA to the cytoplasm. *Cell* 57(4), 573-583.
- Leslie, D. M., Grill, B., Rout, M. P., Wozniak, R. W. und Aitchison, J. D. (2002). Kap121p-mediated nuclear import is required for mating and cellular differentiation in yeast. *Mol Cell Biol* 22(8), 2544-2555.
- Lindsay, M. E., Holaska, J. M., Welch, K., Paschal, B. M. und Macara, I. G. (2001). Ran-binding protein 3 is a cofactor for Crm1-mediated nuclear protein export. *J Cell Biol* 153(7), 1391-1402.
- Lipowski, G., Bischoff, F. R., Izaurralde, E., Kutay, U., Schäfer, S., Gross, H. J., Beier, H. und Görlich, D. (1999). Coordination of tRNA nuclear export with processing of tRNA. *RNA* 5, 539-549.
- Loeb, J. D., Schlenstedt, G., Pellman, D., Kornitzer, D., Silver, P. A. und Fink, G. R. (1995). The yeast nuclear import receptor is required for mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(17), 7647-7651.

- Lounsbury, K. M. und Macara, I. G. (1997). Ran-binding protein 1 (RanBP1) forms a ternary complex with Ran and karyopherin beta and reduces Ran GTPase-activating protein (RanGAP) inhibition by karyopherin beta. *J Biol Chem* 272(1), 551-555.
- Lund, E. und Dahlberg, J. E. (1998). Proofreading and aminoacylation of tRNAs before export from the nucleus. *Science* 282(5396), 2082-2085.
- Macara, I. G. (2001). Transport into and out of the nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev* 65(4), 570-594.
- Macaulay, C. und Forbes, D. J. (1996). Assembly of the nuclear pore: biochemically distinct steps revealed with NEM, GTP gamma S, and BAPTA. *J Cell Biol* 132, 5-20.
- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L. und Melchior, F. (1997). A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 88(1), 97-107.
- Mahanty, S. K., Wang, Y., Farley, F. W. und Elion, E. A. (1999). Nuclear shuttling of yeast scaffold Ste5 is required for its recruitment to the plasma membrane and activation of the mating MAPK cascade. *Cell* 98(4), 501-512.
- Marfatia, K. A., Harreman, M. T., Fanara, P., Vertino, P. M. und Corbett, A. H. (2001). Identification and characterization of the human MOG1 gene. *Gene* 266(1-2), 45-56.
- Mattaj, I. W. und Englmeier, L. (1998). Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem* 67, 265-306.
- Matunis, M. J., Coutavas, E. und Blobel, G. (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 135(6 Pt 1), 1457-1470.
- Matunis, M. J., Wu, J. und Blobel, G. (1998). SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 140(3), 499-509.
- Milkereit, P., Gadal, O., Podtelejnikov, A., Trumtel, S., Gas, N., Petfalski, E., Tollervey, D., Mann, M., Hurt, E. und Tschochner, H. (2001). Maturation and intranuclear transport of pre-ribosomes requires Noc proteins. *Cell* 105(4), 499-509.
- Mingot, J. M., Kostka, S., Kraft, R., Hartmann, E. und Görlich, D. (2001). Importin 13: a novel mediator of nuclear import and export. *Embo J* 20(14), 3685-3694.
- Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M. und Tollervey, D. (1997). The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'-->5' exoribonucleases. *Cell* 91(4), 457-466.
- Moore, J. D. (2001). The Ran-GTPase and cell-cycle control. *Bioessays* 23(1), 77-85.

- Moore, J. W., Zhang, C. und Clarke, P. R. (2002). Targeting of RCC1 to Chromosomes Is Required for Proper Mitotic Spindle Assembly in Human Cells. *Curr Biol* 12, 1442-1447.
- Moore, M. S. und Blobel, G. (1993). The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature* 365(6447), 661-663.
- Moore, M. S. und Blobel, G. (1994). Purification of a Ran-interacting protein that is required for protein import into the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(21), 10212-10216.
- Morehouse, H., Buratowski, R. M., Silver, P. A. und Buratowski, S. (1999). The importin/karyopherin Kap114 mediates the nuclear import of TATA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(22), 12542-12547.
- Moy, T. I. und Silver, P. A. (1999). Nuclear export of the small ribosomal subunit requires the ran-GTPase cycle and certain nucleoporins. *Genes Dev* 13(16), 2118-2133.
- Mueller, L., Cordes, V. C., Bischoff, F. R. und Ponstingl, H. (1998). Human RanBP3, a group of nuclear RanGTP binding proteins. *FEBS Lett* 427(3), 330-336.
- Nachury, M. V., Maresca, T. J., Salmon, W. C., Waterman-Storer, C. M., Heald, R. und Weis, K. (2001). Importin beta Is a Mitotic Target of the Small GTPase Ran in Spindle Assembly. *Cell* 104(1), 95-106.
- Nakamura, M., Masuda, H., Horii, J., Kuma, K., Yokoyama, N., Ohba, T., Nishitani, H., Miyata, T., Tanaka, M. und Nishimoto, T. (1998). When overexpressed, a novel centrosomal protein, RanBPM, causes ectopic microtubule nucleation similar to gamma-tubulin. *J Cell Biol* 143(4), 1041-1052.
- Nehrbass, U. und Blobel, G. (1996). Role of the nuclear transport factor p10 in nuclear import. *Science* 272(5258), 120-122.
- Nemergut, M. E., Mizzen, C. A., Stukenberg, T., Allis, C. D. und Macara, I. G. (2001). Chromatin docking and exchange activity enhancement of RCC1 by histones H2A and H2B. *Science* 292(5521), 1540-1543.
- Neville, M. und Rosbash, M. (1999). The NES-Crm1p export pathway is not a major mRNA export route in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 18(13), 3746-3756.
- Nicolas, F. J., Moore, W. J., Zhang, C. und Clarke, P. R. (2001). XMog1, a nuclear ran-binding protein in *Xenopus*, is a functional homologue of *Schizosaccharomyces pombe* mog1p that co-operates with RanBP1 to control generation of Ran-GTP. *J Cell Sci* 114(Pt 16), 3013-3023.
- Noguchi, E., Hayashi, N., Azuma, Y., Seki, T., Nakamura, M., Nakashima, N., Yanagida, M., He, X., Mueller, U., Sazer, S. und Nishimoto, T. (1996). Dis3, implicated in mitotic control, binds directly to Ran and enhances the GEF activity of RCC1. *Embo J* 15(20), 5595-5605.
- Ohtsubo, M., Okazaki, H. und Nishimoto, T. (1989). The RCC1 protein, a regulator for the onset of chromosome condensation locates in the nucleus and binds to DNA. *J Cell Biol* 109, 1389-1397.

- Oki, M. und Nishimoto, T. (1998). A protein required for nuclear-protein import, Mog1p, directly interacts with GTP-Gsp1p, the *Saccharomyces cerevisiae* ran homologue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26), 15388-15393.
- Oki, M. und Nishimoto, T. (2000). Yrb1p interaction with the gsp1p C terminus blocks Mog1p stimulation of GTP release from Gsp1p. *J Biol Chem* 275(42), 32894-32900.
- Ossareh-Nazari, B., Maison, C., Black, B. E., Levesque, L., Paschal, B. M. und Dargemont, C. (2000). RanGTP-binding protein NXT1 facilitates nuclear export of different classes of RNA in vitro. *Mol Cell Biol* 20(13), 4562-4571.
- Paraskeva, E., Izaurralde, E., Bischoff, F. R., Huber, J., Kutay, U., Hartmann, E., Luhrmann, R. und Görlich, D. (1999). CRM1-mediated recycling of snurportin 1 to the cytoplasm. *J Cell Biol* 145(2), 255-264.
- Paschal, B. M., Delphin, C. und Gerace, L. (1996). Nucleotide-specific interaction of Ran/TC4 with nuclear transport factors NTF2 and p97. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(15), 7679-7683.
- Paschal, B. M., Fritze, C., Guan, T. und Gerace, L. (1997). High levels of the GTPase Ran/TC4 relieve the requirement for nuclear protein transport factor 2. *J Biol Chem* 272(34), 21534-21539.
- Paschal, B. M. und Gerace, L. (1995). Identification of NTF2, a cytosolic factor for nuclear import that interacts with nuclear pore complex protein p62. *J Cell Biol* 129(4), 925-937.
- Pemberton, L. F., Rosenblum, J. S. und 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(7), 1407-1417.
- Plafker, K. und Macara, I. G. (2000). Facilitated nucleocytoplasmic shuttling of the Ran binding protein RanBP1. *Mol Cell Biol* 20(10), 3510-3521.
- Quimby, B. B., Leung, S. W., Bayliss, R., Harreman, M. T., Thirumala, G., Stewart, M. und Corbett, A. H. (2001). Functional analysis of the hydrophobic patch on nuclear transport factor 2 involved in interactions with the nuclear pore in vivo. *J Biol Chem* 276(42), 38820-38829.
- Quimby, B. B., Wilson, C. A. und Corbett, A. H. (2000). The interaction between ran and NTF2 is required for cell cycle progression. *Mol Biol Cell* 11(8), 2617-2629.
- Renault, L., Kuhlmann, J., Henkel, A. und Wittinghofer, A. (2001). Structural basis for guanine nucleotide exchange on Ran by the regulator of chromosome condensation (RCC1). *Cell* 105, 245-255.
- Ribbeck, K. und Görlich, D. (2001). Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *Embo J* 20(6), 1320-1330.
- Ribbeck, K. und Görlich, D. (2002). The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion. *Embo J* 21(11), 2664-2671.

- Ribbeck, K., Lipowsky, G., Kent, H. M., Stewart, M. und Görlich, D. (1998). NTF2 mediates nuclear import of Ran. *Embo J* 17(22), 6587-6598.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M. und Seraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* 17(10), 1030-1032.
- Rout, M. P. und Aitchison, J. D. (2001). The nuclear pore complex as a transport machine. *J Biol Chem* 276(20), 16593-16596.
- Rout, M. P., Aitchison, J. D., Suprpto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y. und Chait, B. T. (2000). The Yeast Nuclear Pore Complex. Composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol* 148(4), 635-652.
- Rout, M. P., Blobel, G. und Aitchison, J. D. (1997). A distinct nuclear import pathway used by ribosomal proteins. *Cell* 89(5), 715-725.
- Sambrook, J. und Russel, D. W. e. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Santos-Rosa, H., Moreno, H., Simos, G., Segref, A., Fahrenkrog, B., Pante, N. und Hurt, E. (1998). Nuclear mRNA export requires complex formation between Mex67p and Mtr2p at the nuclear pores. *Mol Cell Biol* 18(11), 6826-6838.
- Sarkar, S., Azad, A. K. und Hopper, A. K. (1999). Nuclear tRNA aminoacylation and its role in nuclear export of endogenous tRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(25), 14366-14371.
- Sazer, S. und Dasso, M. (2000). The ran decathlon: multiple roles of Ran. *J Cell Sci* 113(Pt 7), 1111-1118.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M. R. und Wittinghofer, A. (1998). GTPase-activating proteins: helping hands to complement an active site. *Trends Biochem Sci* 23(7), 257-262.
- Schlenstedt, G., Smirnova, E., Deane, R., Solsbacher, J., Kutay, U., Görlich, D., Ponstingl, H. und Bischoff, F. R. (1997). Yrb4p, a yeast ran-GTP-binding protein involved in import of ribosomal protein L25 into the nucleus. *Embo J* 16(20), 6237-6249.
- Schlenstedt, G., Wong, D. H., Koepp, D. M. und Silver, P. A. (1995). Mutants in a yeast Ran binding protein are defective in nuclear transport. *Embo J* 14(21), 5367-5378.
- Schmitt, C., von Kobbe, C., Bachi, A., Pant, N., Rodrigues, J. P., Boscheron, C., Rigaut, G., Wilm, M., B, S. r., Carmo-Fonseca, M. und 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(15), 4332-4347.
- Schroeder, A. J., Chen, X. H., Xiao, Z. und Fitzgerald-Hayes, M. (1999). Genetic evidence for interactions between yeast importin alpha (Srp1p) and its nuclear export receptor, Cse1p. *Mol Gen Genet* 261(4-5), 788-795.

- Seedorf, M., Damelin, M., Kahana, J., Taura, T. und Silver, P. A. (1999). Interactions between a nuclear transporter and a subset of nuclear pore complex proteins depend on Ran GTPase. *Mol Cell Biol* 19(2), 1547-1557.
- Seedorf, M. und Silver, P. A. (1997). Importin/karyopherin protein family members required for mRNA export from the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(16), 8590-8595.
- Seewald, M. J., Korner, C., Wittinghofer, A. und Vetter, I. R. (2002). RanGAP mediates GTP hydrolysis without an arginine finger. *Nature* 415(6872), 662-666.
- Segref, A., Sharma, K., Doye, V., Hellwig, A., Huber, J., Luhrmann, R. und Hurt, E. (1997). Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)<sup>+</sup> RNA and nuclear pores. *Embo J* 16(11), 3256-3271.
- Seki, T., Hayashi, N. und Nishimoto, T. (1996). RCC1 in the Ran pathway. *J Biochem* 120, 207-214.
- Senger, B., Simos, G., Bischoff, F. R., Podtelejnikov, A., Mann, M. und Hurt, E. (1998). Mtr10p functions as a nuclear import receptor for the mRNA-binding protein Npl3p. *Embo J* 17(8), 2196-2207.
- Sherman, F. (1991). Guide to yeast genetics and molecular biology. Getting started with yeast. *Methods Enzymol* 194, 3-20.
- Singh, B. B., Patel, H. H., Roepman, R., Schick, D. und Ferreira, P. A. (1999). The zinc finger cluster domain of RanBP2 is a specific docking site for the nuclear export factor, exportin-1. *J Biol Chem* 274(52), 37370-37378.
- Siniosoglou, S., Lutzmann, M., Santos-Rosa, H., Leonard, K., Mueller, S., Aebi, U. und Hurt, E. (2000). Structure and assembly of the Nup84p complex. *J Cell Biol* 149(1), 41-54.
- Siniosoglou, S., Santos-Rosa, H., Rappsilber, J., Mann, M. und Hurt, E. (1998). A novel complex of membrane proteins required for formation of a spherical nucleus. *Embo J* 17(22), 6449-6464.
- Siniosoglou, S., Wimmer, C., Rieger, M., Doye, V., Tekotte, H., Weise, C., Emig, S., Segref, A. und Hurt, E. C. (1996). A novel complex of nucleoporins, which includes Sec13p and a Sec13p homolog, is essential for normal nuclear pores. *Cell* 84(2), 265-275.
- Smith, A., Brownawell, A. und Macara, I. G. (1998). Nuclear import of Ran is mediated by the transport factor NTF2. *Curr Biol* 8(25), 1403-1406.
- Solsbacher, J., Maurer, P., Vogel, F. und Schlenstedt, G. (2000). Nup2p, a yeast nucleoporin, functions in bidirectional transport of importin alpha. *Mol Cell Biol* 20(22), 8468-8579.
- Stade, K., Ford, C. S., Guthrie, C. und Weis, K. (1997). Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* 90(6), 1041-1050.

- Steggerda, S. M., Black, B. E. und Paschal, B. M. (2000). Monoclonal antibodies to NTF2 inhibit nuclear protein import by preventing nuclear translocation of the GTPase Ran. *Mol Biol Cell* 11(2), 703-719.
- Steggerda, S. M. und Paschal, B. M. (2000). The mammalian Mog1 protein is a guanine nucleotide release factor for Ran. *J Biol Chem* 275(30), 23175-23180.
- Stewart, M., Kent, H. M. und McCoy, A. J. (1998). Structural basis for molecular recognition between nuclear transport factor 2 (NTF2) and the GDP-bound form of the Ras-family GTPase Ran. *J Mol Biol* 277(3), 635-646.
- Stochaj, U., Rassadi, R. und Chiu, J. (2000). Stress-mediated inhibition of the classical nuclear protein import pathway and nuclear accumulation of the small GTPase Gsp1p. *Faseb J* 14(14), 2130-2132.
- Strässer, K., Bassler, J. und Hurt, E. (2000). Binding of the Mex67p/Mtr2p heterodimer to FXFG, GLFG, and FG repeat nucleoporins is essential for nuclear mRNA export. *J Cell Biol* 150(4), 695-706.
- Stutz, F., Kantor, J., Zhang, D., McCarthy, T., Neville, M. und Rosbash, M. (1997). The yeast nucleoporin rip1p contributes to multiple export pathways with no essential role for its FG-repeat region. *Genes Dev* 11(21), 2857-2868.
- Sukegawa, J. und Blobel, G. (1993). A nuclear pore complex protein that contains zinc finger motifs, binds DNA, and faces the nucleoplasm. *Cell* 72(1), 29-38.
- Suyama, M., Doerks, T., Braun, I. C., Sattler, M., Izaurralde, E. und Bork, P. (2000). Prediction of structural domains of TAP reveals details of its interaction with p15 and nucleoporins. *EMBO Rep* 1(1), 53-58.
- Suzuki, N., Noguchi, E., Nakashima, N., Oki, M., Ohba, T., Tartakoff, A., Ohishi, M. und Nishimoto, T. (2001). The *Saccharomyces cerevisiae* small GTPase, Gsp1p/Ran, is involved in 3' processing of 7S-to5.9S rRNA and in degradation of the excised 5'A0 fragment of 35S pre-RNA, both of which are carried out by the exosome. *Genetics* 158, 613-625.
- Takizawa, C. G., Weis, K. und Morgan, D. O. (1999) in *Proc Natl Acad Sci U S A* Vol. 96, pp. 7938-7943
- Tatebayashi, K., Tani, T. und Ikeda, H. (2001). Fission yeast Mog1p homologue, which interacts with the small GTPase Ran, is required for mitosis-to-interphase transition and poly(A)(+) RNA metabolism. *Genetics* 157(4), 1513-1522.
- Titov, A. A. und Blobel, G. (1999). The karyopherin Kap122p/Pdr6p imports both subunits of the transcription factor IIA into the nucleus [In Process Citation]. *J Cell Biol* 147(2), 235-246.
- Tobian, J. A., Drinkard, L. und Zasloff, M. (1985). tRNA nuclear transport: defining the critical region of human tRNAMet by point mutagenesis. *Cell* 43, 415-422.
- Traglia, H. M., O'Connor, J. P., Tung, K. S., Dallabrida, S., Shen, W. C. und Hopper, A. K. (1996). Nucleus-associated pools of Rna1p, the *Saccharomyces*

- cerevisiae Ran/TC4 GTPse activating protein involved in nucleus/cytosol transit. Proc Natl Acad Sci U S A 93(15), 7667-7672.
- Trieselmann, N. und Wilde, A. (2002). Ran Localizes around the Microtubule Spindle In Vivo during Mitosis in Drosophila Embryos. Curr Biol 12, 1124-1129.
- Vasu, S. K. und Forbes, D. J. (2001). Nuclear pores and nuclear assembly. Curr Opin Cell Biol 13(3), 363-375.
- Vetter, I. R., Arndt, A., Kutay, U., Görlich, D. und Wittinghofer, A. (1999). Structural view of the Ran-Importin beta interaction at 2.3 Å resolution. Cell 97(5), 635-646.
- Vojtek, A. B. und Hollenberg, S. M. (1995). Ras-Raf interaction: two-hybrid analysis. Methods Enzymol 255, 331-342.
- Warner, J. R. (1990). The nucleolus and the ribosome formation. Curr Opin Cell Biol 2, 521-527.
- Weis, K. (2002). Nucleocytoplasmic transport: cargo trafficking across the border. Curr Opin Cell Biol 14(3), 328-335.
- Weis, K., Mattaj, I. W. und Lamond, A. I. (1995). Identification of hSRP1 alpha as a functional receptor for nuclear localization sequences. Science 268(5213), 1049-1053.
- Wiese, C., Wilde, A., Moore, M. S., Adam, S. A., Meres, A. und Zheng, Y. (2001). Role of importin-beta in coupling Ran to downstream targets in microtubule assembly. Science 291, 653-656.
- Wimmer, C., Doye, V., Grandi, P., Nehrbass, U. und Hurt, E. C. (1992). A new subclass of nucleoporins that functionally interact with nuclear pore protein NSP1. Embo J 11(13), 5051-5061.
- Wittmann, T., Wilm, M., Karsenti, E. und Vernos, I. (2000). TPX2, a novel Xenopus MAP involved in spindle pole organization. J Cell Biol 149, 1405-1418.
- Yan, C., Leibowitz, N. und Melese, T. (1997). A role for the divergent actin gene, ACT2, in nuclear pore structure and function. EMBO J 16(3572-3586)
- Yaseen, N. R. und Blobel, G. (1999a). GTP hydrolysis links initiation and termination of nuclear import on the nucleoporin nup358 [In Process Citation]. J Biol Chem 274(37), 26493-26502.
- Yaseen, N. R. und Blobel, G. (1999b). Two distinct classes of ran-binding sites on the nucleoporin nup-358 [In Process Citation]. Proc Natl Acad Sci U S A 96(10), 5516-5521.
- Yoo, C. J. und Wolin, S. L. (1994). La proteins from Drosophila melanogaster and Saccharomyces cerevisiae: a yeast homolog of the La autoantigen is dispensable for growth. Mol Cell Biol 14(8), 5412-24.
- Yoshida, K. und Blobel, G. (2001). The Karyopherin Kap142p/Msn5p Mediates Nuclear Import and Nuclear Export of Different Cargo Proteins. J Cell Biol 152(4), 729-740.

Zhang, C. und Clarke, P. R. (2001). Roles of Ran-GTP and Ran-GDP in precursor vesicle recruitment and fusion during nuclear envelope assembly in a human cell-free system. *Curr Biol* 11(3), 208-212.

Zhang, C., Hutchins, J. R., Muhlhauser, P., Kutay, U. und Clarke, P. R. (2002). Role of Importin-beta in the Control of Nuclear Envelope Assembly by Ran. *Curr Biol* 12(6), 498-502.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Struktureller Aufbau des Kernporenkomplexes und Lokalisation der Nukleoporine im Kernporenkomplex .....	3
Abb. 2: Nukleozytoplasmatischer Transport .....	11
Abb. 3: Röntgenstruktur von Ran in der GDP bzw. GTP-gebundenen Form.....	17
Abb. 4: Struktur von RanGAP1.....	20
Abb. 5: Kristallstruktur von RCC1.....	21
Abb. 6: Ran als molekularer Marker in der Interphase.....	31
Abb. 7: Die mitotische Rolle von Ran bei der Ausbildung von Spindeln. ....	33
Abb. 8: Der mitotische Ran-Gradient .....	34
Abb. 9: Ran kontrolliert die Ausbildung einer Kernmembran in der Telophase .....	35
Abb.10: PCR zur Bestätigung der Disruption von <i>YRB30</i> durch den <i>HIS3</i> Marker .....	50
Abb.11: Überprüfung des Yrb30-Antikörpers.....	60
Abb.12: Durch Aufreinigung von Gsp1p werden verschiedene Karyopherine kogereinigt.....	64
Abb.13: Prinzip der Zwei-Hybrid-Analyse zur Identifikation von Bindungspartnern von Gsp1p.....	66
Abb.14:Gsp1p und Yrb30p binden <i>in vivo</i> aneinander .....	70
Abb.15: Aufreinigung von ProtA-Yrb30p aus dem wt bzw. <i>rna1-1</i> Stamm .....	70
Abb.16: GFP-Yrb30p kann mit ProtA-Gsp1(G21V)p kogereinigt werden .....	71
Abb.17: Expression und Aufreinigung von GST-Yrb30p.....	72
Abb.18: Yrb30p bindet direkt und spezifisch an die GTP-gebundene Form von Hefe-Ran.....	73
Abb.19: Yrb30p interagiert auch spezifisch mit der GTP-gebundenen Form von menschlichem Ran .....	74
Abb.20: Endogenes GTP $\gamma$ S-beladenes Gsp1p kann spezifisch aus einem Hefeextrakt mit Yrb30p kopräzipitiert werden .....	75
Abb.21: Bestimmung der Ran-Binde-Domäne(RBD) .....	77
Abb.22: Konkurrenz von Yrb1p und Yrb30p um die Bindungsstelle auf Gsp1pGTPeren Komplex .....	79
Abb.23: Yrb30p bildet einen trimeren Komplex mit Gsp1pGTP und Xpo1p .....	80
Abb.24: Yrb30p formt in Gegenwart von Gsp1pGTP auch mit Kap95p einen trimeren Komplex .....	81
Abb.25: Yrb30p bildet einen trimeren Komplex mit Xpo1p und Gsp1p , der sich von einem homologen Komplex mit Yrb1p unterscheidet .....	82
Abb.26: Einfluß von Yrb30p auf den RanGTPase-Zyklus.....	84
Abb.27: Stabilisierung der GTP-gebundenen Form von Gsp1p durch Yrb30p .....	85
Abb.28: Lokalisation von Yrb30p und Yrb1p im Vergleich .....	86
Abb.29: Lokalisation von GFP-Yrb30p in den Export-Mutanten $\Delta$ los1, $\Delta$ msn5, <i>cse1-2</i> und <i>xpo1-1</i> .....	87
Abb.30: Lokalisation von GFP-Yrb30 bei Koexpression von Gsp1pG21V.....	88
Abb.31: Die Fusion einer funktionellen NLS an Yrb30p ändert nicht dessen steady-state Lokalisation .....	90
Abb.32: Die Lokalisation von NLSL25-Yrb30p bleibt in den Export-Mutanten $\Delta$ los1, <i>cse1-2</i> und $\Delta$ msn5 unverändert zytoplasmatisch.....	91
Abb.33: NLSL25-Yrb30p akkumuliert in der <i>xpo1-1</i> Mutante bei restriktiver Temperatur.....	92
Abb.34: Die Verminderung von Xpo1p führt zu einer Akkumulation von NLSL25-Yrb30p im Kern.....	92
Abb.35: Der Export von GFP-NLSL25-YRB30p ist LMB-sensitiv .....	93

Abb.36: Die Fusion von Yrb30p-Sequenzabschnitten führt zu einem Export der NMD3 $\Delta$ NES1/2-Mutante .....	95
Abb.37: Der Austausch der Nmd3p-NES durch die Yrb30p-NES komplementiert den Wachstumsdefekt der nmd3 $\Delta$ NES-Mutante.....	96
Abb.38: Lokalisation von Yrb30(1-377)p im Wildtyp-Stamm unter Standardbedingungen .....	98
Abb.38b:Yrb30(252-440)p akkumuliert nach Zugabe von Leptomycin B im Kern.....	99
Abb.39: Die RBD-Mutante Yrb30(252-440) kann den trimeren Export-Komplex bilden, nicht jedoch die NES-Mutante Yrb30(1-377) .....	100
Abb.40: Wachstum der <i>S. pombe</i> Disruptions-Stämme bei 36°C .....	101
Abb.41: Wachstumsanalyse der Sporen einer Kreuzung der temperatursensitiven rna1-1 Transportmutante mit dem yrb30-Disruptionstamm .....	102
Abb.42: Die temperatursensitive gsp1-1-Mutante zeigt keinen verstärkten Wachstumsdefekt im yrb30-Disruptionstamm.....	102
Abb.43: Suppression der Toxizität von Gsp1 G21V .....	103
Abb.44: Der yrb30-Disruptionstamm zeigt keine erhöhte Sensitivität gegenüber dem Proteinsynthese-Inhibitor Cycloheximid .....	105
Abb.45: Unter dem Einfluß des Mikrotubuli-Inhibitors Benomyl verhält sich der yrb30-Disruptionstamm wie ein wt-Stamm .....	105
Abb.46: Yrb30p wird nicht für invasives Wachstum benötigt.....	106
Abb.47: Die Lokalisation von Srp1-GFPp bleibt im yrb30-Disruptionstamm unverändert.....	107
Abb.48: Der Export polyadenylierter mRNA ist im yrb30-Disruptionstamm nicht beeinträchtigt .....	108
Abb.49: TEV-Eluate sowie Calmodulin-Eluat der Aufreinigung von YRB30-ProtAp sowie YRB30p-CBD-ProtAp .....	110
Abb. 50: Sequenz-Vergleich der Yrb30-Homologen .....	115

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die Transportrezeptoren der Importin- $\beta$ -Familie der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	6
Tabelle 2: Bekannte Ran-bindende Proteine, deren Bindungs-spezifität, Lokalisation und zelluläre Funktion.....	18
Tabelle 3: Verwendete Hefestämme .....	47
Tabelle 4: Mittels Zwei-Hybrid-Durchmusterung identifizierte Kandidaten für eine Interaktion mit Hefe-Ran .....	68
Tabelle 5: Die Lokalisation von GFP-Yrb30p wurde in verschiedenen Transportmutanten und unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen untersucht .....	88
Tabelle 6: Vergleich bekannter NES-Sequenzen mit der Leucin-reichen Sequenz der Yrb30-Homologen .....	97
Tabelle 7: Verschiedene Transportmutanten zeigen in Kombination mit der yrb30-Disruption keinen Wachstumsdefekt .....	102
Tabelle 8: Überexpression von Yrb30p in verschiedenen Transportmutanten .....	103
Tabelle 9: Untersuchung spezieller Wachstumsbedingungen .....	104
Tabelle 10: Überprüfung Hefe-spezifischer Funktionen.....	105
Tabelle 11: Die Disruption von YRB30 führt nicht zu einer Mislokalisierung der angegebenen Reporterproteine .....	106

## 9 Abkürzungsverzeichnis

2μ	Zwei-Mikron-Fragment
aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung
ARS	Selbstreplizierende Sequenz
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CCD	digitale Kamera
CEN	centromeres Segment
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eEF-1A	Eukaryontischer Translationselongationsfaktor 1A
FOA	5-Fluoruracil-6-carboxylsäure-monohydrat; 5-FOA
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTPase	Guanosin-5'-triphosphatase
h	Stunde
hnRNP	heterogenes nukleäres Ribonukleopartikel
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KP <sub>i</sub>	Kaliumphosphat

---

LB	Luria-Bertani
M	molar
min	Minute
ml	Milliliter
MM	Minimalmedium
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NES	Kernexportsignal
NLS	Kernlokalisationssequenz (
NPC	Kernporenkomplex
OD <sub>600/260</sub>	Absorption bei 600 oder 260 nm
ORF	<i>open reading frame</i> ; offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
ProtA	Protein A aus <i>Staphylococcus aureus</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDC	synthetisches Glukose-Komplettmedium
sl	synthetisch letal
snRNA	kleine nukleäre Ribonukleinsäure
TEV	tobacco etch virus
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
ts	tempertursensitiv
UTR	nicht-translatierte Region
UV	Ultraviolett
YPD	Glukose-haltiges Vollmedium für Hefe
YPG	Galaktose-haltiges Vollmedium für Hefe
wt	Wildtyp
μl	Mikroliter
μM	mikromolar