

Hochkonservierte Nucleolare Bindungssequenzen
im ribosomalen S6-Protein

von *Homo sapiens* und *Saccharomyces cerevisiae*

(Meyen Ex E.C. Hansen, 1883)

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades des Departments Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg

vorgelegt von

Marc-Angelo Bisotti

aus Hamburg

Hamburg

2007

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. J. KRUPPA
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. H.-P. MÜHLBACH
Tag der Disputation: 20. April 2007

Hamburg, den 05. April 2007



Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	7
1.1	Biochemische Zusammensetzung von Ribosomen aus Prokaryonten und Eukaryonten	7
1.2	Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von Ribosomen.....	10
1.2.1	Dreidimensionale Rekonstruktion der Struktur von Ribosomen aus negativ kontrastierten EM-Aufnahmen.....	10
1.2.2	Funktionelle Ribosomenstrukturen durch Cryo-Elektronenmikroskopie	11
1.2.3	Kristallisation der ribosomalen Untereinheiten und des 70S-Ribosoms	12
1.2.4	Dreidimensionale Struktur des 70S-Ribosoms in atomarer Auflösung.	14
1.2.5	Struktur eukaryontischer Ribosomen.....	15
1.3	Expression der ribosomalen Gene.....	17
1.3.1	Gene der Ribosomalen RNA.....	17
1.3.2	Gene der Ribosomalen Proteine.....	17
1.4	Biogenese der ribosomalen Untereinheiten.....	18
1.4.1	Transkription der rRNA-Gene - post-transkriptionale Prozessierung und Modifizierung der 45S prä-rRNA zu reifen rRNAs.....	20
1.4.2	Nuclearer Export und Reimport der 5S rRNA	21
1.4.2.1	Import der snoRNAs (small nucleolar RNAs).....	21
1.4.2.2	Addition ribosomaler Proteine.....	22
1.5	Nucleocytoplasmatischer Transport und Nucleolare Akkumulation ribosomaler Proteine.....	22
1.5.1	Der Zellkern.....	22
1.5.1.1	Die Kernhülle.....	22
1.5.1.2	Der Kernporenkomplex und Nucleoporine.....	23
1.5.2	Sequenzen zum Kernimport und Kernexport: NLS und NES.....	25
1.5.2.1	Klassische Kernlokalisations-signale	25
1.5.2.2	Nicht-klassische Kernlokalisations-signale.....	26
1.5.2.3	Bekannte Kernlokalisations-signale ribosomaler Proteine.....	26
1.5.2.4	Nucleare Exportsignale.....	28
1.5.3	Mechanismen des nucleocytoplasmatischen Transportes	28
1.5.3.1	Transportrezeptoren: Importine und Exportine.....	29
1.5.3.2	Importmechanismus klassischer NLS-Proteine.....	32
1.5.3.3	RanGTP/GDP-Zyklus.....	34
1.5.3.4	Translokation durch die Kernpore.....	34
1.5.3.5	Import ribosomaler Proteine.....	37
1.5.4	Export ribosomaler Untereinheiten	38
1.5.5	Nucleolare Bindungssequenzen	40
1.5.5.1	Der Nucleolus	40
1.5.5.2	Nucleolare Bindungssequenzen	41
2	Aufgabenstellung.....	44
3	Material und Methoden.....	46
3.1	Materialien.....	46
3.1.1	Chemikalien.....	46
3.1.2	Enzyme.....	46
3.1.3	Oligonucleotide.....	46
3.1.4	Antikörper.....	46
3.1.5	Biologisches Material.....	47
3.1.6	Geräte.....	48
3.1.7	Reagenzien.....	48

3.2 Molekularbiologie.....	52
3.2.1 DNA-Quantifizierung.....	52
3.2.2 Quantifizierung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese.....	52
3.2.2.1 Quantifizierung von DNA mittels UV-Photometrie.....	52
3.2.3 PCR – Polymerase-Ketten-Reaktion.....	53
3.2.4 Reinigung von PCR-Produkten.....	54
3.2.5 Restriktion von DNA.....	54
3.2.6 DNA-Ligation	55
3.2.7 Agarose-Gelelektrophorese.....	55
3.2.8 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen.....	56
3.2.9 Herstellung kompetenter E.coli-Zellen.....	57
3.2.10 Transformation kompetenter E.coli-Zellen.....	57
3.2.11 Ansetzen von Übernachtskulturen.....	58
3.2.12 Anlegen von Dauerkulturen.....	58
3.2.13 Isolierung von Plasmid-DNA.....	59
3.2.13.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA.....	59
3.2.13.2 Midi-Präparation von Plasmid-DNA.....	59
3.2.14 DNA-Sequenzierung.....	60
3.3 Zellkultur.....	61
3.3.1 Nährmedien, Seren und Puffer.....	61
3.3.2 Subkultivierung von Zellen	62
3.3.3 Zellzahlbestimmung	62
3.3.4 Transfektion von HeLa-, HEK- und COS-Zellen.....	62
3.4 Ribosomen-Isolierung aus COS-1-Zellen.....	64
3.4.1 Isolierung von 80S-Ribosomen.....	64
3.4.2 Ribosomen-Profil: Extraktion von ribosomalen 40S- und 60S-Untereinheiten, Monosomen und Polysomen.....	65
3.5 Nachweis von EGFP-Fusionsproteinen durch Fluoreszenzmikroskopie.....	65
3.6 Nachweis von Proteinen durch Immunfluoreszenzmikroskopie.....	66
3.7 Nachweis von Proteinen im Western-Blot.....	67
3.7.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	67
3.7.2 Western - Blot.....	69
3.7.3 Ponceaus-Färbung von geblotteten Proteinen.....	70
3.7.4 Immunologischer Nachweis geblotteter Proteine mittels Chemilumineszenz.....	70
4 Ergebnisse.....	72
4.1 Expression von Fusionsproteinen des ribosomalen S6-Proteins.....	72
4.2 Konstruktion von Expressionsvektoren für S6-Fusionsproteine.....	72
4.2.1 Vektoren zur Expression von β -Galaktosidase-Fusionsproteinen.....	72
4.2.1.1 Vektoren zur Expression von EGFP-Fusionsproteinen.....	75
4.2.2 Vektoren zur Expression von unmarkierten Proteinen.....	76
4.2.2.1 Klonierung der hrpS6-Konstrukte.....	76
4.2.2.2 Klonierung der yrpS6A-Konstrukte.....	77
4.2.3 Expression von hrpS6-Fusionsproteinen zur Untersuchung der Nucleolaren Bindungssequenzen.....	78
4.2.4 Bisher identifizierte Nucleolare Bindungssequenzen von hrpS6.....	78
4.2.5 Die N-terminale NuBiS I des humanen rpS6.....	79
4.2.6 Die C-terminale NuBiS II des humanen rpS6.....	84
4.2.6.1 Aminosäuresequenz von NuBiS II des humanen rpS6.....	84
4.2.6.2 Abhängigkeit der NuBiS II vom NLS II.....	86
4.2.7 Vergleich der Nucleolaren Bindungssequenzen der S6-Proteine.....	87
4.3 Generelle Abhängigkeit von Nucleolaren Bindungssequenzen und Kernlokalisationssignalen.....	88

4.4 Substitution des humanen rpS6 durch das homologe yrpS6A aus der Hefe	90
4.4.1 Expression und Detektion von yrpS6A	91
4.4.1.1 Detektion von yrpS6A in der Immunfluoreszenz	92
4.4.1.2 Detektion von yrpS6A in Zellfraktionen	93
4.4.2 Expression und Detektion des c-terminal verlängerten yrpS6A	94
4.4.2.1 Detektion von yrpS6A-HCT in der Immunfluoreszenz	94
4.4.2.2 Detektion von yrpS6A-HCT in Zellfraktionen	96
4.4.2.2.1 Detektion von yrpS6A-HCT in hochsalzgewaschenen 40S-Untereinheiten	97
4.4.2.2.3 Detektion von yrpS6A-HCT in aufgereinigten Polysomen	98
5 Diskussion	100
5.1 Die multiplen Kernsignale des hrpS6 und des yrpS6A	100
5.2 Die zwei Nucleolaren Bindungssequenzen des humanen hrpS6 und yrpS6A der Hefe	103
5.2.1 Die N-terminale NuBiS I	104
5.2.1.1 Sequenz, Konservierung	104
5.2.1.2 Physikochemische Eigenschaften der NuBiS I	107
5.2.1.3 Strukturelle Eigenschaften der NuBiS I	109
5.2.2 Die C-terminale NuBiS II der S6-Familie	110
5.2.2.1 Sequenz, Konservierung	110
5.2.2.2 Physikochemische Eigenschaften der NuBiS II	112
5.2.2.3 Strukturelle Eigenschaften der NuBiS II	112
5.2.2.4 Abhängigkeit der NuBiS II vom NLS II	114
5.2.3 Nucleolaren Bindungssequenzen und ihre Tertiärstruktur	115
5.2.3.1 Struktur der Nucleolus-Bindenden-Sequenz des HIV-Rev-Proteins	116
5.2.3.2 Struktur der allgemeinen RNA-Bindungsdomäne RNP	116
5.2.3.3 RNA-Protein-Interaktionen bei prokaryontischen Ribosomen	117
5.2.4 Schlussfolgerungen zur Funktionsweise von NuBiS I und II	118
5.3 Substitution des humanen hrpS6 durch das yrpS6A der Hefe	119
5.3.1 Expression der yrpS6A-Konstrukte	120
5.3.1.1 Expression von yrpS6A	121
5.3.1.2 Expression von yrpS6A-HCT	121
5.3.2 Das yrpS6A der Hefe kann durch gezielte Modifikationen in humane Ribosomen integriert werden	122
6 Zusammenfassung	124
7 Literatur	126
8 Anhang	139
8.1 Der genetische Code	139
8.2 Stoppcodons	139
8.3 Aminosäuren im Ein- und Dreibuchstaben-Code	139

Abkürzungsverzeichnis

Å.....	Angstrom	ml.....	Milliliter
Abb.....	Abbildung	mRNA.....	Boten RNA
AK.....	Antikörper	MW.....	Molekulargewicht
APS.....	Ammoniumpersulfat	NaAc.....	Natriumacetat
AS.....	Aminosäure(n)	NES.....	Nukleares Exportsignal
ATP.....	Adenosintriphosphat	NLS.....	Kernlokalisierungssignal
BIB.....	beta-ähnliche Importrezeptor	nm.....	Nanometer
.....	Bindungsdomäne	NOR.....	Nucleolus-Organisierende-Region
bp.....	Basenpaar(e)	NPC.....	Kernporenkomplex
BSA.....	Rinderserumalbumin	NTP.....	Nucleotidtriphosphat
cDNA.....	revers transkribierte mRNA	NuBiS.....	Nucleolare Bindungssequenz
CMV.....	Cytomegalievirus	Nup.....	Nucleoporin
CTP.....	Cytidintriphosphat	OD.....	optische Dichte
d.....	Desoxy-	ORF.....	Offener Leserahmen
Da.....	Dalton	PAGE.....	Polyacrylamidgelelektrophorese
DAPI.....	4',6-Diamidino-2-phenylindoldi-	PBS.....	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
.....	hydrochlorid	PCR.....	Polymerase Kettenreaktion
DF.....	dichte fibrilläre Komponente	rDNA.....	ribosomale DNA
.....	des Nucleolus	rER.....	raues Endoplasmatisches Retikulum
DMEM.....	Dulbecco modifiziertes Minimal	RNA.....	Ribonucleinsäure
.....	Essential Medium	RNase A.....	Ribonuclease A
DNA.....	Desoxyribonucleinsäure	RNP.....	Ribonucleoprotein Partikel
dNTP.....	Desoxynukleotid-5'-triphosphat	Rp.....	Ribosomales Protein
E.coli.....	Escherichia coli	rpm.....	Umdrehungen pro Minute
EDTA.....	Ethylendinitrietetraessigsäure	rRNA.....	ribosomale RNA
EGFP.....	green fluorescent protein	S.....	Svedbergeinheit
ER.....	endoplasmatisches Reticulum	SDS.....	Natriumdodecylsulfat
EtBr.....	Ethidiumbromid	sec.....	Sekunde(n)
EtOH.....	Ethanol	snRNA.....	Kleine nucleolare RNAs
FC.....	fibrilläre zentrum des Nucleolus	snRNA.....	Kleine Kern-RNA
FCS.....	fötales Kälberserum	snRNP.....	Kleines Ribonucleoprotein Partikel
FG-Repeats.....	Phenyl-Alanin-Wiederholungen	STKM.....	Saccharose Tris Kalium Magnesium
FITC.....	Fluoresceinisothiocyanat	SV40.....	Simianvirus Typ 40
g.....	Gramm	TAE.....	TRIS-Acetate-EDTA-Puffer
GC.....	granuläre Komponente	Taq.....	Thermus aquaticus
.....	des Nucleolus	TBE.....	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
GDP.....	Guanosindiphosphat	TE.....	Tris-EDTA
GFP.....	Grün fluoreszierendes Protein	TEMED.....	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
GTP.....	Guanosintriphosphat	Tm.....	Schmelztemperatur
h.....	Stunde(n)	TRIS.....	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
HCT.....	humaner C-Terminus	TRIS/HCl.....	Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
HRP.....	Merretich-Peroxydase	tRNA.....	Transfer RNA
hrp.....	humanes ribosomales Protein	Ttrp.....	ribosomales Protein von Thermus
hrpS6.....	humanes ribosomales Protein S6	thermophilus
HSP.....	Hitzeschockprotein	U.....	Unit, Einheit
IBB.....	Importin β -bindende Domäne	ÜNK.....	Übernachtkultur
kb.....	Kilobasen	UV.....	Ultraviolett
kDa.....	Kilodalton	V.....	Volt
l.....	Liter	v/v.....	Volumen pro Volumen
lacZ.....	Gen der β -Galaktosidase	W.....	Watt
LB-Medium.....	Luria-Bertani Medium	w/v.....	Gewicht pro Volumen
m.....	Milli	X-Gal.....	5-Brom-4-chlorindolyl- β -D-
M.....	Molar, Mol/l	galactopyranosid
mA.....	Milliampere	yrp.....	ribosomales Protein der Hefe
MDa.....	Megadalton	yrpS6A.....	ribosomales Protein S6A der Hefe
mg.....	Milligramm		
min.....	Minute(n)		

1 Einleitung

1.1 Biochemische Zusammensetzung von Ribosomen aus Prokaryonten und Eukaryonten

Die Bedeutung der Ribosomen liegt in ihrer ubiquitären Verbreitung. Ribosomen spielen als Ort der Proteinbiosynthese eine zentrale Rolle für die Struktur, Funktion und das Wachstum von Zellen. Ihre katalytische Funktion, Aminosäuren zu Peptiden zu verknüpfen, hat erst die Entwicklung von Zellen und Organismen ermöglicht und ist für das Leben auf der Erde essentiell. Sie kommen als einzige Zellorganelle in allen Organismen vor. Mitochondrien und Chloroplasten besitzen eigene, spezielle Ribosomen, die sich von denen des Cytoplasmas in ihrer Struktur und makromolekularen Zusammensetzung unterscheiden.

Unter optimalen Lebensbedingungen besitzt eine Bakterienzelle mehr als 20.000 Ribosomen, die insgesamt etwa ein Viertel ihrer Trockenmasse ausmachen. Durch Zentrifugation eines Bakterienextraktes über einen Sucrosegradienten lassen sich die große und kleine Untereinheit bei niedrigen Mg^{2+} -Konzentrationen ($\sim 1mM$) gut voneinander trennen. Sie sedimentieren im Schwerfeld der Ultrazentrifuge mit 50S bzw. 30S. Bei höheren Mg^{2+} -Konzentrationen ($\sim 5mM$) vereinigen sich beide Untereinheiten zum 70S-Ribosom (Knippers, 2001).

	Ribosomen	Kleine Untereinheit	Große Untereinheit
M (kDa)	2520	930	1590
Sed.-Koeffizient	70S	30S	50S
Proteine		21	31
% der Masse	34	40	30
Sed. Koeffizient rRNA		16 S	23 S, 5S
Nucleotide		1542	2904, 120
% der Masse	66	60	70

Tabelle 1: Zusammensetzung von bakteriellen Ribosomen (E.coli)(Lodish, 2000; Knippers, 2001)

Die makromolekulare Zusammensetzung der beiden Untereinheiten ist in der Tabelle 1 dargestellt. Die ribosomalen Proteine der kleinen Untereinheit werden

mit S1 bis S21 (S von small) und die der großen mit L1 usw. (L von large) bezeichnet. Die große und kleine Untereinheit besitzen je ein Exemplar eines jeden Proteins mit Ausnahme des dimeren Proteinkomplexes L7/L12, der in zwei Exemplaren vorkommt. Die dreidimensionale Struktur vieler isolierter ribosomaler Proteine ist bekannt. Ebenso weiß man, dass ribosomale rRNA die Fähigkeit besitzt, ausgedehnte Sekundärstrukturen auszubilden.

Eukaryontische Ribosomen bestehen aus 40S und 60S-Untereinheiten. Sie sind sowohl von der Proteinmasse als auch von der Nucleotidanzahl der rRNAs größer als prokaryontische Ribosomen. Ribosomen aus *Saccharomyces cerevisiae* besitzen je eine Kopie der vier rRNAs und 78 ribosomale Proteine (Tabelle 2). Die 78 Proteine werden von 137 Genen kodiert.

	Ribosomen	Kleine Untereinheit	Große Untereinheit
M (kDa)	3600	1030	2570
Sed.-Koeffizient	80S	40S	60S
Proteine		32	46
% der Masse	41	46	39
Sed. Koeffizient rRNA		18S	25S, 5.8S, 5S
Nucleotide		1798	3392, 158, 121
% der Masse	59	54	61

Tabelle 2 Zusammensetzung von Ribosomen aus Hefe (*S. cerevisiae*) (Mazelis *et. al*, 1973; Wool *et. al*, 1996; Planta *et. al*, 1998; Verschoor *et. al*, 1996)

Ein Vergleich zwischen Hefe und Säugetieren zeigt, dass die ribosomalen Pr5 Soteinsequenzen beider Spezies homolog sind. Die Ribosomenbiogenese findet bei Eukaryonten im Nucleolus statt (s.u.). Bei der Hefe werden alle vier rRNAs durch eine 9.1 kb rDNA-Einheit kodiert, die 100 – 200 Mal auf dem langen Arm des Chromosoms XII wiederholt wird.

	Ribosomen	Kleine Untereinheit	Große Untereinheit
M (kDa)	4220	1400	2820
Sed.-Koeffizient	80S	40S	60S
Proteine		33	49
% der Masse	40	50	35
Sed. Koeffizient rRNA		18S	28S, 5.8S, 5S
Nucleotide		1874	4718, 160, 120
% der Masse	60	50	65

Tabelle 3: Zusammensetzung von Ribosomen aus Säugetierzellen (Wool *et. al*, 1996; Lodish, 2000)

Die Masse der Säugetier-Ribosomen nimmt gegenüber den Hefe-Ribosomen zu. Dies ist bedingt durch eine größere Anzahl von Proteinen und eine Vergrößerung der rRNAs (siehe Tabelle 3).

Sequenzvergleiche aus verschiedenen Organismen zeigen, dass zwar die Sekundärstrukturen im Laufe der Evolution konserviert blieben, jedoch nicht ihre Basensequenzen. Die 5.8S-rRNA, die in der großen Untereinheit der Eukaryonten in einem basengepaarten Komplex mit der 28 S-rRNA vorliegt, ist sequenzhomolog zum 5'-Ende der 23 S-rRNA der Prokaryonten.

Die Protein- und rRNA-Sequenzen der kleinen und großen ribosomalen Untereinheit sind von zahlreichen Organismen bekannt. Obwohl die Primärsequenzen stark variieren, können theoretisch gleiche Abschnitte des entsprechenden rRNA-Moleküls basengepaarte Doppelstrangbereiche ausbilden, so dass eine ähnliche dreidimensionale Struktur für jede rRNA in allen Organismen entsteht. Experimentell konnten durch chemische Quervernetzungsstudien etwa 45 Doppelbindungsregionen an ähnlichen Positionen in der kleinen rRNA von verschiedenen Prokaryonten und Eukaryonten nachgewiesen werden. Eine noch größere Anzahl an Doppelbindungsregionen wurde in der großen rRNA beider Phyla aufgezeigt.

Die Architektur der Ribosomen ist in der Evolution konserviert worden. Die Ähnlichkeiten von Ribosomen und Untereinheiten aus verschiedenen Organismen sind offensichtlicher als deren Unterschiede.

Die beiden ribosomalen Untereinheiten üben bei allen Organismen die gleiche definierte Funktion bei der Proteinbiosynthese aus. Von einigen Organismen sind sämtliche ribosomalen Proteine identifiziert und sequenziert worden; homologe Proteine binden an spezifische Regionen der rRNAs. Aus diesen Beobachtungen wird geschlossen, dass die fundamentale Proteinsynthese-Maschinerie in allen heutigen Zellen nur ein einziges Mal in der Natur entstand. Während der Evolution ist der katalytische Mechanismus, die Verknüpfung zweier Aminosäuren unter Ausbildung einer Peptidbindung, konserviert worden (Lodish, 2000).

1.2 Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von Ribosomen

Ein sehr wichtiges Ziel der Ribosomen-Forschung war die Aufklärung der molekularen Architektur intakter Ribosomen. Seit Beginn der Erforschung von Ribosomen war es offensichtlich, dass eine atomare Auflösung der dreidimensionalen Struktur des Ribosoms zum Verständnis der Proteinbiosynthese enorm beitragen würde. Die Röntgenstrukturanalyse von kristallisierten Untereinheiten oder Ribosomen war die einzige Technik, die diese Auflösung erbringen konnte.

1.2.1 Dreidimensionale Rekonstruktion der Struktur von Ribosomen aus negativ kontrastierten EM-Aufnahmen

Die bereits in der Einleitung erwähnten älteren Ergebnisse der hochauflösenden Elektronenmikroskopie vermittelten interessante Einblicke in den Aufbau der Ribosomen. Die Abbildung 1 zeigt das Modell eines 70S-Ribosoms aus *E.coli*, das im Jahre 1976 von Lake aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen rekonstruiert wurde.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Partikeln in Negativkontrastierung bildeten die Grundlage für die dreidimensionale Rekonstruktion der ribosomalen Untereinheiten. Durch Zusammenlagerung der beiden Untereinheiten wurde die Struktur des 70S-Ribosoms abgeleitet.

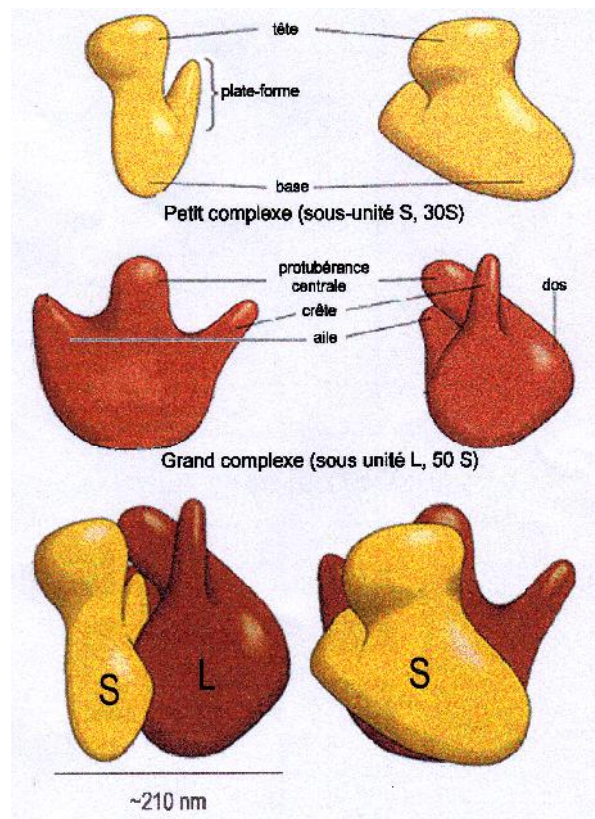


Abbildung 1: Modell der ribosomalen 40S, 60S und 70S Partikel von *E.coli* (Lake, 1976).

Das Modell von Lake vermittelt einen ersten Eindruck von der strukturellen Asymmetrie der ribosomalen Untereinheiten aus Bakterien.

1.2.2 Funktionelle Ribosomenstrukturen durch Cryo-Elektronenmikroskopie

Eine weitere von Joachim Frank entwickelte Methode der Auswertung einer großen Anzahl von Ribosomen-Aufnahmen unter verschiedenen Winkeln, die mit der Technik der Cryo-Elektronenmikroskopie erhalten wurden, ergab um 1995 eine Auflösung des *E.coli*-Ribosoms von etwa 25 Å (Abbildung 2).

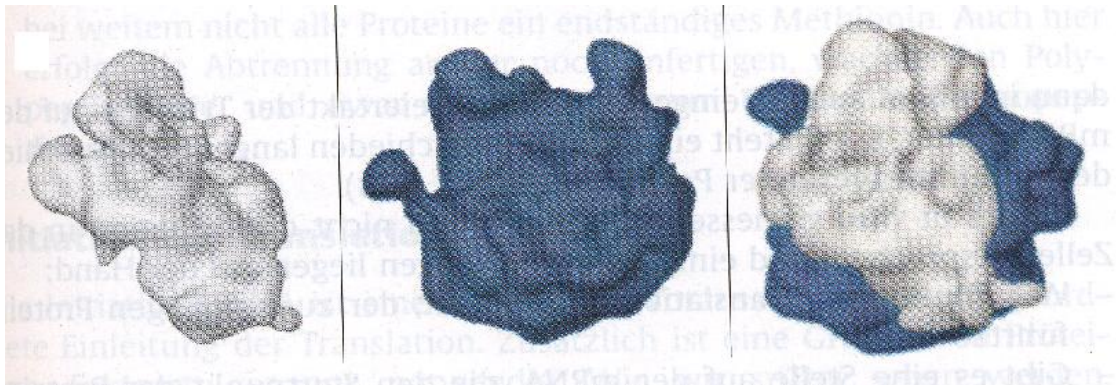


Abbildung 2: Struktur des *E.coli* 70S-Ribosoms und der 30S und 50S-Untereinheiten, erhalten mit der Technik der Cryo-Elektronenmikroskopie (Frank *et. al*, 1995).

Bei dieser Methode werden die Ribosomen in Sekundenschnelle eingefroren, so dass eventuelle Konformationsveränderungen, die im Verlauf der Proteinbiosynthese auftreten, analysiert werden können.

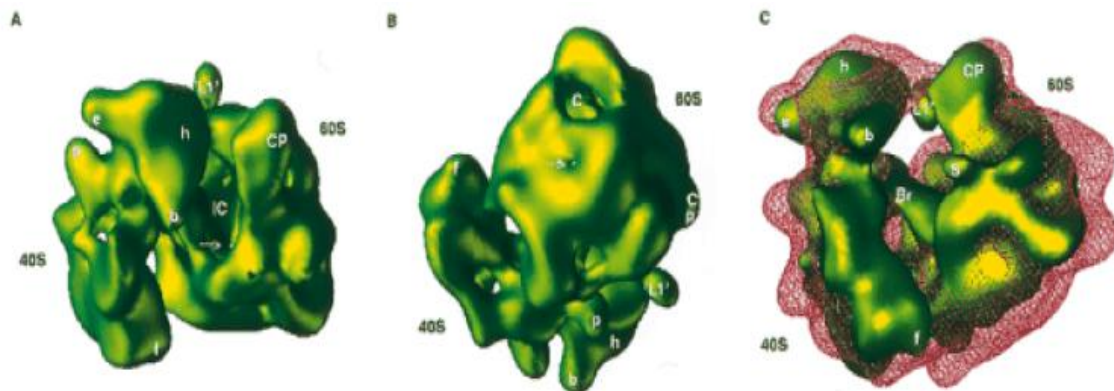


Abbildung 3: Strukturmerkmale des Hefe-Ribosoms (Verschoor *et. al*, 1998). Das 80S-Ribosom von *Saccharomyces cerevisiae* wurde aus 7470 Ribosomen-Abbildungen rekonstruiert. In C ist die Struktur des Hefe-Ribosoms (grün) mit der Struktur des Weizenkeim-Ribosoms (rotes Netz) verglichen.

Dieses Modell zeigt viele zusätzliche Details wie Kerben, Rinnen und Kanäle zur Aufnahme der tRNAs, der mRNA und der wachsenden Peptidkette. Durch eine

weitere Verbesserung der Methode gelang Franks Gruppe die Visualisierung der A-, P-, und E-Stelle des *E.coli*-Ribosoms. Dadurch konnten zum ersten Mal die tRNAs auf dem 70S-Ribosom funktionell lokalisiert werden (Agrawal *et. al*, 1996).

Die Gruppe von Frank konnte mit der Cryo-Elektronenmikroskopie auch die dreidimensionale Struktur von Hefe-Ribosomen (Abbildung 3) mit einer Auflösung von 35 Å darstellen (Verschoor *et. al*, 1998).

Ein Vergleich mit dem *E.coli*-Ribosom ergab eine sehr große Ähnlichkeit des prokaryontischen 70S-Ribosoms mit dem eukaryontischen 80S-Ribosom der Hefe, das etwas größer ist und eine komplexere Morphologie besitzt.

Für viele Merkmale des *E.coli*-Ribosoms finden sich entsprechende Strukturregionen im Hefe-Ribosom. Ein weiterer Vergleich mit dem Ribosom aus Weizenkeimen zeigt, dass das 80S-Ribosom der Hefe in der Höhe und Breite kompakter ist und globulärer erscheint als das Weizenkeim-Ribosom. Die kleine Untereinheit des Hefe-Ribosoms besitzt eine große Ähnlichkeit sowohl in der frontalen als auch in der lateralen Ansicht mit der 40S-Untereinheit von Kaninchen (Srivastava *et. al*, 1995).

1.2.3 Kristallisation der ribosomalen Untereinheiten und des 70S-Ribosoms

Bereits um 1960 wurden die ersten Kristallisationsversuche von Ribosomen unternommen, da in verschiedenen Geweben mikroskopische, zweidimensionale Ribosomenkristalle beobachtet wurden, die spontan entstehen (Clark *et. al*, 1982; Morimoto *et. al*, 1972). Jedoch erst 1980 wurden die ersten makroskopischen, dreidimensionalen Ribosomenkristalle von Ada Yonath erhalten (Yonath *et. al*, 1983). Etwa um 1990 war es Yonath gelungen, die große ribosomale Untereinheit von *Haloarcula marimortui* zu kristallisieren. Die Kristalle lieferten die Diffraktionsmuster um 3 Å. Weitere Verbesserungen, die die Strukturaufklärung von Ribosomenkristallen ermöglichten, waren die Entwicklung von Synchrotron-Strahlungsquellen mit entsprechend sensitiven Detektoren. Dadurch konnte die Expositionsdauer und damit die Zerstörung der Kristalle während der Vermessung verringert werden.

Auch durch den Einsatz leistungsfähiger Computer konnte die Auswertung der riesigen Datenmengen schneller bewerkstelligt werden. Obwohl seit 1990 exzellente Ribosomen-Kristalle existierten, konnte das Phasen-Problem der Kristalle nicht gelöst werden. Schließlich löste die Gruppe von Steitz dieses Problems. Sie führte erstens eine isomorphe Substitution der Ribosomen mit Metallclustern durch und benutzte zweitens elektronenmikroskopische Ribosomenaufnahmen von Frank für ihre Modellrechnungen (Moore, 2001).

Aufgrund dieser technischen Entwicklungen gelang es im Jahre 1999 mehreren Arbeitsgruppen, die Auswertung der Ribosomen-Kristalle so zu verbessern, dass die Röntgenstrukturanalysen der kleinen (Clemons *et. al*, 1999; Tocilj *et. al*, 1999) und großen Untereinheit (Ban *et. al*, 1999) sowie des 70S Ribosoms (Cate *et. al*, 1999) aus Bakterien mit einer fast atomaren Auflösung publiziert werden konnten.

Die zum ersten Mal durch Röntgenstrukturanalyse gelöste Struktur von 70S-Ribosomen, die mRNA und tRNAs enthielten, zeigt viele Einzelheiten der Wechselwirkungen zwischen den tRNAs und den ribosomalen Untereinheiten (Abbildung 4).

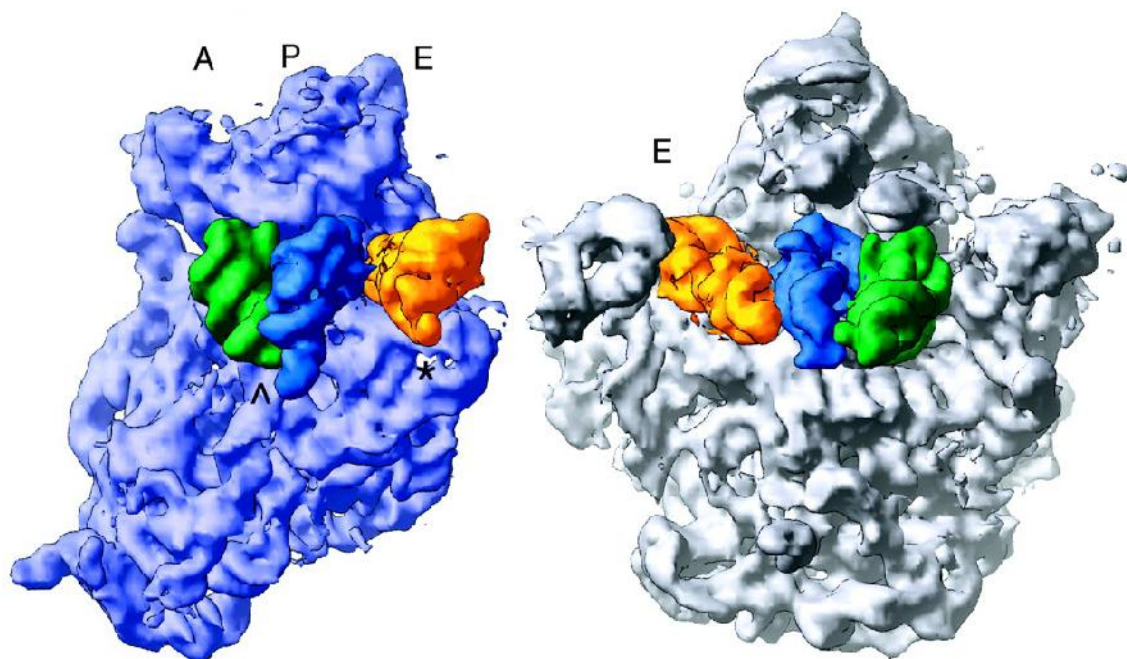


Abbildung 4: Modell der 30S und 50S ribosomalen Untereinheiten mit den drei gebundenen tRNAs (Cate *et. al*, 1999).

1.2.4 Dreidimensionale Struktur des 70S-Ribosoms in atomarer Auflösung

Im Jahr 2000 wurde das Ziel einer atomaren Auflösung der großen (Ban *et. al*, 2000) und kleinen (Wimberly *et. al*, 2000; Schluenzen *et. al*, 2000) ribosomalen Untereinheit aus Prokaryonten erreicht.

Aus den Untereinheiten können, da die RNA-Moleküle erkennbar sind, neue sekundäre und tertiäre RNA-Struktur motive ermittelt werden. Die Kristallstruktur des vollständigen 70S-Ribosoms von *Thermus thermophilus* (Abbildung 5) mit gebundener mRNA und tRNAs wurde 2001 mit einer Auflösung von 5.5 Å publiziert (Yusupov *et. al*, 2001).

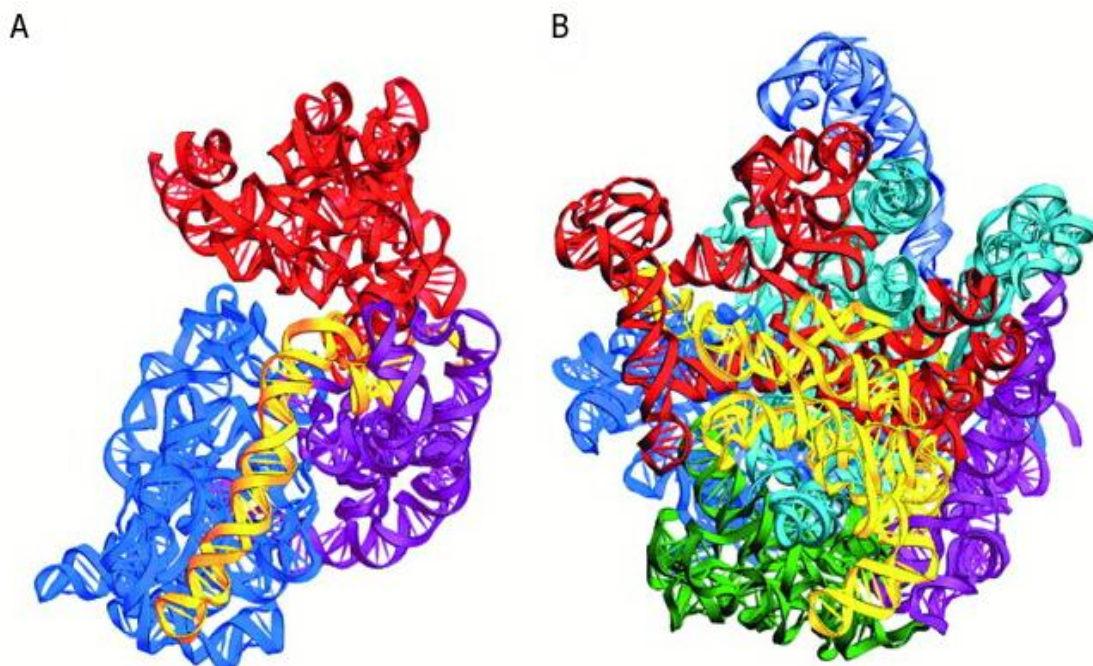


Abbildung 5: Sekundär- und Tertiärstruktur von 16 S (A), 23 S und 5S-rRNA (B) aus Yusupov *et. al*, 2001. Dargestellt sind nur die rRNAs, auf die zusätzlichen ribosomalen Proteine wurde der Übersichtlichkeit halber verzichtet. 5S rRNA in Magenta an der Spitze der 23S rRNA (B).

Den Autoren gelang es, die 16 S, 23 S und 5S rRNA-Moleküle, die A-, P- und E-Stellen-tRNAs sowie fast alle ribosomalen Proteine in die Elektronendichte-Verteilung einzupassen.

An der Grenzfläche zwischen der kleinen und großen Untereinheit, und dort wo die tRNAs binden, befindet sich nach dem Modell fast ausschließlich rRNA, während die Proteine hauptsächlich an der Peripherie lokalisiert sind (Yusupov *et. al*, 2001). Diese Verteilung unterstützt die Auffassung, dass für die Funktionen der Ribosomen hauptsächlich die rRNA-Moleküle verantwortlich sind.

Auch der Beitrag, den Proteine zur Stabilität der Ribosomen leisten, kann aus der 30S-Untereinheit von *Thermus thermophilus* basierend auf der Kristallstruktur mit 3.05 Å Auflösung abgeleitet werden (Brodersen *et. al*, 2002). Da die meisten ribosomalen Proteine mehrere RNA-Bindungsstellen besitzen, können sie die rRNA-Tertiärstruktur durch Quervernetzung stabilisieren. Viele ribosomale Proteine besitzen globuläre Domänen mit langen Polypeptidschwänzen, die fast keine Sekundärstruktur ausbilden und sich deshalb für die Quervernetzung der rRNA-Helices besonders eignen. Die meisten Proteine kontaktieren mehrere rRNA-Helices gleichzeitig. Kleine ribosomale Proteine sind sehr oft vollständig von rRNA umgeben, so dass sie dadurch einen Beitrag zur Stabilisierung der rRNA-Struktur leisten (Abbildung 6). Größere Proteine besitzen mehr unabhängige globuläre Domänen, die außen auf der Untereinheit liegen (Brodersen *et. Al*, 2002).

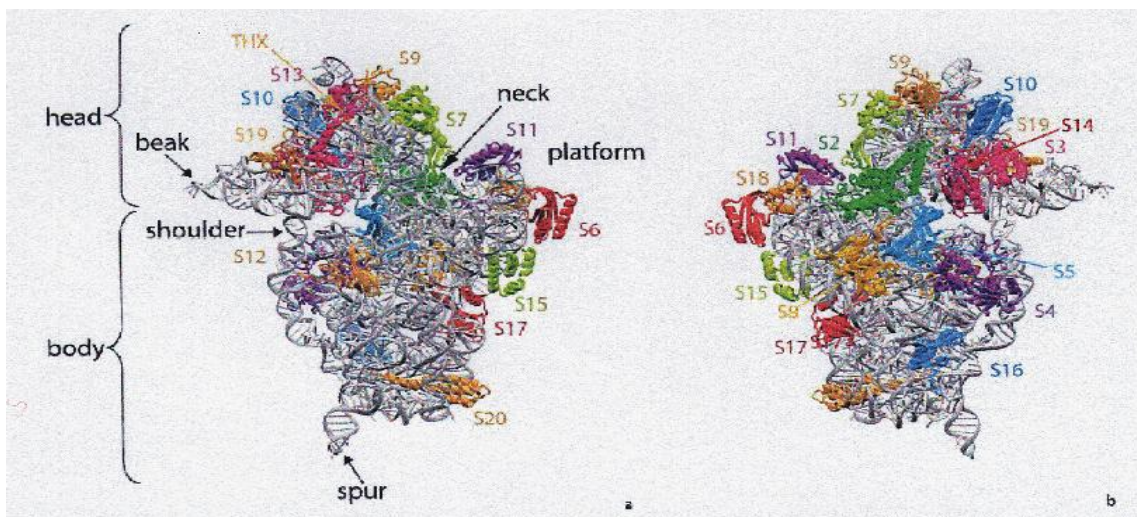


Abbildung 6: Proteinverteilung auf der 30S-Untereinheit von *Thermus thermophilus* (Brodersen *et. al*, 2002). Die 16 S-rRNA ist grau und die einzelnen Proteine sind in unterschiedlichen Farben dargestellt. (a) Frontalansicht der Untereinheit (Seite die mit der 50S-Untereinheit interagiert), (b) Rückansicht.

1.2.5 Struktur eukaryontischer Ribosomen

Im Gegensatz zu prokaryontischen 70S-Ribosomen ist es bisher weder gelungen, die 40S und 60S-Untereinheiten der Eukaryonten aus den Komponenten zu rekonstruieren, noch Kristalle zu züchten. Dies wäre jedoch ein essentieller Schritt für eine Strukturaufklärung, scheitert momentan allerdings an der großen strukturellen Flexibilität eukaryontischer Ribosomen.

Dabei scheint die Entwicklung auf diesem Feld analog zur Aufklärung der Struktur der 70S-Ribosomen und seiner Untereinheiten zu verlaufen.

Erste Erkenntnisse wurden durch proteolytischen Verdau und durch chemische Quervernetzung extrahierter 40S- und 60S-Untereinheiten von Säugern gewonnen. So konnten ribosomale Oberflächen-Proteine identifiziert und zum Teil lokalisiert werden. Die differentielle Protease-Sensitivität der eukaryontischen ribosomalen Proteine ist dabei in Übereinstimmung mit den unterschiedlichen Bindungsformen, die bei der 30S-Untereinheit gefunden werden (Brodersen *et. al*, 2002).

Die ribosomalen Proteine (rProteine) L6, L7 und L7a sowie L17, L24 und L31 bilden zwei gut zugängliche, räumlich getrennte Regionen der großen Untereinheit. Die r-Proteine L5, L11 und L24, die ebenfalls an der Oberfläche der großen Untereinheit lokalisiert wurden, scheinen mit der 40S-Untereinheit zu interagieren (Marion *et. al*, 1987). Die r-Proteine S2, S6, S10, S14, S15 und S25 wurden auf der Oberfläche von 40S-Untereinheiten lokalisiert und als Stabilisatoren der Konformation der Untereinheit identifiziert (Marion *et. al*, 1988).

Der Durchbruch gelang dann wesentlich später erneut der Gruppe von Joachim Frank; ihr gelang es mittels Cryo-Elektronenmikroskopie, erste Strukturbilder der 80S-Ribosomen der Hefe zu generieren (Spahn *et. al*, 2004). Dabei erreichen sie aktuell eine Auflösung von

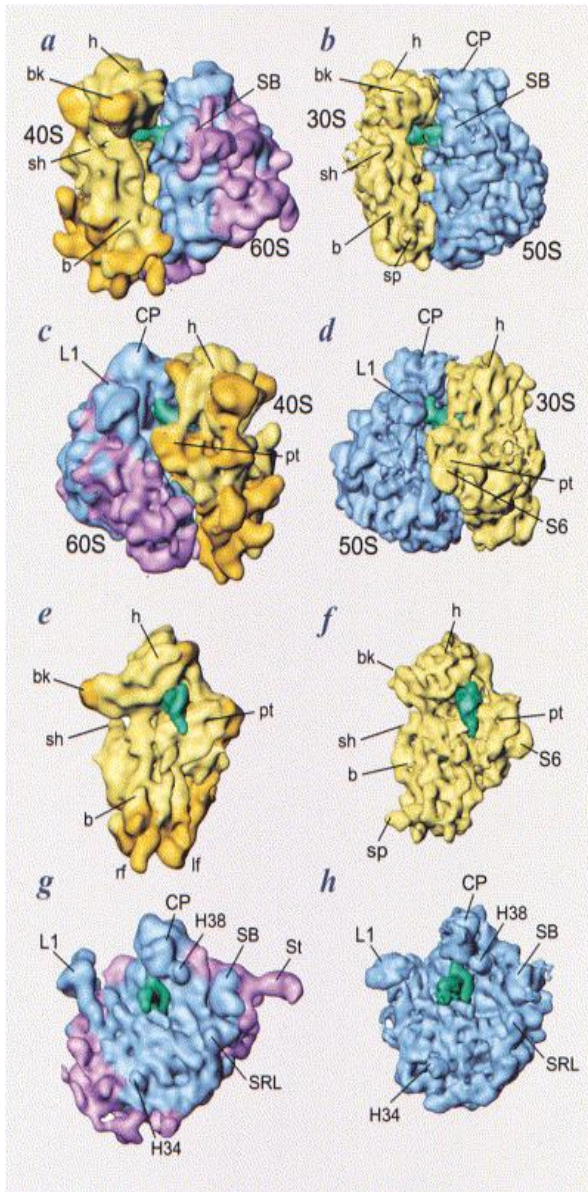


Abbildung 7: Vergleich des 80S -Ribosoms von *S. cerevisiae* (a, c, e und g) und des *E. coli* 70S Ribosome ((b, d, f und h). Die kleine Untereinheit ist gelb, die große blau, die in der P-Stelle gebundene tRNA in grün dargestellt.

11.8 Å.

Diese ist bereits ausreichend, um eine hohe strukturelle Konservierung zwischen den untersuchten 70S und 80S Ribosomen zu erkennen (s. Abbildung 7). Dies stützt die Hypothese, dass die Translationsmaschinerie während der Evolution über alle Organismen hinweg konserviert blieb. Dies wird unter anderem durch die hohe Konservierung der Brücken zwischen den Untereinheiten und der Ribosom-tRNA-Interaktion belegt. Strukturelle Unterschiede sind durch die Vergrößerung der rRNAs und dem Hinzukommen weiterer ribosomaler Proteine bedingt.

Es ist wohl nur noch eine Frage der Zeit, bis höher auflösende Aufnahmen der 80S Ribosomen und ihrer Untereinheiten realisiert werden können.

1.3 Expression der ribosomalen Gene

1.3.1 Gene der Ribosomalen RNA

Eukaryontische rRNA-Gene liegen in 100-200 Kopien vor, die tandemartig in sich wiederholenden Transkriptionseinheiten angeordnet und durch DNA-Spacersequenzen getrennt sind (Long *et. al*, 1980).

Die 28S, 18S und 5.8S rRNA entstehen durch die Prozessierung eines einzigen 45S-rRNA-Vorläufers, der von einer tandemartigen Gen-Wiederholung (gene array) abgeleitet ist. Diese befindet sich auf den kurzen Armen der Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22 auf der sogenannten Nucleolus-Organisierenden-Region (NOR), welche die Basis der strukturellen Organisation des Nucleolus darstellt (Henderson *et. al*, 1973; Worton *et. al*, 1988).

Die 5S-rRNA ist von einem tandemartigen Gen-Cluster auf Chromosom 1 abgeleitet (Sorensen *et. al*, 1991; Lomholt *et. al*, 1995).

1.3.2 Gene der Ribosomalen Proteine

Die Gene der ribosomalen Proteine verteilen sich im ganzen Genom. Auffällig ist die Anhäufung von 12 Genen ribosomaler Proteine auf Chromosom 19 (welches

nur 2% des haploiden Genoms ausmacht (Morton, 1991)) und dass jedes Chromosom bis auf Chromosom 7 mit einem oder mehreren Bestandteilen zur Struktur von Ribosomen beiträgt (Kenmochi *et. al*, 1998).

Jedes ribosomale Protein von Säugern wird nur von einem funktionellen Gen kodiert (Kuzumaki *et. al*, 1987), aber es ist nicht auszuschließen, dass weitere funktionelle Gene in manchen Fällen existieren. So werden auf den Chromosomen X und Y zwei funktionelle, gegeneinander austauschbare Isoformen des RPS4 kodiert (Fisher *et. al*, 1990).

Zudem sind für viele r-Proteine prozessierte Pseudogene bekannt (Kenmochi *et. al*, 1998). Bei der Maus gibt es offenbar intronhaltige Pseudogene und intronlose prozessierte Pseudogene (Heinze *et. al*, 1988).

1.4 Biogenese der ribosomalen Untereinheiten

Die Rekonstitution von Ribosomen konnte bei Eukaryonten bisher nicht *in vitro* experimentell durchgeführt werden. Im Gegensatz dazu assemblieren in Prokaryonten ribosomale Proteine und rRNAs *in vitro* in einer bestimmten Reihenfolge zu den ribosomalen Untereinheiten (Nomura, 1973). Diese Tatsache weist darauf hin, dass im eukaryontischen System für die Ribosomenbiogenese neben ribosomalen Proteinen und rRNAs weitere Faktoren benötigt werden.

Die Biogenese der ribosomalen Untereinheiten setzt sich aus folgenden Schritten zusammen (Shaw *et. al*, 1995):

- Transkription der rRNA-Gene
- post-transkriptionale Prozessierung und Modifizierung der 45S prä-rRNA zu reifen rRNAs
- Nucleolarer Transport der 5S rRNA
- Import der snoRNAs (small nucleolar RNAs) und der assoziierten Proteine
- Import ribosomaler Proteine und sequentielle Addition an die rRNA der verschiedenen präribosomalen Zwischenstufen
- Export der präribosomalen Untereinheiten vom Zellkern in das

Cytoplasma

Die kontinuierliche Synthese der ribosomalen Untereinheiten wird durch die Bereitstellung äquimolarer Mengen an ribosomalen Proteinen und rRNAs gewährleistet. Dies wiederum setzt die koordinierte Regulation auf verschiedenen Ebenen der Translation bzw. Transkription und des nuclearen Transports der einzelnen ribosomalen Komponenten voraus.

Die folgende Abbildung gibt eine Übersicht über die verschiedenen Schritte der Ribosomenbiogenese, die anschließend im einzelnen beschrieben werden.

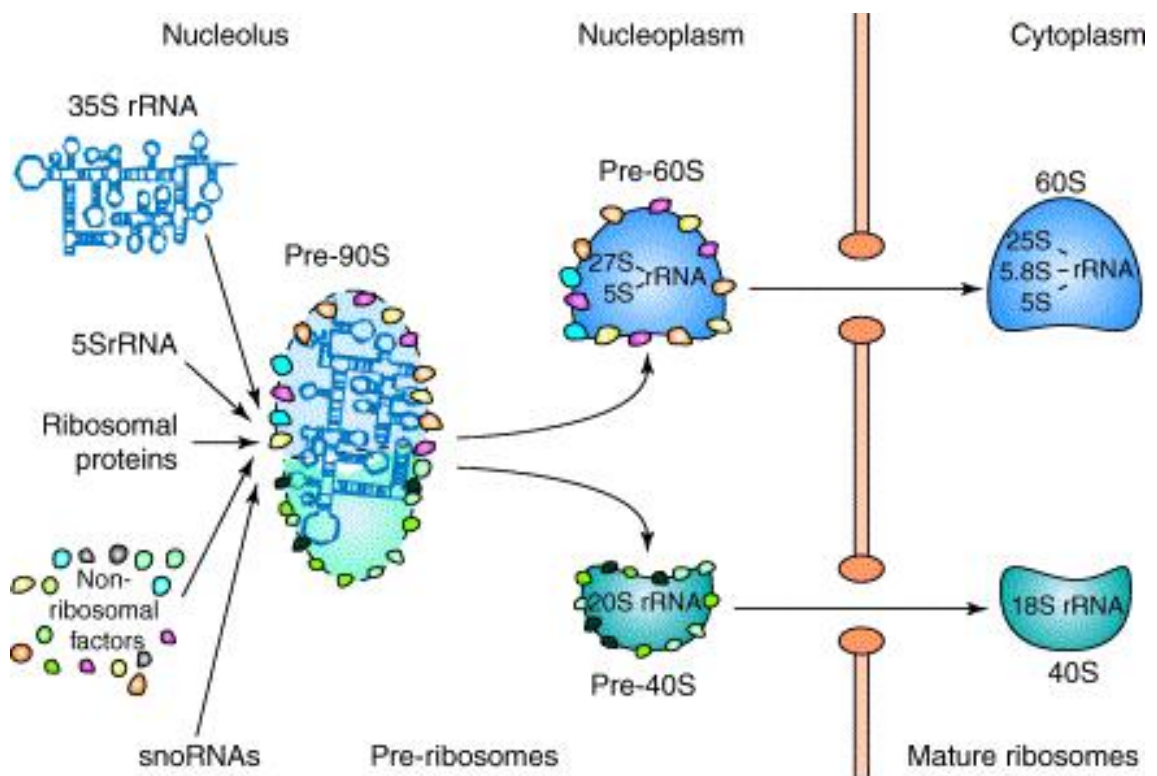


Abbildung 8: Übersicht der Ribosomenbiogenese der Hefe: Durch die unterschiedlichen Größen der rRNA-Transkripte bei Mensch und Hefe (s. Tabellen 2 und 3 auf Seite 8) entspricht die abgebildete 35S-rRNA der menschlichen 45S-rRNA. (Tschochner *et. al*, 2003).

1.4.1 Transkription der rRNA-Gene - post-transkriptionale Prozessierung und Modifizierung der 45S prä-rRNA zu reifen rRNAs

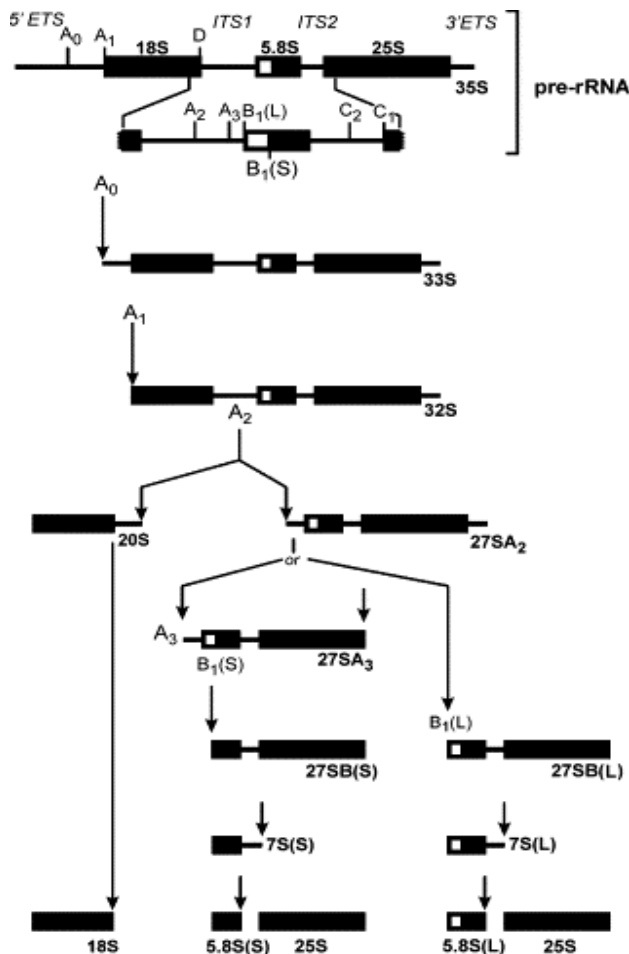


Abbildung 9: Prozessierung der 35S-prä-rRNA der Hefe zu 25S, 18S und 5.8S (Granneman *et. al*, 2004)

Die Transkription der rRNA-Gene erfolgt in den Nucleoli durch die RNA-Polymerase I unter Beteiligung mehrerer Transkriptionsfaktoren. Dabei entsteht als nucleolares Primärtranskript beim Menschen zunächst die 45S prä-rRNA, in der Hefe entsteht die 35S-prä-rRNA.

Eukaryonten besitzen externe Transkriptionsspacer (ETSs), welche die kodierenden rRNAs flankieren und zwei interne Transkriptionsspacer (ITSs) zwischen den kodierenden rRNA-Sequenzen.

Sowohl die ETSs als auch die ITSs werden während der Prozessierung endo- und exonucleolytisch entfernt (Melese *et. al*, 1995; Shaw *et. al*, 1995).

Die Abbildung 9 zeigt die Prozessierung der 35S-prä-rRNA der Hefe zu 25S, 18S und 5.8S in der Hefe.

Durch chemische Modifikation und sukzessive Spaltung an den Spaltstellen A₀, A₁ und schließlich A₂ entstehen aus der 35S-prä-rRNA die 20S und 27SA₂-prä-rRNAs. Durch Spaltung an der Spaltstelle D reift die 20S- im Cytoplasma zur 18S-rRNA. Das 27SA₂-Molekül wird in den meisten Fällen durch die RNase MRP zu 27SA₃ gespalten. Alternativ kann durch Spaltung an der Spaltstelle B die 27SB-prä-rRNA erhalten. Durch Prozessierung an der ITS2 entstehen die reifen 5.8S und 25S-rRNAs (Granneman *et. al*, 2004).

1.4.2 Nuclearer Export und Reimport der 5S rRNA

Die Gene der 5S rRNA werden hingegen vor der Synthese der anderen ribosomalen Komponenten im Nucleoplasma durch die RNA Polymerase III transkribiert (Hadjiolov, 1985).

Warum 5S rRNA oder 5S rRNA-assoziierte Komplexe anschließend in das Cytoplasma exportiert werden müssen, ist unklar, da zur vollständigen Synthese funktionaler Ribosomen die 5S rRNA in den Kern zurück transportiert werden muss (Steitz *et. al*, 1988, Dechampsme *et. al*, 1999).

Ein wahrscheinlicher Grund liegt in einer so ermöglichten Feedback-Regulierung der 5S rRNA-Synthese (Pittman *et. al*, 1999)

Zudem ist der nucleare Reimport der 5S rRNA an den Import des r-Proteins L5 gekoppelt (Rudt *et. al*, 1996; Murdoch *et. al*, 1996). Dieser Koimport ermöglicht einen stöchiometrischen Import der rRNA und des ribosomalen Proteins zur Synthese der großen Untereinheit (Dechampsme *et. al*, 1999).

Des weiteren scheint es, dass die 5S rRNA durch die Bindung an eine bisher einzigartige RNA-Bindungsdomäne des naszierenden L5 eine Chaperon-ähnliche Funktion übernimmt und so die Faltung von L5 zu einem funktionalen 5S-assoziierten RNP Komplex ermöglicht (Lin *et. al*, 2001).

Der 5S-RNP-Komplex wird dann aufgrund des Kernlokalisierungssignals (Nuclear Localization Signal, NLS) von L5 in den Kern importiert (s.1.5.2).

Die nucleolare Akkumulation des 5S-RNP initiiert die Bildung der großen ribosomalen 60S-Untereinheit (Michael *et. al*, 1996; Rudt *et. al*, 1996).

1.4.2.1 Import der snoRNAs (small nucleolar RNAs)

An der Prozessierung und Modifizierung der prä-rRNA sind snoRNAs beteiligt, die mit nucleolaren Proteinen assoziiert sind und RNPs bilden (Fournier *et. al*, 1993). Bestimmte snoRNAs sind an der ortsspezifischen 2'-O-Methylierung der 45S-prä-rRNA beteiligt (Cavaille *et. al*, 1996; Maden, 1996).

In höheren Eukaryonten bildet die U3 snoRNA mit Fibrillarin einen Komplex. Dieser RNP-Komplex bindet die 5'-Enden der prä-rRNA und ist für die Entfernung der 5'-ETS verantwortlich (Kass *et. al*, 1990).

1.4.2.2 Addition ribosomaler Proteine

Die ribosomalen Proteine werden aufgrund ihrer Kernlokalisierungssignale in den Zellkern importiert und akkumulieren schließlich in den Nucleoli.

Ribosomale Proteine werden sequenziell auf verschiedenen Stufen der Ribosomenbiogenese addiert.

- Die ersten Proteine (S3a, S6, S7, S8, S11, S13, S14, S18, S20, S34/24 und S25) lagern sich bereits an die 45S prä-rRNA an.
- S3 und S21 werden dagegen erst bei der Bildung der präribosomalen 40S-Untereinheit addiert. S2, S19, S26 und S29 konnten bislang lediglich in der funktionsfähigen cytoplasmatischen 40S-Untereinheit nachgewiesen werden und assoziieren daher vermutlich extranucleolar (Todorov *et. al*, 1983).
- Nucleolare Proteine (Nopp140, B23 und Nucleolin), die beim Transport von NLS-Proteinen in den Zellkern involviert sind, tragen wahrscheinlich entscheidend zur Assoziation ihrer Transportsubstrate mit rRNA und/oder anderen ribosomalen Proteinen bei (Xue *et. al*, 1994).

1.5 Nucleocytoplasmatischer Transport und Nucleolare Akkumulation ribosomaler Proteine

1.5.1 Der Zellkern

1.5.1.1 Die Kernhülle

Die Kernhülle, bestehend aus einer inneren und einer äußeren Kernmembran, den Kernporenkomplexen (NPC) und der Kernfaserschicht (Lamina), definiert das nucleare Kompartiment.

Beide ineinander übergehende Kernmembranen unterscheiden sich durch ihre Proteinzusammensetzung:

- Die innere Kernmembran enthält spezifische integrale Membranproteine, die sowohl mit der Kernlamina als auch mit Chromatin assoziiert sein können.

- Die äußere Kernmembran ähnelt der Membran des rauen ER (rER) in biochemischer und funktioneller Hinsicht stark. Beide sind mit den für die Proteinsynthese verantwortlichen Ribosomen bestückt und gehen ineinander über.

Der von ihnen eingeschlossene perinucleare Raum setzt sich im Lumen des ER fort.

Die innere Kernmembran wird auf ihrer nucleoplasmatischen Seite von der Kernlamina ausgekleidet: Sie stellt ein filamentöses Netzwerk dar, welches die Kernhülle stabilisiert und Chromatin bindet. Die Kernlamina setzt sich aus den Lamin-Subtypen A und B zusammen.

Lamina-assoziierte Polypeptide der inneren Kernmembran wie LAP1, LAP2 und p58 interagieren mit den Lamin-Subtypen A und B. Dabei bindet LAP1 sowohl Typ A als auch Typ B Lamin. Das an der Bindung von Chromatin beteiligte integrale Membranprotein LAP2 ist ebenso wie p58 nur mit Typ B Lamin assoziiert (Gerace *et. al*, 1994).

1.5.1.2 Der Kernporenkomplex und Nucleoporine

Der Kernporenkomplex (NPC), der die innere und äußere Kernmembran verbindet, ermöglicht den bidirektionalen Transport von Makromolekülen zwischen Cytoplasma und Nucleoplasma.

Der NPC hat eine Masse von etwa 125 MDa und besitzt bei Vertebraten einen Außendurchmesser von ungefähr 120 nm und eine Höhe von ungefähr 80 nm (Pante *et. al*, 1996a).

Die Kernporendichte variiert zwischen den verschiedenen Zelltypen von 2 bis 60 NPCs/ μm^2 (Gerace *et. al*, 1988).

Das strukturelle Grundgerüst eines NPC besteht aus zwei zueinander koaxial angeordneten Ringen, die

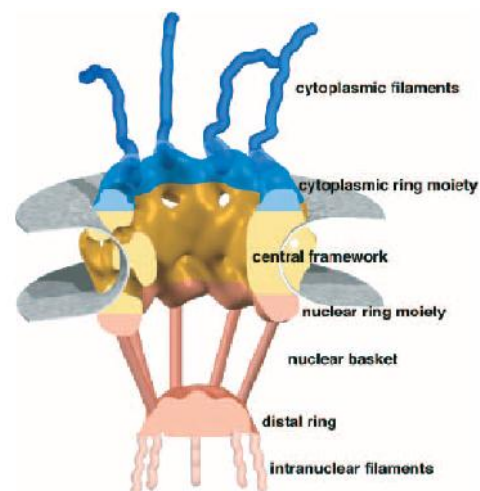


Abbildung 10: Schematische Abbildung der Architektur des Kernporenkomplexes (Fahrenkrog, 2006)

radial durch acht Speichen miteinander verbunden sind. Der etwa 55 MDa große zentrale Speichenkomplex des NPC setzt sich aus den drei folgenden Domänen zusammen:

- der luminalen Speichendomäne,
- der zentralen Speichendomäne,
- der inneren Speichendomäne.

Innerhalb dieses Speichenkomplexes verläuft ein wässriger Kanal (Transporter) mit einem Durchmesser von 9 nm und einer Länge von 15 nm, der die passive Diffusion von Molekülen bis zu einer Größe von 40-60 kDa ermöglicht. Der cytoplasmatische Ring mit einem Molekulargewicht von etwa 32 MDa ist mit acht in das Cytoplasma hineinragenden Fibrillen assoziiert. Vom nucleoplasmatischen Ring, dessen Molekulargewicht etwa 21 MDa beträgt, erstrecken sich acht Fibrillen mit einer Länge von ungefähr 50 nm in das Kernlumen. Auf diesen nucleoplasmatischen Strukturelementen liegt der distale Ring mit einem Durchmesser von 30-50 nm und bildet eine korbähnliche Struktur (Basket) (Pante *et. al*, 1996a).

Mittels „Atomic Force Microscopy“ (AFM) konnte die seit geraumer Zeit in der Literatur diskutierte Änderung der cytoplasmatischen und der nucleoplasmatischen Morphologie des NPC in Abhängigkeit mikromolekularer Mengen von Calcium-Ionen unter nativen Bedingungen bestimmt werden (Stoffler *et. al*, 1999). Dabei ist lediglich der distale Ring des nuclearen Baskets einer morphologischen Änderung unterworfen. Die Topographie der cytoplasmatischen Komponenten des NPC bleibt unverändert. Ein aktuelles Modell beschreibt den dynamischen distalen Ring als eine Art blendenförmige Iris, die in Gegenwart von Calcium-Ionen geöffnet und in Abwesenheit von Calcium-Ionen geschlossen vorliegt. Die Calcium-abhängigen reversiblen strukturellen Änderungen des nuclearen Baskets weisen im geöffneten Zustand einen Durchmesser von 20-30 nm auf. Darüber hinaus konnte in Abwesenheit von ATP keine Calcium-abhängige Strukturänderung beobachtet werden.

Der NPC ist in der Regel aus 8 oder 16 Kopien von 50-100 verschiedenen Proteinen (Nucleoporine) aufgebaut (Bastos *et. al*, 1995), die in einer achtfachen Symmetrie um den zentralen Kanal angeordnet sind. Die Primärstruktur einiger

charakterisierter Nucleoporine zeichnet sich durch das Auftreten repetitiver Motive der Konsensussequenzen XFXFG oder GLFG (Aminosäuren im Einbuchstaben-Code) aus, den sogenannten FG-Repeats.

Proteine wie NUP214, NUP180, p62 und NUP153, die diese Motive aufweisen und auf der cytoplasmatischen bzw. nucleoplasmatischen Seite des NPC exponiert sind, stellen vermutlich potentielle Bindungsstellen für lösliche Transportfaktoren dar (Rexach *et. al*, 1995). Nup153, ein Protein des nuclearen Baskets, enthält darüber hinaus mehrere Zinkfingerregionen, die für DNA- und RNA-bindende Proteine charakteristisch sind. NUP153 ist am Export von mRNA beteiligt (Bastos *et. al*, 1996).

POM121, POM152 und gp210, die die Charakteristika integraler Membranproteine aufweisen, sind in der NPC-Membran lokalisiert und sowohl für die Verankerung des NPC in der Kernmembran als auch für die Partitionierung der Membranproteine der inneren und äußeren Kernmembran verantwortlich (Rout *et. al*, 1994).

1.5.2 Sequenzen zum Kernimport und Kernexport: NLS und NES

Die Selektivität des Imports von Proteinen in den Zellkern wird durch Kernlokalisierungssignale (NLS) gewährleistet. Aufgrund der bislang ermittelten NLSs ergeben sich zwei hinreichende Kriterien für die Definition von Kernsignalen (Silver, 1991):

- Deletion und Mutation der NLS führen zu einer Blockade des Kernimports.
- Cytoplasmatische Proteine werden nach Kopplung mit einem NLS in den Zellkern dirigiert.

1.5.2.1 Klassische Kernlokalisierungssignale

Nachdem untereinander homologe Kernsignale identifiziert werden konnten, wurde die Minimalsequenz K-(K/R)-X-(R/K) als klassisches Kernlokalisierungssignal postuliert (wobei X die Aminosäuren K, R, V, P oder A, nicht aber N einnehmen darf) (Chelsky *et. al*, 1989).

Klassische Kernlokalisierungssignale haben folgende Eigenschaften gemeinsam:

- Das NLS hat keine bestimmte Position im Protein und wird nach dem

Transport nicht abgespalten.

- Die NLSs sind in der Regel positiv geladen und weisen eine Länge von vier bis acht Aminosäuren auf.
- In der Nähe der NLSs liegen häufig helixunterbrechende Aminosäuren wie Prolin oder Glycin.
- Proteine können mehrere NLSs besitzen (Garcia-Bustos *et. al*, 1991).
- Bei bipartiten NLS sind beide Teilkomponenten für den Kerntransport essentiell. Der Spacer kann jedoch einer großen Variabilität in bezug auf Länge und Sequenz unterliegen (Dingwall *et. al*, 1991).

Protein		NLS
SV40 T-Antigen ^a	Monopartit	126 PKKKRKV 132
Nucleoplasmin ^b	Bipartit	150 KRPAATKKAGQAKKKK 170

Tabelle 4: Klassische monopartite und bipartite Kernlokalisierungssignale. Basische Aminosäuren der NLS sind fett hervorgehoben (^aKalderon *et. al*, 1984, ^b Dingwall *et. al*, 1989)

1.5.2.2 Nicht-klassische Kernlokalisierungssignale

Jedoch zeichnen sich einige Kernlokalisierungssignale durch das Fehlen basischer Aminosäure-Cluster, die für klassische Kernlokalisierungssignale typisch sind, aus.

Die 13 Aminosäuren lange NLS-Sequenz des transkriptionalen Repressors MAT α 2 aus *Saccharomyces cerevisiae* enthält neben zwei basischen zahlreiche hydrophobe Aminosäuren (Hall *et. al*, 1990; Garcia-Bustos *et. al*, 1991).

Protein	NLS
MAT α 2	MNKIPIKDLLNPQ

Tabelle 5: Nicht-klassisches NLS des transkriptionalen Repressors MAT α 2

Es wird ebenfalls die Funktion von Zuckerresten als nicht-peptidische Kernsignale beim Zucker-abhängigen Kernimport von Neoglykoproteinen diskutiert (Duverger *et. al*, 1995).

1.5.2.3 Bekannte Kernlokalisierungssignale ribosomaler Proteine

Ribosomale Proteine stellen eine überaus vielseitige Klasse von Import-Substraten

(Karyophilen) dar. Sie sind in der Regel überaus basisch und weisen im Gegensatz zu den klassischen mono- und bipartiten NLSs komplexe Importsignale auf.

Die Komplexität dieser Kernlokalisierungssignale zeigt sich sehr deutlich bei den ribosomalen Proteinen aus *Saccharomyces cerevisiae*. Daneben weisen einige der bisher charakterisierten ribosomalen Proteine mehrere NLSs auf.

Protein		NLS	Typ
L3 ^a		1 SHRKYEAPRHGHLGFLPRKRA 21	bipartit
L25 ^b	NLS I	11 KKAVVKG 17	monopartit
	NLS II	18 TNGKKALKVRT 28	monopartit
L28 ^c	NLS I	6 KTRKHRG 12	monopartit
	NLS II	23 KHRKHPG 29	monopartit
S17a ^d		2 GRVRTK 7	monopartit
S22 ^e		20 GKRQVLIRP 28	monopartit
S25 ^e	NLS I	11 AKAAAALAGGKKS KKKTSKKS SMKDRA 36	bipartit
	NLS II	87 GIKPKISKH 95	monopartit

Tabelle 6: NLSs ribosomaler Proteine aus *Saccharomyces cerevisiae*. Basische Aminosäuren sind fett hervorgehoben. [(a) Moreland *et. al.*, 1985; (b) Schaap *et. al.*, 1991; (c) Underwood *et. al.*, 1990; (d) Gritz *et. al.*, 1985; (e) Timmers *et. al.*, 1999.]

Protein		NLS	Typ
L5 ^a	NLS I	21 RRREGKTDYYARKRLV 37	monopartit
	NLS II	255 KKPKKEVKKKR 265	monopartit
L7a ^b	NLS I	34 KRPK 37	monopartit
	NLS II	72 KRLK 75	monopartit
	NLS III	110 KKQRL LARA EKKAAGKGDVPTKR 132	bipartit
S6 ^c	NLS I	167 KKPR 170	monopartit
	NLS II	188 KRRR 191	monopartit
	NLS III	215 KR 216 und 230 KRRR 233	bipartit
S7 ^d	NLS	115 KRPR 118	monopartit

Tabelle 7: NLSs ribosomaler Proteine aus *Homo sapiens*. Basische Aminosäuren sind fett hervorgehoben. [(a) Rosorius *et. al.*, 2000; (b) Russo *et. al.*, 1997; (c) Schmidt *et. al.*, 1995; Lipsius *et. al.*, 2005; (d) Annilo *et. al.*, 1998]

Auffallend beim menschlichen Protein L5 ist, dass diese charakterisierte Region

ebenfalls für die Bindung an die Nucleoli verantwortlich ist (Rosorius *et. al*, 2000).

1.5.2.4 Nucleare Exportsignale

Nucleare Exportsignale (NES) vermitteln den Transport von Proteinen aus dem Zellkern. Den NES-Prototyp stellt das 10 Aminosäuren lange Leucin-reiche NES-Peptid dar, das erstmals im HIV-Rev-Protein identifiziert wurde (Wen *et. al*, 1995).

Dieser Typ an NES besteht aus fünf hydrophoben Leucinen, deren räumliche Anordnung für die Interaktion mit dem Exportfaktor CRM1 von großer Bedeutung ist (Fornerod *et. al*, 1997, Fukuda *et. al*, 1997; Stade *et. al*, 1997).

Protein	NES
HIV-Rev	73 LQLPPLERLTL 83

Tabelle 8: NES des HIV-Rev-Proteins. Die Aminosäure Leucin ist fett hervorgehoben (Wen *et. al*, 1995)

Die im ribosomalen Protein L5 identifizierte ebenfalls leucin-reiche NES unterscheidet sich allerdings durch die Bildung von zwei Clustern (Rosorius *et. al*, 2000)

Protein	NES
L5 ^b	101 TG LLL ARR LLN 111

Tabelle 9: NES des ribosomalen Proteins L5. Die Aminosäure Leucin ist fett hervorgehoben (Rosorius *et. al*, 2000)

Da das ribosomale Protein L5 als Shuttle für die 5S-rRNA dient (s. o.) kann man davon ausgehen, dass Proteine mit einer NES als Mediatoren des nuclearen Exports der RNA, mit der sie assoziiert sind, dienen (Hurt *et. al*, 1999).

1.5.3 Mechanismen des nucleocytoplasmatischen Transportes

Während Moleküle bis zu einer Ausschlußgröße von 40-60 kDa passiv durch die Kernporen diffundieren können, ist der Transport von größeren Molekülen sowohl energie- als auch rezeptorabhängig (Silver, 1991).

Zwischen Kern und Cytoplasma findet ein stetiger Austausch von

Makromolekülen statt:

- Nucleare Proteine wie Histone, DNA- und RNA-Polymerasen, genregulierende und RNA-prozessierende Proteine werden selektiv vom Cytoplasma, wo sie gebildet werden, in den Kern transportiert.
- Im Kern synthetisierte tRNAs und mRNAs werden selektiv ins Cytoplasma exportiert.
- Die am Nucleolus gebildeten ribosomalen Untereinheiten werden während ihres Reifeprozesses in das Cytoplasma exportiert.

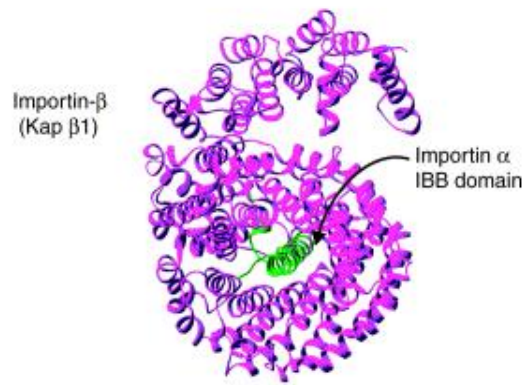


Abbildung 11: Bindung von Importin β an die IBB-Domäne von Importin α (Conti *et al.*, 2001)

Der Protein-Import in die Mitochondrien oder in das rER benötigt spezifische Lokalisationssequenzen, die in der Regel nach dem Transport entfernt werden. Aus diesem Grund befinden sich die Signalpeptide an den C- bzw. N-terminalen Enden dieser Proteine (Rapoport *et. al.*, 1996; Schatz *et. al.*, 1996). Nach dem Import verbleiben die Proteine in dem jeweiligen Zellkompartiment.

Im Gegensatz dazu werden Kernsignale nach dem Transport nicht entfernt, da nicht-chromatingebundene nucleare Proteine in höheren Eukaryonten nach der Mitose in den Zellkern reimportiert werden müssen oder als Shuttle-Proteine zwischen Zellkern und Cytoplasma hin- und herpendeln.

Es stellt sich die Frage, wie Transportrezeptoren zwischen Zellkern und Cytoplasma hin- und herpendeln können, während sie ihre Substrate nur in eine Richtung transportieren. Diese Asymmetrie in den Import-/Exportzyklen führte zur Hypothese, dass die Bindung eines Transportsubstrats an seinen jeweiligen Rezeptor von spezifischen Faktoren im Kern oder Cytoplasma reguliert wird. Die molekularen Mechanismen, die den Transportvorgängen zugrunde liegen, waren daher in jüngster Zeit Gegenstand zahlreicher Untersuchungen.

1.5.3.1 Transportrezeptoren: Importine und Exportine

Der aktive Transport durch den NPC benötigt Transportfaktoren, die sich in drei

Kategorien einordnen lassen:

- Transportrezeptoren,
- Adapter-Moleküle,
- Bestandteile des RanGTPase-Systems.

Die Importin β -Superfamilie der Transportrezeptoren besteht aus bisher 13 isolierten Proteinen mit Molekulargewichten zwischen 90 und 130 kDa. Alle

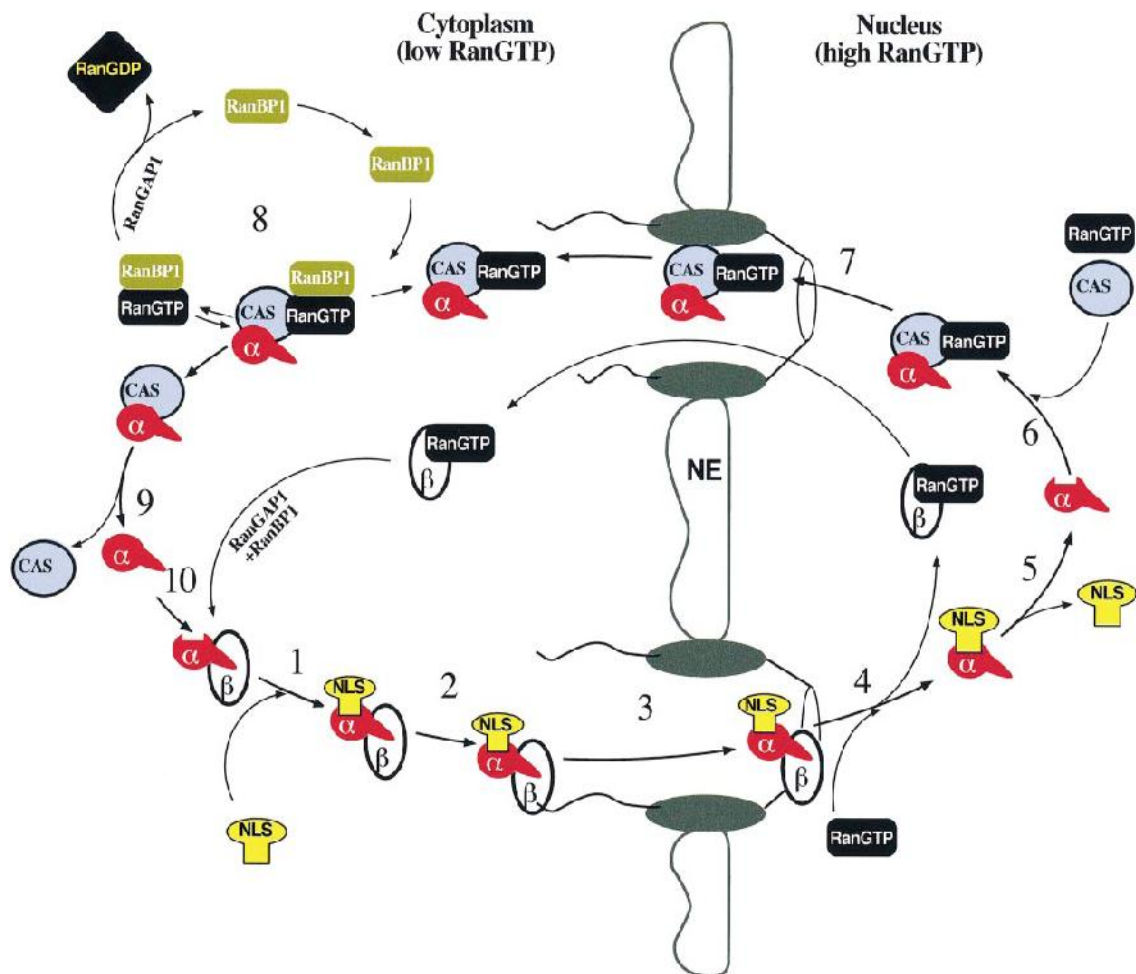


Abbildung 12: Importmechanismus klassischer NLS-Proteine (Görlich, 1998)

Mitglieder weisen an ihren N-terminalen Enden RanGTP-Bindungsmotive auf und sind in der Lage, mit dem NPC zu interagieren.

Je nach Transportrichtung werden die Mitglieder der Importin β -Superfamilie in Importine und Exportine unterteilt. Ausschlaggebend dabei ist, ob RanGTP die Bindung oder die Freisetzung der zu transportierenden Substrate bewirkt (s. Abbildung 13).

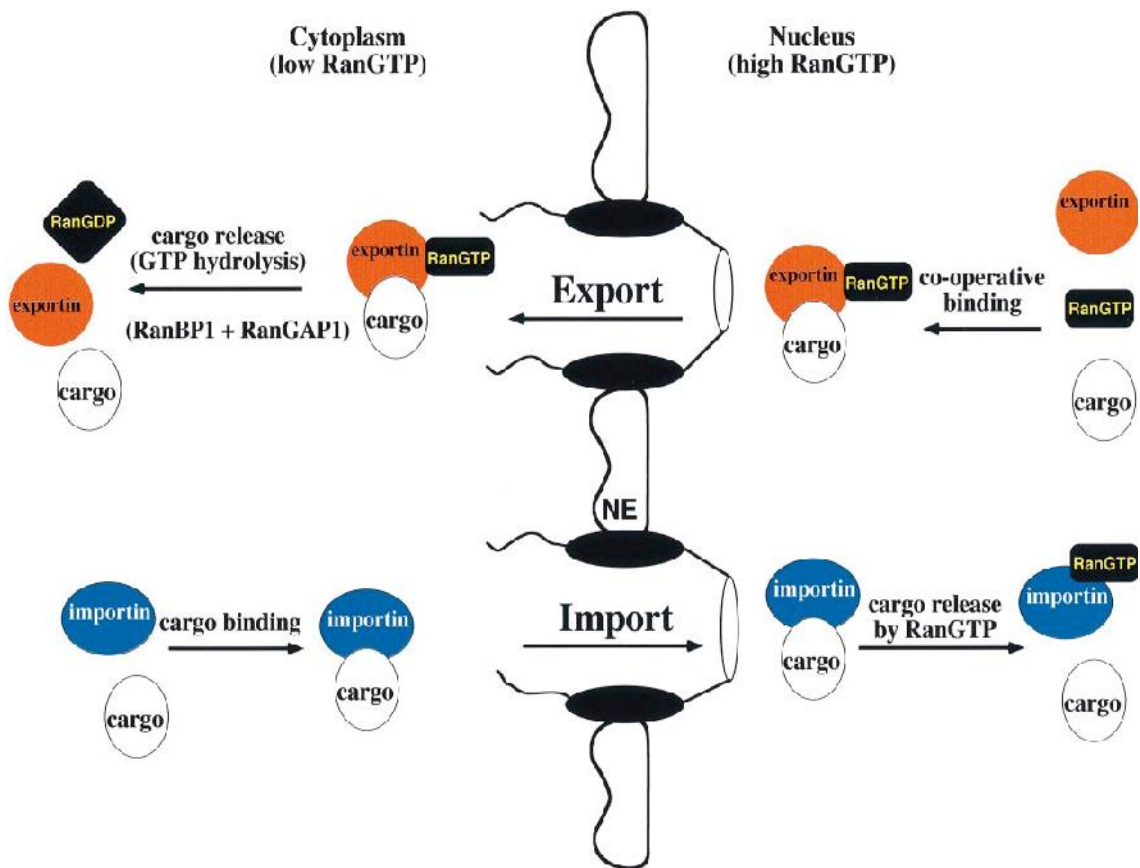


Abbildung 13: Transport von Importinen und Exportinen (Görlich, 1998)

Adapter-Moleküle wie Importin α verstärken in einigen Fällen die Interaktion zwischen Transportrezeptor und Transportsubstrat. Durch die Bindung von RanGTP wird die Interaktion zwischen Transportrezeptor und Transportsubstrat bzw. Adapter-Molekül reguliert.

Bisher konnten mehrere Transportwege für verschiedene Klassen von Transportsubstraten mit den entsprechenden Transportrezeptoren identifiziert werden (Nigg, 1997):

- Im klassischen Weg sind Importin α und β am Import von NLS-Proteinen beteiligt, wobei der Rücktransport von Importin α über den Exportfaktor CAS erfolgt.
- Transportin bewirkt den Import von hnRNP-Proteinen mit Glycin-reichen M9-Domänen (Pollard *et. al*, 1996).
- Exportin 1 ermöglicht den Export von Proteinen mit Leucin-reichen NESs (Fornerod *et. al*, 1997; Fukuda *et. al*, 1997; Stade *et. al*, 1997).

- Exportin-t bewirkt den Export von tRNA (Arts *et. al.*, 1998).
- Karyopherin $\beta 3$ und $\beta 4$ sind wahrscheinlich beim nuclearen Import ribosomaler Proteine involviert (Rout *et. al.*, 1997).

Die Funktion der restlichen 6 Transportfaktoren ist bisher unbekannt. Darüber hinaus konnte bis heute nicht vollständig geklärt werden, welche Exportine am Transport der ribosomalen Untereinheiten und der mRNA beteiligt sind. Allerdings konnte gezeigt werden, dass RNA (mRNA, rRNA und tRNA) generell als RNA-Protein-Komplex (RNP) exportiert wird (Izaurrealde *et. Al.*, 1995).

1.5.3.2 Importmechanismus klassischer NLS-Proteine

Importin α/β -Heterodimere erkennen und binden im Cytoplasma nucleare Proteine mit mono- oder bipartiten Kernsignalen (Görlich *et al.*, 1995a; Imamoto *et al.*, 1995).

Dabei stellt Importin α die NLS-Bindungsstelle zur Verfügung (Adam *et al.*, 1994) und interagiert mittels der Importin β -bindenden Domäne (IBB) mit der Importin β -Untereinheit (Görlich *et al.*, 1996a; Weis *et al.*, 1996).

Der trimere Komplex, bestehend aus dem NLS-Protein und dem Importin α/β -Heterodimer, bindet schließlich über die Importin β -Untereinheit am distalen Ende der cytoplasmatischen NPC-Filamente (Görlich *et al.*, 1995b; Moroianu *et al.*, 1995; Pante *et al.*, 1996a).

Der Transport des trimeren NLS-Protein/Importin α/β -Komplexes durch die Kernpore ist ein energieabhängiger Prozess und benötigt als Energie für den Import die durch Ran (Ras-analoge GTPase) katalysierte Hydrolyse von GTP (Melchior *et al.*, 1993; Moore *et al.*, 1993).

Nach der Translokation in den Zellkern erfolgt die Dissoziation des trimeren Importkomplexes durch die Bindung von RanGTP an die Importin β -Untereinheit (Rexach *et al.*, 1995; Chi *et al.*, 1996; Görlich *et al.*, 1996b).

Die Dissoziation des Importin-Heterodimers durch RanGTP beendet die Translokation auf der nuclearen Seite des NPC und stellt den Schlüsselschritt im NLS-abhängigen Proteinimport dar.

Durch die geringere Affinität von RanGTP-gebundendem Importin β zu Importin α wird die Re-Assoziation dieser beiden Transportfaktoren auf der nucleoplasmatischen Seite unterdrückt und so gewährleistet, dass Importin α nach Freisetzung des NLS-Proteins separat aus dem Zellkern exportiert werden kann (Izaurralde *et al.*, 1997).

Importin β wird zusammen mit RanGTP ins Cytoplasma transportiert. Auf der cytoplasmatischen Seite wird die Dissoziation von Importin β und RanGTP durch die GTP-Hydrolyse mit Hilfe von RanBP1 und RanGAP1 herbeigeführt.

Der Export von Importin α benötigt den spezifischen Exportfaktor CAS. CAS besitzt zwei separate Bindungsstellen für RanGTP und Importin α . RanGTP erhöht die Affinität von CAS zu Importin α um den Faktor 300 (Kutay *et al.*, 1997).

Damit gewährleistet der RanGTP-Gradient entlang der Kernmembran, dass Importin α auf der cytoplasmatischen Seite die Bindung mit Importin β und auf der nucleoplasmatischen Seite die Bindung mit CAS ausbildet. Nach Bildung des trimeren RanGTP/CAS/Importin α -Komplexes erfolgt die Translokation ins Cytoplasma. Im Cytoplasma bindet RanBP1 an Ran des RanGTP/CAS/Importin α -Komplexes (Bischoff *et al.*, 1997). Der RanBP1/RanGTP-Komplex steht dabei mit dem CAS/Importin α -Komplex in einem dynamischen Gleichgewicht. Die Hydrolyse von GTP durch RanGAP1 bewirkt jedoch die irreversible Dissoziation dieser beiden dimeren Komplexe. Da Ran-freies CAS eine weitaus geringere Affinität zu Importin α aufweist, wird Importin α freigesetzt. Damit steht CAS für einen weiteren Transportzyklus zur Verfügung. Interessanterweise ist der Transport von CAS in den Zellkern energieunabhängig und benötigt keine Transportfaktoren (Kutay *et al.*, 1997). Freies Importin α bindet schließlich Importin β und bildet das für einen weiteren Transportzyklus benötigte Importin α/β -Heterodimer.

Am Reimport von Ran, welches kontinuierlich exportiert wird, ist NTF2 als Importfaktor beteiligt. (Ribbeck *et al.*, 1998, Smith *et al.*, 1998)

1.5.3.3 RanGTP/GDP-Zyklus

Die GTPase Ran wechselt wie ein molekularer Schalter zwischen der GTP- und der GDP-gebundenen Form. Dieser Zyklus stellt ein regulierendes Moment beim Transport von NLS-Proteinen in den Zellkern dar. Der Import von NLS-Proteinen findet nur bei niedriger cytoplasmatischer RanGTP-Konzentration statt und wird im Kerninneren durch die hohe RanGTP-Konzentration terminiert.

Die unterschiedliche Lokalisierung der Ran-Regulatoren (RanGEF im Kern und RanGAP im Cytoplasma) sorgen dafür, dass zwischen beiden Zellkompartimenten der für den Transport benötigte RanGTP/RanGDP-Konzentrationsgradient entsteht.

Im Nucleoplasma wird Ran über den chromatingebundenen Nucleotid-Austauschfaktor RanGEF (RCC1) in die RanGTP-Form umgewandelt (Ohtsubo *et al.*, 1989; Bischoff *et al.*, 1991), wohingegen RanGTP im Cytoplasma über das RanGTPase-aktivierende Protein RanGAP (RanGAP1) in die RanGDP-Form überführt wird (Matunis *et al.*, 1996; Mahajan *et al.*, 1997). Die Umwandlung von RanGTP in RanGDP durch RanGAP1 wird durch den cytoplasmatischen Faktor RanBP1 (Ran-bindendes Protein) erleichtert (Coutavas *et al.*, 1993; Bischoff *et al.*, 1995; Richards *et al.*, 1996). Diese asymmetrische Verteilung von RCC1, RanGAP1 und RanBP1 führt zu einem RanGTP-Gradienten entlang der Kernmembran mit einer niedrigen RanGTP-Konzentration auf der cytoplasmatischen und einer hohen RanGTP-Konzentration auf der nucleoplasmatischen Seite der Kernmembran (s.).

Nach bisherigen Vorstellungen ist dieser RanGTP-Gradient dafür verantwortlich, dass es im Cytoplasma zur Bildung und im Nucleoplasma zur Dissoziation des Importin α/β -Heterodimers kommt.

1.5.3.4 Translokation durch die Kernpore

Die Translokation der Transportkomplexe durch den Kernporenkomplex ist ein passiver Diffusionsprozess, der paradoxerweise durch Bindungen der beteiligten Faktoren beschleunigt wird. Dabei spielen die bereits erwähnten FG-Repeats der Nucleoporine eine essentielle Rolle. Während Proteine ohne Bindungsmöglichkeiten zu den FG-Repeats den NPC durch einen Kanal von etwa 8-10nm Durchmesser passieren können (Keminer *et al.*, 1999), können FG-Motiv-

bindende Proteine durch einen etwa 40nm weiten Kanal diffundieren (Pante *et al.*, 2002).

Messungen ergaben, dass der aktive Transport durch die Kernpore Translokationen von bis zu 80MDa/Kernpore/Sekunde ermöglicht. Das entspricht etwa 800 einzelnen Translokationen eines 100kDa Proteins in einer Sekunde durch nur eine Kernpore (Ribbeck *et al.*, 2001a).

Unterschiedliche Modelle werden zur Zeit diskutiert. Dabei konkurrierten bis vor kurzem insbesondere die Modelle der Brownschen Toraffinität und das Modell der selektiven Phase. Unbestritten ist dabei, dass die Translokation durch die Kernpore ein energieunabhängiger Prozess ist (Ribbeck *et al.*, 1999).

Das Modell der Brownschen Toraffinität sieht vor, dass die Nucleoporine jeweils in das Cytoplasma und das Nucleoplasma hineinragen und dass ihre FG-Repeats als Fangarme dienen, um Transportkomplexe zum Kernporenkanal zu dirigieren, der dann durch passive Diffusion passiert wird (Rout *et al.*, 2000). Die Ausschussgröße ergibt sich in diesem Modell durch die

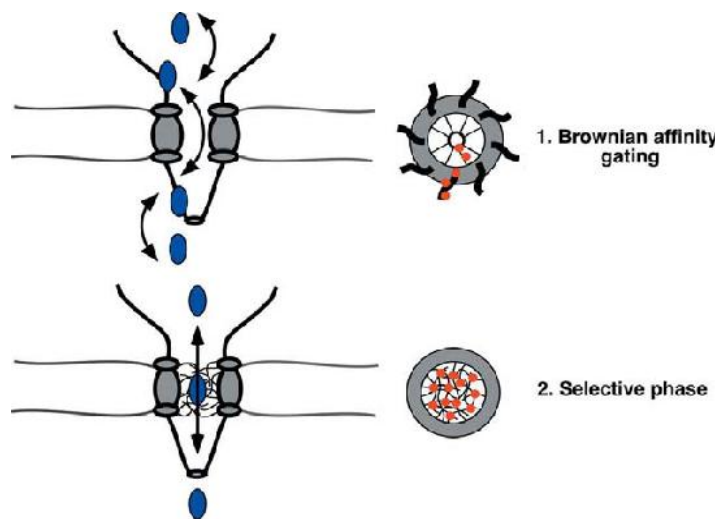


Abbildung 14: Modelle der Translokationsmechanismen: 1. Brownsche Toraffinität und 2. Modell der selektiven Phase (Fried *et al.*, 2003)

Größe des Kernporenkanals, die Translokation von Makrokomplexen, wie den ribosomalen Untereinheiten lässt sich so nicht erklären. Die Deletion cytoplasmatischer Nucleoporine oder ihrer FG-Repeats führte zudem zu keinem Verlust der Translokationseffizienz, sodass dieses Modell die Beobachtungen nicht vollständig erklären kann (Walther *et al.*, 2002).

Das Modell der selektiven Phase beruht auf der Idee eines Netzwerkes, welches Nucleoporine im Kernporenkanal anhand der FG-Repeats ausbilden. Transportkomplexe hätten daraufhin die Möglichkeit, durch Bindung der FG-Repeats dieses Netzwerk lokal aufzulösen und so durch die Kernpore zu

diffundieren (Ribbeck *et al.*, 2001b). Die Ausschlussgröße ergibt sich in diesem Modell daher durch die Maschengröße des Nucleoporinnetzwerkes und würde einen Transport von Makrokomplexen ermöglichen. Allerdings konnte die Existenz eines solchen Netzwerkes bislang nicht nachgewiesen werden.

Ein neues Modell versucht die vorigen Modelle zu vereinheitlichen und zu vervollständigen.

Das Dimensionsreduzierungs-Modell beschreibt einen

Translokationsmechanismus, in dem die Filamente und der zentrale Kanal des NPC von FG-Repeats bedeckt sind (Abbildung 15A). Ein im zentralen Kanal befindlicher Selektivitätsfilter verhindert die Diffusion großer Komplexe durch die Kernpore (Peters, 2005). Die FG-Oberfläche übernimmt entsprechend ihrer Lage unterschiedliche Funktionen (B). An den Filamenten im Cytoplasma oder Nucleoplasma ist sie für das Einfangen und die Bindung von Transportkomplexen verantwortlich,

während sie im Inneren des NPC die Diffusion von bindenden Komplexen erleichtert und somit durch ein Netzwerk einen selektiven Filter bildet, der für Komplexe jenseits der 10nm Grenze ohne Transportrezeptoren nicht passierbar ist (C). Transportkomplexe, die einen Transportfaktor beinhalten, können durch Interaktion mit den Nucleoporinen des Kanals diesen passieren, wie es im Modell der selektiven Phase beschrieben wurde (D).

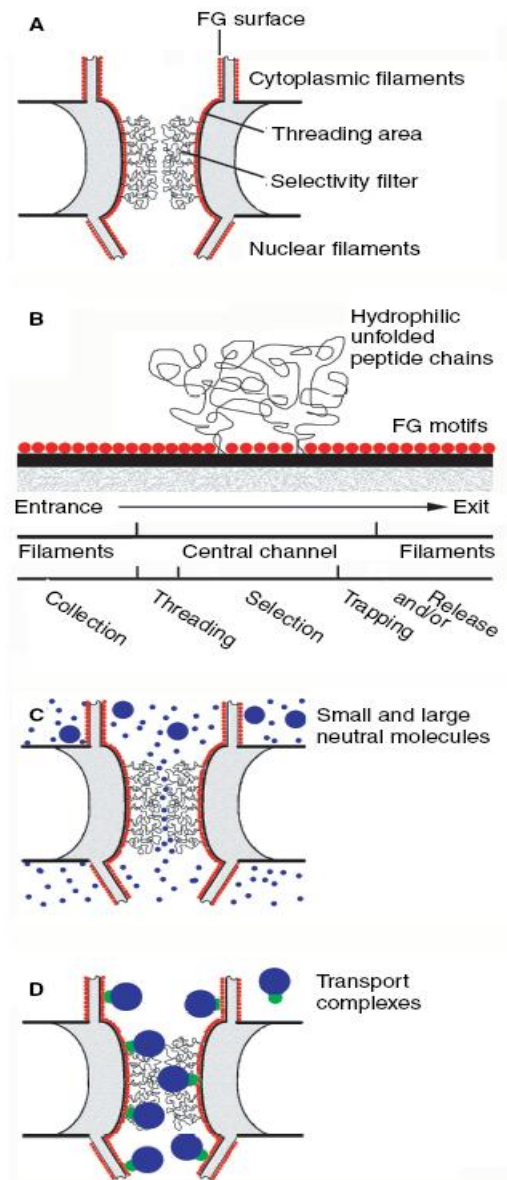


Abbildung 15: Das Dimensionsreduzierungs-Modell des Translokationsmechanismus (Peters, 2005)

Inzwischen konnten die Eigenschaften der FG-Repeats weiter charakterisiert werden. So gelang in einem *in vitro* Versuch der Nachweis, dass diese FG-Repeats ein dreidimensionales Netzwerk mit den physikalischen Eigenschaften von Hydrogelen ausbilden können. Die Abbildung 16

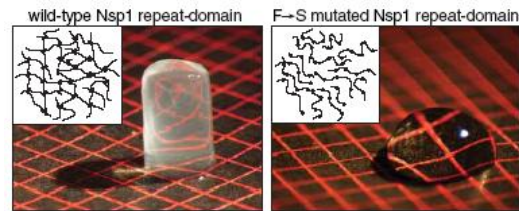


Abbildung 16: Bildung eines Hydrogels durch die FG-Repeats des Nucleoporins Nsp1: links die Wildtypform, rechts die Mutante (Frey *et al.*, 2006)

zeigt wie die Wildtypform des Nucleoporins Nsp1 unter ausgewählten Bedingungen ein solches Hydrogel ausbildet. Unter den selben Bedingungen entsteht bei kompletter Mutation der Phenylalanine zu Serine kein solches Netzwerk (Frey *et al.*, 2006).

1.5.3.5 Import ribosomaler Proteine

Ribosomale Proteine weisen in der Regel eine hohe Anzahl basischer Aminosäuren auf und sind in der Regel klein genug (< 60kDa), um den NPC durch passive Diffusion zu überwinden. Wie bereits beschrieben, besitzen auch ribosomale Proteine Kernimportsignale, die einen aktiven Transport durch den NPC ermöglichen. Dies bewahrt die ribosomalen Proteine nach ihrer Translation im Cytoplasma vor unspezifischen Interaktionen mit cytoplasmatischen Komponenten (Jäkel *et al.*, 1998).

In Hefe wurden bisher zwei Importin β -ähnliche Transportrezeptoren (Yrb4p und Pse1p), die am Import des ribosomalen Proteins L25 beteiligt sind, entdeckt (Rout *et al.*, 1997; Schlenstedt *et al.*, 1997).

Importin β , Transportin, RanBP5 (Pse1p-Homologon) und RanBP7 (Importin 7) sind am Kernimport der ribosomalen Proteine S7, L5 und L23a in Säugetier-Zellen beteiligt. Dabei zeigte sich, dass die drei untersuchten Proteine alternativ von jedem der vier Importrezeptoren in den Zellkern transportiert wurden (Jäkel *et al.*, 1998).

Im L23a konnte eine 32 Aminosäure lange Domäne identifiziert werden, die eine direkte Bindung mit Importin β , Transportin, RanBP5 oder RanBP7 eingeht. Bei dieser Domäne handelt es sich vermutlich um einen Importsignal-Archetyp, der sich entwickelt hat, bevor die einzelnen Rezeptoren evolutionär divergierten.

Diese BIB-Domäne (beta-like import receptor binding domain) stellt die Erkennungssequenz der Importrezeptoren dar.

Eine allgemeine Eigenschaft dieser BIB-Domäne und anderer charakterisierter Importsignale ribosomaler Proteine stellt die basische Natur und die hohe Komplexität verglichen mit den NLSs dar. Daher kann davon ausgegangen werden, dass ribosomale Proteine über einen nicht-klassischen Importmechanismus in den Zellkern gelangen.

Protein	BIB-Domäne
L23a	32 VHSH KKKK IRTSP TFRRPK TL RLRR QPKY PRKS AP RRNK LDHY 74

Tabelle 10: BIB-Domäne des ribosomalen Proteins L23a. Basische Aminosäuren sind fett hervorgehoben.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es sich bei RanBP5 und RanBP7 tatsächlich um Importine handelt, Transportin nicht nur Substrat-spezifisch auf den Transport von hnRNPs beschränkt ist und dass Importin β ohne Importin α als Adapter-Molekül dazu in der Lage ist, Import-Substrate in den Zellkern zu transportieren.

1.5.4 Export ribosomaler Untereinheiten

Die ribosomalen 40S- und 60S-Untereinheiten werden getrennt aus dem Kern in das Cytoplasma exportiert (Warner, 1990).

Detaillierte Untersuchungen zu den Mechanismen und den beteiligten Faktoren in der Hefe wurden durch Fluoreszenzmarkierungen ribosomaler Proteine, die in den Untereinheiten integrieren, ermöglicht. Die große 60S-Untereinheit wurde mit yrpL25-GFP und yrpL11-GFP markiert (Hurt *et al.*, 1999; Gadal *et al.*, 2001; Stage-Zimmermann *et al.*, 2000), die kleine 40S-Untereinheit mit yrpS2-GFP (Grandi *et al.*, 2002; Milkereit *et al.*, 2003a). Ihre Expression in mutanten Hefe-Stämmen führte zum Schluss, dass sowohl Nucleoporine, Karyopherine und Faktoren des Ran GTP-GDP-Zyklus am Export beider Untereinheiten beteiligt sind.

Der Export der Untereinheiten ist eng an ihren Reifungsprozess gebunden. Dabei wurden die Noc-Proteine charakterisiert, die als Bindeglied dieser beiden Mechanismen fungieren. So müssen erst einige Kontrollpunkte im Nucleoplasma durchlaufen werden, bevor es zum tatsächlichen Export kommt. Bei der 60S-

Untereinheit muss beispielsweise erst Noc1 durch Noc3 im gebundenen Noc1-Noc2-Dimer substituiert werden, dann kann die Untereinheit transloziert werden. Ob der Noc2-Noc3-Komplex ein aktives Kernsignal liefert oder die Retention der 60S-Untereinheit im Nucleoplasma fördert, ist bis dato ungeklärt (Milkereit *et al.*, 2003b).

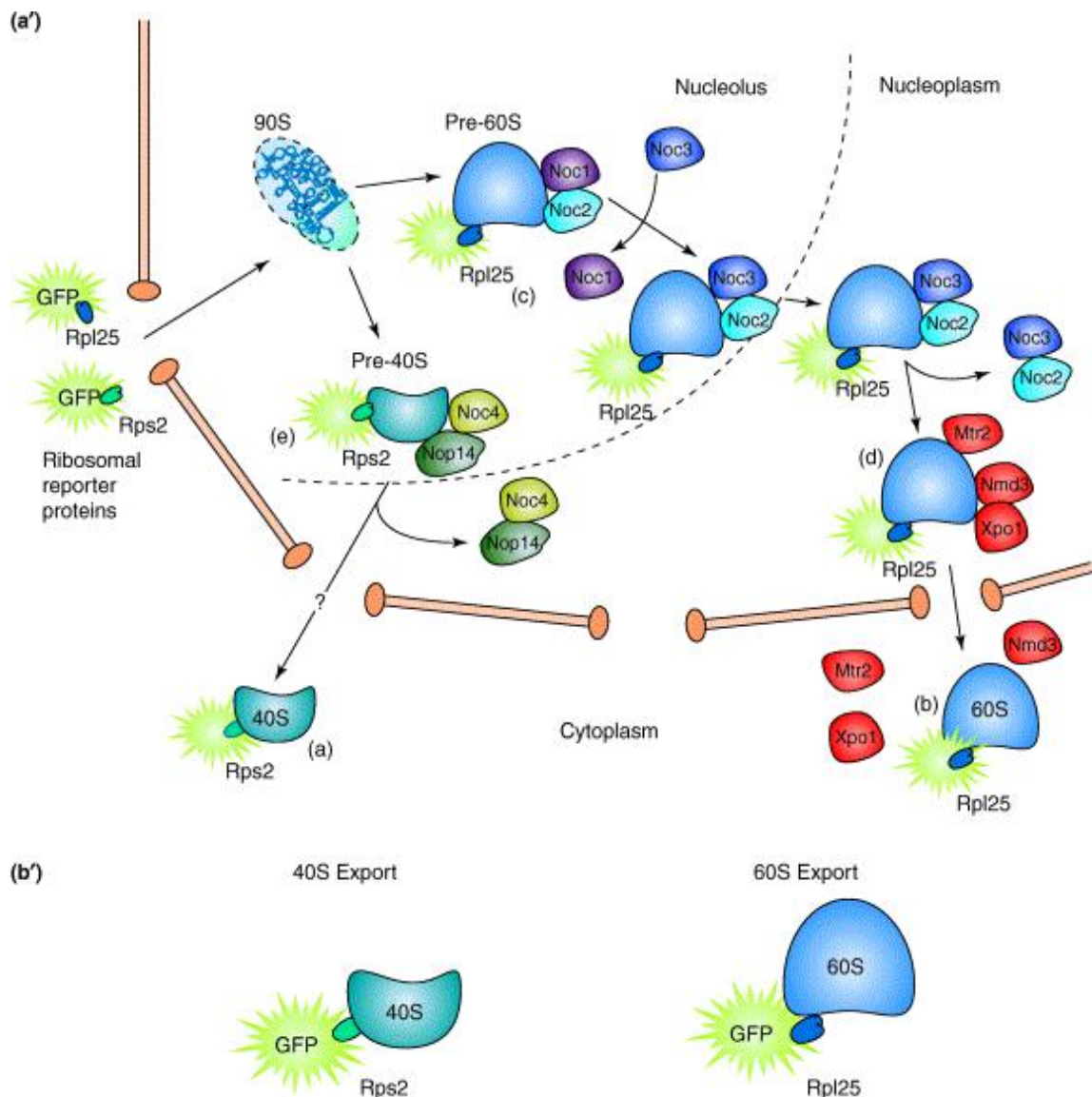


Abbildung 17: Übersicht des Exports ribosomaler Untereinheiten in Hefe (Tschochner *et al.*, 2003)

Die Translokation der 60S-Untereinheit durch den Kernporenkomplex wird durch Bindung der Transportfaktoren Nmd3 und Mtr2 ermöglicht (Johnson *et al.*, 2002; Nissan *et al.*, 2002; Gadal *et al.*, 2001;). Dabei bindet Nmd3 an das ribosomale Protein L10 und ermöglicht so die Bindung des Exportins XpoI / CrmI (Ho *et al.*, 2000). Man vermutet, dass die Bindungsstelle am L10 in unreifen Pre-60S-

Partikeln verdeckt ist und im Laufe des Reifeprozesses freigelegt wird. Im Cytoplasma werden dann letzte Schritte zur Bildung der reifen 60S-Untereinheit abgeschlossen.

Über die beteiligten Faktoren am Export der kleinen 40S-Untereinheit ist noch wenig bekannt. Neueste Untersuchungen konnten eine Beteiligung des Exportins CrmI nachweisen (Rouquette *et al.*, 2005). Weiterhin erscheint das ribosomale Protein S15 als einziges für den Export der reifenden Partikel essentiell (Leger-Silvestre *et al.*, 2004).

1.5.5 Nucleolare Bindungssequenzen

1.5.5.1 Der Nucleolus

Eine der Hauptfunktionen des Nucleolus besteht in der Biogenese von Ribosomen. Dieser Prozeß beinhaltet die Transkription von rDNA, die Prozessierung der prä-rRNA-Transkripte und den Zusammenbau von rRNA und ribosomalen Proteinen zu den entsprechenden ribosomalen Untereinheiten.

Nucleoli entstehen bei der Synthese von Präribosomen an der chromosomalen „Nucleolus Organisierenden Region“ (NOR) und stellen den nicht durch eine Membran kompartimentierten Bereich mit der höchsten Dichte innerhalb der gesamten Zelle dar.

Auf der folgenden elektronenmikroskopischen Aufnahme lassen sich drei teilweise voneinander abgegrenzte Regionen erkennen: die granuläre Komponente (GC), die dichte fibrilläre Komponente (DF) und das fibrilläre Zentrum (FC).

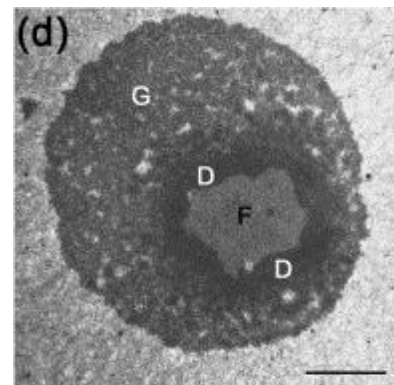


Abbildung 18: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Nucleolus von *Xenopus Oocyten* (Raska *et al.*, 2006)

Die GC nimmt etwa drei Viertel des Nucleolus ein. Die DF mit ungefähr 17 % und die FC mit lediglich 2 % tragen hingegen nur unwesentlich zum nucleolaren Gesamtvolumen bei (Shaw *et al.*, 1995).

Die DF ist die Schlüsselstruktur der Nucleoli: dort finden rDNA-Transkription und rRNA-Prozessierung statt. Die Größe der DF steht dabei in direktem

Zusammenhang zur transkriptionellen Aktivität (Schwarzacher *et al.*, 2000)

Das FC enthält neben den rRNA-Genen die für die Transkription dieser Gene essentiellen Proteine, RNA-Polymerase I, DNA-Topoisomerase I und den Transkriptionsfaktor UBF (upstream binding factor) (Scheer *et al.*, 1990). Dies unterstreicht die mögliche Funktion von FC als Reservoir für die inaktive Transkriptionsmaschinerie (Shaw *et al.*, 1995).

Die nucleolaren Proteine Fibrillarin, Nucleolin und B23 stellen die Hauptbestandteile der DF und GC dar. In der DF erfolgt die Prozessierung der 45S prä-rRNA, die Reifung der prä-Ribosomen findet hingegen in der GC statt.

1.5.5.2 Nucleolare Bindungssequenzen

Nucleolare Proteine besitzen in der Regel eine Signalsequenz, die es ihnen ermöglicht, nach dem Import in den Zellkern in den Nucleoli zu akkumulieren. Es existiert bislang keine einheitliche Bezeichnung für derartige Sequenzen, sie werden folgend als Nucleolare Bindungssequenzen (NuBiS) bezeichnet, sie werden in der Literatur aber auch als NoLS oder NuLS (nucleolus localisation signal), NTS (nucleolar targeting signal) und NRS (nucleolar retention signal) bezeichnet. Die ersten NuBiS wurden für die retroviralen Proteine Tat und Rev des HIV-1 (human immunodeficiency virus) und Rex aus HTLV-1 (human T-cell leukemia virus) beschrieben (Siomi *et al.*, 1990; Kubota *et al.*, 1989).

Protein	NuBiS
HIV-Tat	48 GRKKRRQRRRAHQ 61
HIV-Rev	35 RQARRNRRRRWRERQR 50
HTLV-Rex	2 PKTRRRPRRSQRKR PPTP 19

Tabelle 11: NuBiS der retroviralen Proteine HIV-Tat, HIV-Rev und HTLV-Rex. Basische Aminosäuren sind fett, die Aminosäure Glutamin ist kursiv hervorgehoben

Diese viralen NuBiS-Sequenzen setzen sich aus 13-18 vorwiegend basischen Aminosäuren zusammen und enthalten ein bis zwei Glutaminreste.

Bei den viralen Proteinen HIV-Rev (Fankhauser *et al.*, 1991) und HTLV-Rex

(Adachi *et al.*, 1993) konnte gezeigt werden, dass die nucleolare Akkumulation durch das nucleolare Shuttle-Protein B23 vermittelt wird.

Kurze Zeit später konnte die Nucleolare Bindungssequenz des nucleolaren Proteins p120 identifiziert werden. Diese 18 Aminosäure lange NuBiS setzt sich ebenso wie die viralen NuBiS-Sequenzen vorwiegend aus basischen Aminosäuren zusammen. Darüber hinaus fungiert diese Arginin-reiche Domäne als rRNA-Bindungsmotiv (Valdez *et al.*, 1994; Gustafson *et al.*, 1998). Dies verstärkt die Vermutung, dass es sich bei Nucleolaren Bindungssequenzen um RNA-Bindungsmotive handelt. Die folgende Tabelle fasst weitere bekannte Nucleolare Bindungssequenz zusammen.

Protein	NuBiS
p120 ^a	SKRLSS RARKRAAKRR LG
STT3-B ^b	IFP KQK YLS KKTTKR KRGYI KNKLVFKKGKKISK
PLRV-CP ^c	PRRRRRQSLRRR ANR
nop25 ^d	KRKHP RR AQDSTKKPP SAT RTSKTQRRRR
IBV-N ^e	WRRQARFK
Angiogenin ^f	RRRGL
Rpp38 ^g	KIKKLI PNPNKI RKPPKSKK ATPK

Tabelle 12: Identifizierte Nucleolare Bindungssequenzen unterschiedlicher Proteine (Basische Aminosäuren sind fett hervorgehoben.; ^aGustafson *et al.*, 1998, ^b Caron *et al.*, 2006, ^c Haupt *et al.*, 2005, ^d Fujiwara *et al.*, 2006, ^e Reed *et al.*, 2006, ^f Moroianu *et al.*, 1994, ^g Jarrous *et al.*, 1999)

Ribosomale Proteine besitzen ebenfalls Nucleolare Bindungssequenzen, die es Ihnen ermöglichen, am Nucleolus zu akkumulieren, um dort in die naszierenden ribosomalen Untereinheiten integriert zu werden.

Es gilt als sicher, dass die Akkumulation der ribosomalen Proteine im Nucleolus durch Bindung an die ribosomale RNA ermöglicht wird. Die Nucleolaren Bindungssequenzen ribosomaler Proteine können daher als RNA-Bindungsmotive angesehen werden.

Mittlerweile konnten mehrere solcher Sequenzen identifiziert werden, die folgende Tabelle gibt einen Überblick.

Protein	NuBiS
S6 (Mensch) ^a	KKPR TKAP KIQRLVTPRV LQH KRRRIALKKQRTKKNKEE AAEYA
S6A I (Hefe) ^b	KLLLTKNV SCY RPRRDGE RKRK SV RG AI VG PD LAVLALVIVKKG EQE LEGLTDTTVPKRLGP
S6A II (Hefe) ^b	KIQRLVTPQRLQRKR H QRAL K VR NA QAQRE AAA EYAQLLAKR
S7 ^c (Mensch)	RRILPKPT RKSRTK NK QKRPR
S25 (Hefe) ^d	A KAAAALAGGKKS KKKWSK SM KDRA
L31 (Ratte) ^e	RLSRKR
L7a Mensch ^f	RFV K WP RY I RL QRQ RA ILYKRLK V PP AIN QFTQALDRQTATQLL KLAH

Tabelle 13: Identifizierte Nucleolare Bindungssequenzen ribosomaler Proteine (Basische Aminosäuren sind fett hervorgehoben.; ^aSchmidt *et al.*, 1995, ^b Lipsius *et al.*, 2005, ^c Annilo *et al.*, 1998, ^d Timmers *et al.*, 1999, ^e Quaye *et al.*, 1996, ^f Russo *et al.*, 1997)

Die möglichen Eigenschaften Nucleolarer-Bindungssequenzen werden zu einem späteren Zeitpunkt diskutiert, da die Ergebnisse dieser Arbeit zu ihrem besseren Verständnis beitragen werden.

2 Aufgabenstellung

Die Biogenese eukaryontischer Ribosomen stellt einen überaus komplexen Vorgang dar, der die koordinierte Synthese, Assoziation und den Transport der vier strukturgebenden rRNAs und etwa 80 ribosomaler Proteine verlangt. Man schätzt die Anzahl an beteiligter Proteine auf über 700.

Die Transkription der rRNA-Gene, die Prozessierung der rRNA-Primärtranskripte zu den reifen 18S-, 5.8S- und 28S-rRNAs im Nucleolus sind in mehreren Organismen aufgeklärt worden.

Faktoren, die für die nucleoplasmatische Transkription der 5S-rRNA und der mRNAs und deren cytoplasmatischen Transport verantwortlich sind, konnten im menschlichen Modell ebenfalls teilweise identifiziert werden.

Der Importmechanismus ribosomaler Proteine aus dem Cytoplasma in den Zellkern wird durch spezifische Kernlokalisationssequenzen ermöglicht, die in vielen ribosomalen Proteinen bereits identifiziert wurden. Entsprechend identifiziert wurden auch die verwendeten Transportrezeptoren und für den Translokationsprozess durch die Kernpore sind mehrere Modelle ausgearbeitet worden.

Die nucleolare Akkumulation, das heißt die Bindung der ribosomalen Proteine an der ribosomalen RNA im Nucleolus, dem Syntheseort der Ribosomenbiogenese, ist hingegen ein noch vage beschriebenes Feld.

Es sind mehre Nucleolare Bindungssequenzen (NuBiS) identifiziert worden, über ihre Wirkungsweise ist allerdings noch wenig bekannt.

In dieser Arbeit sollen die für die Bindung in den Nucleoli benötigten Minimalsequenzen innerhalb der ribosomalen Proteine der S6-Familie identifiziert werden. Die Eigenschaften der ermittelten Nucleolaren Bindungssequenzen sollen dann im Hinblick auf evolutionäre Konservierung sowie physikochemische und strukturebiologische Besonderheiten analysiert werden und mit bereits vorhandenen Daten verglichen werden.

Dabei soll auch der mechanistische Zusammenhang zwischen nucleolarer Akkumulation und Kernimport der ribosomalen Proteine am Beispiel des

humanen ribosomalen Proteins hrpS6 untersucht werden.

Die Untersuchungen zur evolutionären Konservierung der Nucleolaren Bindungssequenzen und Struktureigenschaften des humanen hrpS6 und seinem homologen yrpS6A aus der Hefe sollten in anschliessenden Projekten in einer Reihe von Substitutionsexperimenten verifiziert werden. Die Expression des yrpS6A der Hefe in menschlichen Zellen sollte an dieser Stelle überprüft werden und in ersten Vorversuchen yrpS6A immunocytoologisch lokalisiert sowie sein möglicher Einbau in die humanen Ribosomen überprüft werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Difco-Laboratories (Hamburg), Fluka (Neu-Ulm), Merck AG (Darmstadt), Pharmacia AG (Freiburg) und Sigma (Deisenhofen) in p.a. oder mikro- bzw. molekularbiologischer Qualität bezogen.

3.1.2 Enzyme

Restriktionsendonucleasen, DNA-Polymerasen, DNA-modifizierende Enzyme sowie die entsprechenden Puffer wurden von den Firmen MBI Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs - NEB (Schwalbach), Oncor/Appligene (Heidelberg) und Promega GmbH (Mannheim) bezogen.

3.1.3 Oligonucleotide

Als Bezugsquelle für Oligonucleotide diente die Firma MWG Biotech AG (Ebersberg).

3.1.4 Antikörper

Folgende Antikörper wurden aus dem Serum immunisierter Kaninchen gewonnen:

- Anti-hrpS6 (2414) gegen das C-terminale Peptid: STSKSESSQK
- Anti-hrpS6 (672/7) gegen das N-terminale Peptid: MKLNISFPATGC
- Anti-yrpS6A (2415) gegen das Peptid: EVTKGEKTYT

Weitere Antikörper wurden von den Firmen Roche, Sigma und Abcam bezogen.

3.1.5 Biologisches Material

- Escherichia coli DH5 α

Der *E.coli*-Stamm DH5 α hat folgenden Genotyp: deoR, endA1, gyrA96, hsdR17(rk- mk+), recA1, relA1, supE44, thi-1, Delta(lacZYA-argFV169), phi-80deltalacZDeltaM15, F-, Lambda-.

Der phi-80deltalacZDeltaM15-Marker ermöglicht ein „blue-white screening“ durch Alpha-Kompletierung der Beta-Galactosidase. RecA1 dient der Stabilität der eintransformierten DNA und endA1 erhöht die Qualität der Plasmid-DNA.

- Escherichia coli XL1-Blue

Der *E.coli*-Stamm XL1-Blue hat folgenden Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [FproAB lacIqZFM15 Tn10 (Tetr)] und weist aufgrund der Gene recA1, endA1 ähnliche Eigenschaften wie DH5 α auf.

- COS-1-Zellen

Bei COS 1-Zellen (American Tissue Culture Collection, ATCC) handelt es sich um eine von der Affenzelllinie CV1 abgeleitete Zelllinie, die durch Transfektion mit einer Mutante des Affenvirus SV40, die für das wildtyp T-Antigen codiert, entstanden ist. Die Zellen enthalten eine einzige Kopie der kompletten *early Region* des SV40-Genoms.

- HeLa-Zellen

Bei den HeLa-Zellen (ATCC) handelt es sich um eine klonierte, menschliche Cervix-Adeno-Karzinom- Zelllinie und weisen eine schwache p53- und eine normale pRB-Expression auf.

- Hek-293-Zellen

Bei den HeLa-Zellen (ATCC) handelt es sich um eine klonierte, menschliche Cervix-Adeno-Karzinom- Zelllinie und weisen eine schwache p53- und eine normale pRB-Expression auf.

- Vektoren

In dieser Arbeit wurden der *Living Colors* pEGFP-C1 Vektor (BD Clontech), pASH (Walter *et al.*, 2000) und pcDNA5FRT/TO (Invitrogen) verwendet

3.1.6 Geräte

Agarose-Gelelektrophorese-Apparatur	GNA-100 (Pharmacia) Phero-stab. 200 Powersupply (Biotec Fischer)
Brutschrank	HeraCell Typ B5060 (Heraeus)
Geldokumentationssystem	Olympus C-5050Zoom
Heizblock	Thermomixer comfort (Eppendorf)
Mikroskope	Diavert (Leitz) Axiovert 135 (Zeiss)
PCR-Thermocycler	Personal Cycler (Biometra)
Photometer	BioPhotometer (Eppendorf)
Sterilwerkbänke	Bioguard Hood (Baker Company) Hera Safe (Heraeus)
UV-Transilluminator	Biometra FLX-20M
Zentrifugen	J-21C Zentrifuge (Beckmann) (JA14 und JA20-Rotoren) Minifuge GL (Heraeus) L5 65 Ultrazentrifuge (Beckmann)

3.1.7 Reagenzien

Lösungen für den routinemäßigen Gebrauch in der Molekularbiologie wurden nach dem von Sambrook *et al.* (1989) herausgegebenen Standardwerk *Molecular Cloning* oder dem Laborführer „*Lab-FAQS- Pocket Guide*“ der Firma Roche angesetzt. Dabei wurden sämtliche Lösungen mit entionisiertem bidestilliertem Wasser bzw. Wasser aus der Aufbereitungsanlage Elex5 (Millipore) angesetzt. Sterile Lösungen wurden durch Autoklavieren oder bei Hitzeempfindlichkeit durch Sterilfiltrieren (Satorius Membranfilter, Porengröße 0.2 µm) hergestellt.

Acrylamid (30%) + 0,8% Bis-Acrylamid

300 g Acrylamid
8 g N', N-Methylen-bisacrylamid
ad 1000 ml H₂O

Agarose-Gellösung

1.0-1.8 % (w/v) Agarose (Seakem) wurden durch kurzes Aufkochen in 0.5x TAE-Puffer gelöst und bei einer Temperatur von etwa 50°C mit 0.17 µg Ethidiumbromid pro ml Agarose-Gellösung versetzt

Ampicillin-Stammlösung

50 mg/ml Ampicillin
Sterilfiltrieren

BSA-Stammlösung

10 mg/ml BSA

6x DNA-Probenpuffer

0.25 % (w/v) Bromphenolblau
0.25 % (w/v) Xylencyanol FF
30 % (v/v) Glycerol

Dulbecco modified minimal Essential Medium (DMEM)

Das DMEM-Trockenpulver (Seromed) wurde laut Angaben des Herstellers mit Wasser versetzt, mit 25%iger Hcl auf pH 7.2 eingestellt und sterilfiltriert.

dNTP-Mix

je 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP

Ethidiumbromid

10 mg/ml (Serva)

Formaldehyd-Fixierlösung

1ml 37% Formaldehydlösung wurde in 9ml PBS verdünnt

Kanamycin-Stammlösung

30 mg/ml Kanamycin
Sterilfiltrieren

LB-Medium

1 % (w/v) Bacto-Trypton
0.5 % (w/v) Hefeextrakt
1 % (w/v) NaCl
pH 7.0 mit NaOH einstellen
autoklavieren

LB-Agar

LB-Medium
1.5 % (w/v) Agar
autoklavieren

Minipreparations-Puffer

P1-Puffer: 0.05 M Tris-HCl, 0.01 M EDTA (pH 7.5), 0.05 mg/ml RNase
P2-Puffer: 0.2 M NaOH, 1% SDS
P3-Puffer: 4.0 M Guanidin HCl, 0.75 M KOAc, pH 4.6
W1-Puffer: 4.0 M Guanidin HCl, 0.75 M KOAc, pH 4.6
W2-Puffer: 0.05 M Tris-HCl, 0.01 M EDTA (pH 7.5), 200 mM NaCl, Ethanol

Midipräparations-Puffer

E1-Lösung: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (enthält 100 µg/ml RNase A)
E2-Lösung: 200 mM NaOH, 1.0 % SDS
E3-Lösung: 3.1 M KAc (pH 5.5)
E4-Lösung: 600 mM NaCl, 100 mM NaAc (pH 5.0), 0.15 % Triton-X100
E5-Lösung: 800 mM NaCl, 100 mM NaAc (pH 5.0)
E6-Lösung: 1250 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8.5)

PB-Puffer

25mM Tris-HCl pH 7,65
25mM NaCl
5mM MgCl₂

PBS (phosphate buffered saline)

137 mM NaCl
2.7 mM KCl
8.1 mM Na₂HPO₄
1.4 mM KH₂PO₄
pH 7.4 mit HCl einstellen
autoklavieren

1x PCR-Reaktionspuffer

50 mM KCl
10 mM Tris-HCl pH 8.8
1.5 mM MgCl₂
0.08% NP40
0.02 % (w/v) BSA

Poly-Lysin-Lösung

0.03 % (w/v) Poly-Lysin
Sterilfiltrieren

NEB-Restriktionspuffer 2

50 mM NaCl
10 mM Tris-HCl
10 mM mgCl₂
1 mM DTT
pH 7.9 bei 25°C, pH 7.5 bei 37°C

RSB-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 7,5
10 mM KCl
1,5 mM MgAc₂

STKM

2 M Saccharose
50 mM Tris/HCl, pH 7,4
25 mM KCl
10 mM MgAc

TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)

40 mM Tris-Acetat
10 mM EDTA
pH 8.5

TBST

50mM Tris/HCl pH 7.4
150mM NaCl
pH 7.5
0.1% Tween 20

TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer)

10 mM Tris-HCl
10 mM EDTA
pH 8.0

Trypsin-EDTA-Lösung

0.05 % (w/v) Trypsin
5 mM Na₂EDTA
in PBS (pH 7.4)
sterilfiltrieren

T4-DNA-Ligase-Puffer

50 mM Tris-HCl
10 mM MgCl₂
10 mM DTT
1 mM ATP
0.025 % (w/v) BSA
pH 7.5

Western-Blot-Transfer-Puffer

Puffer I
3,63 % (w/v) Tris (ICN)
20 % (v/v) Methanol
Puffer II
0,3 % (w/v) Tris
20 % (v/v) Methanol
Puffer III
0,525 % (w/v) 6-Amino-Capronsäure

0,3 % (w/v) Tris
20 % (v/v) Methanol
Der pH-Wert der drei Puffer darf nicht eingestellt werden.

3.2 Molekularbiologie

Gentechnologische Arbeiten der Sicherheitsstufe 1 wurden unter Beachtung der entsprechenden Sicherheitsvorschriften (Gentechnikgesetz) durchgeführt. Der Umgang mit gentechnisch veränderten Organismen (GVO) erfolgte ausschließlich in den dafür ausgewiesenen Räumlichkeiten.

DNA wurde in autoklaviertem, entionisiertem Wasser aufgenommen, um die Aktivität von DNA-modifizierenden Enzymen in Folgereaktionen zu gewährleisten. Um DNA-Proben länger lagern zu können, wurden die Proben mit 10x TE-Puffer (EDTA komplexiert zweiwertige Ionen und verhindert so Nuclease-Aktivität) auf eine Endkonzentration von 1xTE versetzt und bei -20°C bzw. -80°C gelagert.

3.2.1 DNA-Quantifizierung

DNA unbekannter Konzentration wurde photometrisch oder gelelektrophoretisch quantifiziert.

3.2.2 Quantifizierung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die Konzentration der zu bestimmenden DNA-Probe wurde anhand einer Agarose-Gelelektrophorese mit DNA-Fragmenten (DNA-Molekulargewichtsmarker) bekannter Konzentration ermittelt.

3.2.2.1 Quantifizierung von DNA mittels UV-Photometrie

Die zu bestimmende DNA-Probe wurde mit bidestilliertem Wasser verdünnt und die Extinktion bei 260 nm photometrisch gegen bidestilliertes Wasser (Blindprobe) ermittelt. Dabei entspricht die DNA-Konzentration bei einer Extinktion von 1.0:

doppelsträngige DNA: 50 $\mu\text{g/ml}$

einzelsträngige DNA: 33 $\mu\text{g/ml}$

3.2.3 PCR – Polymerase-Ketten-Reaktion

- 10x PCR-Puffer (MBI)
- 10 mM dNTP-Mix (MBI)
- Taq-DNA-Polymerase, 5U/μl (MBI)

Die PCR-Reaktionen erfolgten in einem Gesamtvolumen von 25 μl. Zu 10 ng Template-DNA wurde folgender Standard-PCR-Mix gegeben:

Standard-PCR-Mix:

5'-Primer (sense)	15 pmol
3'-Primer (antisense)	15 pmol
dNTP-Mix	0.2 mM
10 x PCR-Reaktionspuffer	2.5 μl
Taq-DNA-Polymerase	2.5 U

Die PCR-Reaktionen wurden in einem PCR-Thermocycler mit folgenden PCR-Programmen durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit	Anmerkung
1	96°C	5 min	
2	93°C	1 min	
3	48°C	1 min	
4	72°C	3 min	→ Schritt 2 / 5 Zyklen
5	93°C	1 min	
6	48°C	1 min	
7	72°C	3 min	→ Schritt 5 / 7 Zyklen (dT = + 2°C)
8	93°C	1 min	
9	68°C	1 min	
10	72°C	3 min	→ Schritt 8 / 23 Zyklen
11	72°C	10 min	
12	4°C	□	

Tabelle 14: PCR-Program MABSKS6

Schritt	Temperatur	Zeit	Anmerkung
1	96°C	5 min	
2	93°C	1 min	
3	46°C	1 min	
4	72°C	3 min	→ Schritt 2 / 5 Zyklen
5	93°C	1 min	
6	46°C	1 min	
7	72°C	3 min	→ Schritt 5 / 7 Zyklen (dT = + 1°C)
8	93°C	1 min	
9	52°C	1 min	
10	72°C	3 min	→ Schritt 8 / 23 Zyklen
11	72°C	10 min	
12	4°C	□	

Tabelle 15: PCR-Program MA46-52

3.2.4 Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN).

Der 25 µl PCR-Reaktionsansatz wurde mit 125 µl PB-Puffer versetzt und auf eine in einem 2 ml Mikrozentrifugengefäß platzierte *QIAquick spin Säule* gegeben. Nach einminütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde der Durchlauf entfernt und die Membran mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Zur vollständigen Entfernung von PE-Pufferresten (PE-Puffer enthält Ethanol) wurde nochmals 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach Überführung der *QIAquick spin Säule* in ein neues 1.5 ml Eppendorfgefäß wurde das PCR-Produkt mit 30 µl auf 50°C vorgewärmtem Wasser eluiert. Die PCR-Produkte wurden bei -20°C gelagert.

3.2.5 Restriktion von DNA

- *Bam*HI (NEB) 10x BamHI-Puffer (NEB)
- *Hind*III (NEB) 10x Puffer 2 (NEB)
- *Afl*II (NEB) 10x Puffer 2 (NEB) + BSA

Die zu restringierende DNA wurde mit 2U des entsprechenden Restriktionsenzym pro µg DNA über Nacht bei 37°C inkubiert. In der Regel wurden Doppelverdau angesetzt, wenn BamHI verwendet wurde, wurde sequenziell verdaut.

Um unspezifische DNA-Hydrolysen zu vermeiden, betrug das Volumen der eingesetzten Restriktionsendonucleasen maximal 1/10 des Gesamtvolumens.

3.2.6 DNA-Ligation

- Zielvektor, restringiert
- PCR-Produkt, restringiert
- 10x T4-DNA-Ligase-Puffer (NEB)
- T4-DNA-Ligase, 2.000.000 U/ml (NEB)

In einem 15 µl Ligationsansatz wurden 200 ng (*EcoRI/HindIII*)-restringierter Vektor sowie (*EcoRI/HindIII*)-restringiertes PCR-Produkt in einem molaren Verhältnis von 1:10 eingesetzt. Dazu wurden Vektor- und Insert-DNA zusammengegeben und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. Die DNA-Fragmente wurden 5 min bei 45°C inkubiert und anschließend in Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 10x T4-DNA-Ligase-Puffer und 2.000 U T4-DNA-Ligase wurde der Ligationsansatz auf ein Gesamtvolumen von 15 µl aufgefüllt. Die Ligation erfolgte bei 16°C über Nacht.

3.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

- 1 x TAE-Puffer
- Agarose-Gellösung
- Ethidiumbromid-Lösung
- 6 x DNA-Probenpuffer
- Molekulargewichtsmarker:
- Marker III: Lambda-DNA geschnitten mit *EcoRI* und *HindIII*,
- 100 ng/µl (Appligene)
- 100 bp-DNA-Leiter 500 ng/µl (NEB)

Die Charakterisierung und Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte in einer horizontalen Elektrophoreseapparatur mit 5x50x75mm bzw. 5x100x75 mm 1-1.8%-igen (w/v) Agarose-Gelen bei Spannungen zwischen 70 und 100V in 1x

TAE-Puffer.

Die zu untersuchende DNA-Probe wurde mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt und das ethidiumbromidhaltige Agarose-Gel mit dieser Probe beladen.

Die Detektion der DNA-Banden erfolgte mit Hilfe eines UV-Transilluminators.

Die Größe und Menge der einzelnen DNA-Banden konnte durch den Vergleich mit verschiedenen DNA-Molekulargewichts-markern (500 ng) abgeschätzt werden. Die Dokumentation der Agarose-Gele erfolgte mittels eines Geldokumentationssystems.

3.2.8 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Zur Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen wurde nach dem Protokoll des *QIAquick Gel Extraction Kits* (QIAGEN) verfahren.

- QX1-Puffer
- PE-Puffer
- QIAquick Säule
- 2-Propanol

Die zu isolierende DNA-Bande wurde mit Hilfe eines UV-Transilluminators im Agarose-Gel lokalisiert und mit einem Skalpell herausgeschnitten.

Zur Bestimmung des Gewichts wurde das extrahierte Gelstück in ein 2 ml Eppendorfgefäß bekannten Leergewichts überführt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass das Gewicht in mg etwa dem Volumen in µl entspricht.

Anschließend wurde das Gelstück mit dem dreifachen Volumen QX1-Puffer versetzt und 10 min bei 50°C und 500 rpm inkubiert. Nachdem sich das Gelstück vollständig gelöst hatte, wurde bei DNA-Fragmenten, die kleiner als 500 bp und größer als 4 kb waren, die Lösung mit einem Volumen 2-Propanol versetzt. Bei DNA-Fragmenten, die nicht in diesem Bereich lagen wurde auf die Zugabe von 2-Propanol verzichtet.

Die Lösung wurde auf eine in einem 2 ml Mikrozentrifugengefäß plazierte *QIAquick Säule* gegeben, 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Durchlauf verworfen und die DNA mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Zur vollständigen

Entfernung des ethanol-haltigen PE-Puffers wurde erneut 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach der Überführung der *QIAquick Säule* in ein neues 1.5 ml Eppendorfgefäß wurde die DNA mit 30 µl Wasser durch einminütige Zentrifugation bei 13.000 rpm eluiert. Die DNA-Fragmente wurden bei -20°C gelagert.

3.2.9 Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen

- *E.coli*-Zellen (DH5α, XL1-Blue)
- LB-Medium
- CB 1-Puffer (Competency Buffer 1)
- CB 2-Puffer (Competency Buffer 2)

3 ml LB-Medium wurden mit dem *E.coli*-Stamm DH5α angeimpft und über Nacht bei 37°C und 250 rpm inkubiert. 100 ml LB-Medium wurden mit 1 ml dieser ÜNK angeimpft und bis zur logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0.25$ bis 0.50) bei 37°C und 250 rpm kultiviert. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle Arbeiten auf Eis mit vorgekühlten Materialien und Lösungen durchgeführt.

Nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase wurden die Zellen in sterile 50 ml Zentrifugationsgefäße (Falcon Tubes) überführt, 15 min auf Eis inkubiert und 15 min bei 2500 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Zellsediment vorsichtig in je 15 ml CB 1 resuspendiert, 1 h auf Eis inkubiert und 15 min bei 3000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nachdem der Überstand entfernt wurde, wurden die sedimentierten Zellen vorsichtig in 2 ml CB 2 resuspendiert und für weitere 15 min auf Eis inkubiert. Die kompetenten Zellen wurden aliquotiert, in 1.5 ml Eppendorfgefäße überführt und bei -70°C gelagert.

3.2.10 Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen

- kompetente *E.coli*-Zellen (DH5α, XL1-Blue)
- LB-Medium
- LB-Agarplatten (30 µg/ml Kanamycin oder 50µg/ml Ampicillin)

Die kompetenten *E.coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und vorsichtig

resuspendiert. Je 150 µl kompetente Zellen wurden mit 15 µl des entsprechenden Ligationsansatzes (entspricht 200 ng Plasmid-DNA) versetzt, vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformationsansätze wurden 90 s bei 42°C und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Je Transformationsansatz wurde 1 ml LB-Medium hinzugefügt und 1 h bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Die Zellen wurden für 1 min bei 10.000 rpm abzentrifugiert, in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf LB-Selektivagarplatten (30 µg/ml Kanamycin oder 50µg/ml Ampicillin) ausplattiert.

Die Agarplatten wurden für 16 bis 20 h bei 37°C inkubiert.

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz erfolgte die Transformation sowohl mit ungeschnittener als auch mit restringierter Plasmid-DNA. Als Negativkontrolle dienten kompetente Zellen ohne Plasmid-DNA.

3.2.11 Ansetzen von Übernachtskulturen

- LB-Medium
- Kanamycin-Stocklösung (30 mg/ml) oder Ampicillin-Stocklösung (50 mg/ml)

3 ml LB-Selektivmedium (30 µg/ml Kanamycin) wurden mit einer Kolonie des entsprechenden *E.coli*-Klones inokuliert und bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Die Übernachtskulturen wurden am folgenden Tag für Plasmidminipräparationen oder zum Animpfen großer Kulturansätze (ab 100 ml) verwendet.

3.2.12 Anlegen von Dauerkulturen

- LB-Medium
- Kanamycin-Stocklösung (30 mg/ml)
- 87 %ige Glycerol-Lösung

3 ml LB-Selektivmedium (30 µg/ml Kanamycin) wurden mit dem entsprechenden Bakterienklon angeimpft und über Nacht bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurden 500 µl der Bakterienkultur mit 400 µl 87%-iger Glycerol-Lösung versetzt und bei -70°C gelagert.

3.2.13 Isolierung von Plasmid-DNA

3.2.13.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Mini-Präparation von Plasmid-DNA wurde der *Silica Spin Kit* der Firma Biometra verwendet.

- P1-Puffer, P2-Puffer, P3-Puffer, W1-Puffer, W2-Puffer
- Silica Spin Säule
- Übernachtskulturen

2 ml LB-Selektivmedium (30 µg/ml Kanamycin) wurden mit der entsprechenden plasmidtragenden *E.coli*-Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 250 rpm inkubiert.

2 ml der ÜNK wurden in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt, 1 min bei 12.000 rpm zentrifugiert und das Zellsediment in 200 µl P1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl P2-Puffer wurde das Gefäß mehrfach invertiert und 5 min inkubiert. Nachdem die Suspension mit 200 µl P3-Puffer versetzt und das faserige Sediment durch mehrfaches Invertieren verteilt wurde, wurde 5 min bei 12.000 rpm zentrifugiert und der Überstand auf eine zuvor in ein 1.5 ml Eppendorfgefäß plazierte *Silica Spin Säule* gegeben. Nach einminütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde der Durchfluß verworfen und die Membran nacheinander mit je 500 µl W1- und W2-Puffer gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde für jeweils 1 min zentrifugiert und der Durchfluß verworfen. Zur vollständigen Entfernung des W2-Puffers (W2-Puffer enthält Ethanol) wurde erneut zentrifugiert und die *Silica Spin Säule* in ein neues 1.5 ml Eppendorfgefäß transferiert. Die Plasmid-DNA wurde mit 50 µl auf 50°C vorgewärmtem Wasser durch Zentrifugation von der Säule eluiert und bei -20°C gelagert.

3.2.13.2 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Midi-Präparation von Plasmid-DNA wurde der *Jet Star 2.0 Kit* der Firma Genomed verwendet.

- E1-Lösung, E2-Lösung, E3-Lösung, E4-Lösung, E5-Lösung, E6-Lösung
- Jet Star Säule

- Isopropanol
- 70%iger Ethanol
- Übernachtskultur

100 ml LB-Selektivmedium (30 µl/ml Kanamycin oder 50µg/ml Ampicillin) wurden mit der entsprechenden Vorkultur angeimpft (s.) und über Nacht bei 37°C und 200 rpm kultiviert. Die ÜNK wurde 10 min auf Eis gelagert. Danach wurde die Zellsuspension 10 min bei 5.000 rpm und 4°C zentrifugiert, das Zellsediment in 4 ml E1-Lösung resuspendiert und in 15 ml Corex-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 4 ml E2-Lösung wurde das Lysat durch vorsichtiges Invertieren bis zur Homogenität gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 4 ml E3-Lösung hinzugefügt, das Reaktionsgefäß mehrfach invertiert und 30 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine zuvor mit 10 ml E4-Lösung equilibrierte *Jet Star Säule* gegeben und zweimal mit je 10 ml E5-Lösung gewaschen. Nachdem die Plasmid-DNA mit 5 ml E6-Lösung eluiert wurde, wurde das Eluat mit 3.5 ml eiskaltem 2-Propanol versetzt, 30 min bei RT inkubiert und 30 min bei 12.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet mit 8 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen und erneut 30 min bei 12.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde 10 min an der Luft getrocknet, die Plasmid-DNA in 100-200µl Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert.

3.2.14 DNA-Sequenzierung

Zur DNA-Sequenzierung wurde der *BigDye Terminator Kit* der Firma ABI verwendet.

- BigDye-Reaktionslösung (ABI)
- HalfTERM-Puffer (Genpak, Brighton, UK)

Taq BigDye Terminator cycle sequencing Methode:

150 nmol Plasmid-DNA und 15 pmol Sequenzier-Primer wurden mit 2 µl BigDye-Reaktionslösung und 6 µ halfTERM-Puffer versetzt und auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gebracht.

Die cycle sequencing Reaktion erfolgte in einem PCR-Thermocycler mit

folgendem Temperaturprogramm:

Schritt	Temperatur	Zeit	Anmerkung
1	96°C	10 s	
2	50°C	5S	
3	60°C	4 min	→ Schritt 1 / 25 Zyklen
4	4°C		

Tabelle 16: Temperatur-Programm der Sequenzierungs-Reaktion

Zur Reinigung der Sequenzierprobe wurde der Reaktionsansatz mit 45 µl absolutem Ethanol versetzt und 20 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde die DNA 10 bis 20 min an der Luft getrocknet.

Die DNA-Sequenzierung erfolgte durch Mitarbeiter des Servicelabors am Institut für Zellbiologie und klinische Neurobiologie des Universitätskrankenhauses Eppendorf (UKE) auf einem ABI Prism™377 DNA-Sequencer der Firma Applied Biosystems. Die DNA-Sequenz wurde in Form eines Vier-Farben-Elektropherogramms dokumentiert.

3.3 Zellkultur

Alle Arbeiten mit HeLa- und COS-Zellen wurden unter einer Sterilwerkbank (Bioguard Hood, Baker Company) durchgeführt. Der Umgang mit transfizierten HeLa- und COS-Zellen (GVO) erfolgte unter Beachtung des Gentechnikgesetzes ausschließlich in den dafür ausgewiesenen Räumlichkeiten unter einer Sterilwerkbank (Hera Safe, Heraeus).

3.3.1 Nährmedien, Seren und Puffer

- Dulbecco modified minimal Essential Medium (DMEM) (Seromed)
- Fötale Kälberserum (FCS) (Seromed)
- 1 x PBS
- Trypsinlösung

Lösungen für die Zellkultur wurden grundsätzlich in einem Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Um jedoch die Autoproteolyse von Trypsin zu verhindern, wurden

Trypsinlösungen direkt bei einer Temperatur von 4°C eingesetzt.

3.3.2 Subkultivierung von Zellen

- HeLa, HEK- und COS-Zellen
- DMEM
- DMEM (+ 10 % FCS)
- Trypsin-EDTA
- Zellkulturschalen (Nunc)

Nach Erreichen der Konfluenz erfolgte das Passagieren der Zellen, d.h. die Zellen wurden unter Verdünnung vom alten Kulturgefäß in ein neues überführt.

Nach sorgfältiger Entfernung des alten Mediums und Waschen der Zellen mit 5 ml PBS wurden die Zellen nach Zugabe von 1 ml Trypsinlösung 5 bis 10 min bei 37°C in einer 5 %-igen CO₂-Atmosphäre inkubiert. Die von der Kulturschale abgelösten Zellen wurden zur Inhibierung des Trypsins mit 8 ml DMEM versetzt und 5 min bei 1.000 rpm zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellsediment in 10 ml frischen DMEM (+10 % FCS) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in geeigneter Verdünnung passagiert.

3.3.3 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Hämocytometer (Neubauer-Zählkammer).

3.3.4 Transfektion von HeLa-, HEK- und COS-Zellen

Vorbereitung von 6-Loch-Schalen und 12-Loch-Schalen:

- 70 %-iger Ethanol
- 6- oder 12-Loch-Schalen (COStar)
- Poly-Lysin-Lösung

Zur Vorbereitung der 6-Loch-Schalen wurden Deckgläschen (ø 2.5cm) mit 70 %-igem Ethanol gespült, abgeflammt und auf die Schalen verteilt. Die Deckgläschen

wurden mit 500 µl Poly-Lysin-Lösung benetzt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Poly-Lysin-Lösung entfernt und die Schalen über Nacht bei RT getrocknet.

Einsäen von HeLa und COS-Zellen in die 6-Loch-Schalen

Für das Einsäen der Zellen in die 6-Loch-Schale wurden subkonfluente Zellen (75 % Konfluenz) verwendet. Nach der Subkultivierung (s. 3.3.2) wurde das Zellsediment in 10 ml PBS resuspendiert, erneut zentrifugiert, der Überstand entfernt und die sedimentierten Zellen in 10 ml DMEM (+0.5%) resuspendiert.

Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in der entsprechenden Konzentration auf die 6-Loch-Schale verteilt.

FuGENE-Transfektions-Methode

- *FuGENE 6 Transfection Reagent* (Roche)
- Serum-freies DMEM
- Serum-haltiges DMEM (+10 % FCS)

In einer 6-Loch-Schale wurden pro Loch 1×10^5 Zellen in 2 ml DMEM (10% FCS) ausgesät und 24 h bei 37°C in einer 5 %-igen CO₂-Atmosphäre kultiviert.

Nach Bestimmung des optimalen Verhältnisses von FuGENE (Volumen) zu Plasmid-DNA (Masse) in einem Vorversuch, wurden 3 µl FuGENE und 1 µg Plasmid-DNA für die Herstellung der entsprechenden Transfektionsansätze verwendet.

In ein 1.5 ml Eppendorfgefäß wurde Serum-freies DMEM vorgelegt, so dass nach Zugabe des FuGENE-Reagenzes das Gesamtvolumen 100 µl betrug. Um die Adsorption des FuGENE-Reagenzes an der Wandung des Eppendorfgefäßes zu verhindern, wurde das Reagenz direkt in das vorgelegte Medium pipettiert. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurde das verdünnte FuGENE-Reagenz in ein zweites 1.5 ml Eppendorfgefäß mit der entsprechenden DNA-Lösung (1 µg DNA in TE-Puffer) tropfenweise hinzugegeben. Durch Antippen wurde der Transfektionsansatz vorsichtig gemischt und 15 min bei RT inkubiert.

Das Medium wurde von den Zellen entfernt und der Transfektionsansatz tropfenweise direkt auf die Zellen gegeben. Nach 5minütiger Inkubation wurden

2 ml FCS-haltiges Medium auf die Zellen gegeben und diese 24-48 h bei 37°C in einer 5 %-igen CO₂-Atmosphäre kultiviert.

3.4 Ribosomen-Isolierung aus COS-1-Zellen

3.4.1 Isolierung von 80S-Ribosomen

- Transfizierte COS-Zellen
- PBS
- RSB (hypotoner Puffer)
- Triton X-100 (10%)
- 10 mM Tris-HCl pH 7.4
- 2M STKM
- PB-Puffer

Die komplette Isolierung wurde mit vorgekühlten Lösungen auf Eis durchgeführt.

Es wurden 1×10^7 frisch geerntete Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml RSB 10 Minuten auf Eis inkubiert.

Die Zellkerne wurden durch 5-minütige Inkubation auf Eis nach Zugabe von Triton X-100 (Endkonzentration 1%) und anschließender Zentrifugation (2,5krpm 5min 4°C) entfernt.

Das Kernpellet wurde in 500µl 10 mM Tris-HCl pH 7.4 aufgenommen und bei –20°C eingefroren.

Der postnucleare Überstand wurde vorsichtig auf 3ml eines 2M STKM-Kissens pipettiert und bei 40.000 rpm (Beckmann L5-65, TI-60-Rotor) 16 Stunden lang zentrifugiert.

Der Überstand wurde entfernt und bei –20°C eingefroren.

Das Ribosomenpellet wurde in 2 ml PB-Puffer resuspendiert und ebenfalls bei –20°C aufbewahrt.

3.4.2 Ribosomen-Profil: Extraktion von ribosomalen 40S- und 60S-Untereinheiten, Monosomen und Polysomen

Es wurde zur Erstellung eines Ribosomen-Profiles nach dem Protokoll von Tollervey *et al.* (1993) vorgegangen.

- Transfizierte COS-Zellen
- PBS
- Triton X-100 (10%)
- Sucrose 10% und 40%-Puffer
- TKM

Die komplette Extraktion wurde mit vorgekühlten Lösungen auf Eis durchgeführt.

Es wurden 1×10^7 frisch geerntete Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und in 1ml TKM aufgenommen. Im Dounce Homogenizator wurden die Zellen homogenisiert und die Zellkerne durch Zugabe von Triton X-100 (Endkonzentration 1%) und anschließender Zentrifugation (4.000 krpm 10 min 4°C) entfernt.

600 µl des Überstandes wurden auf 11ml eines 10-40% Sucrose Gradienten geladen und bei 38.000 rpm (Beckmann LE-65, SW-41-Rotor) 85 minuten lang zentrifugiert.

Der Gradient wurde dann mit dem Densi-Flow IIC in etwa 15 Fraktionen fraktioniert und im Western-Blot auf Fusionsproteine untersucht.

3.5 Nachweis von EGFP-Fusionsproteinen durch Fluoreszenz-mikroskopie

- 4 %-ige Formaldehydlösung
- PBS
- Mowiol

Fixierung von COS-Zellen:

Die transfizierten Zellen wurden nach zweimaligem Waschen mit je 2 ml PBS mit

2 ml einer 4 %-igen Formaldehydlösung (nicht älter als 12 Tage) versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen zweimal mit je 2 ml PBS gewaschen.

Anfertigung von Dauerpräparaten:

Die in PBS gelagerten Deckgläschen wurden mit bidestilliertem Wasser kurz gewaschen, um ein Ausfallen von PBS-Kristallen zu vermeiden. Da diese Zellen nicht permeabilisiert wurden, mussten diese dann schnell mit Mowiol auf einen Objektträger fixiert werden. Die Präparate wurden bei 4°C gelagert.

Detektion von EGFP-Fusionsproteinen:

Die Detektion der EGFP-Fusionsproteine erfolgte mit Hilfe des Mikroskops Axiovert 135 (Zeiss) bei einer 630-fachen Vergrößerung (Objektiv: Plan Apochromat 63x/1.40 Oil Ph 3).

Die Lokalisation der fluoreszierenden EGFP-Fusionsproteine wurde mit dem Kappa Imaging System dokumentiert.

3.6 Nachweis von Proteinen durch Immunfluoreszenzmikroskopie

- 4 %-ige Formaldehydlösung
- 0.2% Triton-X-100 in PBS
- 0.1M Glycin in PBS
- 0.5% und 5% Milchpulver in PBS
- PBS
- AntiFade
- 1. Antikörper: monoklonaler Anti-β-Galaktosidase-Antikörper aus Maus (Boehringer): 10µg/ml in 0.5% Milchpulver
- 1. Antikörper: FITC-konjugierter polyklonaler Anti-β-Galaktosidase-Antikörper aus Kanickel (Abcam): 1/1000 in 0.5% Milchpulver
- 1. Antikörper: polyklonaler Anti-yrpS6A-Antikörper aus Kaninchen (2415) 1/50 in 0.5% Milchpulver

- 1. Antikörper: polyklonaler Anti-hrpS6-Antikörper aus Kaninchen (2414) 1/100 in 0.5% Milchpulver
- 2. Antikörper: FITC-konjugierter Anti-Maus-IgG-Antikörper aus Ziege (Sigma) 1/80 in 0.5% Milchpulver
- 2. Antikörper: Alexa488-konjugierter Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus Ziege (Molecular Probes) 1/200 in 0.5% Milchpulver

Fixierung und Permeabilisierung der Zellen

Die transfizierten Zellen wurden analog zu 3.5 mit Formaldehyd fixiert, 5min mit der Glycinlösung und 5min mit der Triton-Lösung inkubiert. Nach jedem Inkubationsschritt wurde mit PBS gewaschen.

Detektion

Die Zellen wurden für 30min mit 5%iger Milchpulverlösung abgesättigt und zweimal mit 0.5%iger Milchpulverlösung gewaschen. Auf jedes Deckgläschen wurde 100µl des ersten Antikörpers gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit 0.5% Milchpulver gewaschen und 2 Stunden mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Nach erneuten Waschen mit PBS und in einem letzten Schritt mit destilliertem Wasser, wurden die Zellen mit dem AntiFade-Reagenz eingedeckelt. Sie konnten nach Trocknung mikroskopiert werden.

3.7 Nachweis von Proteinen im Western-Blot

3.7.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

- Acrylamidlösung
- Trenngelpuffer
- Sammelgelpuffer
- 10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS)
- 10% (w/v) SDS
- TEMED

- Elektrodenpuffer
- Denaturierungspuffer
- Vertikal-Gelelektrophoreseapparatur und Stromgeber
- Glasplatten (10 x 8 cm²), Abstandhalter (1mm), Klammern
- Kamm für 10 Proben (1mm)

Probenvorbereitung:

1 Teil Proteinprobe wurde mit 2 Teilen 2x Denaturierungspuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Die Proteinproben wurden entweder gleich aufgetragen oder bei -20°C gelagert.

Vorbereitung des Gels und Elektrophorese

Die Glasplatten wurden mit Spülmittel gereinigt, mit Ethanol entfettet und an der Luft getrocknet. Die Abstandhalter wurden U-förmig an die Plattenränder gelegt und die Platten zur Gelkammer zusammengeklammert. Die Trenngellösung (Tabelle 17) wurde zwischen die Platten bis 2 cm unter den oberen Rand eingefüllt und mit Wasser überschichtet.

Nach der Polymerisierung wurde die überstehende Lösung abgegossen, die Sammelgellösung (siehe Tabelle) eingefüllt und die Schablone eingesetzt. Nach Polymerisierung wurden die Schablone und die Abstandhalter entfernt und die Taschen mit Elektrodenpuffer ausgespült. Die Gelkammer wurde in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt, Elektrodenpuffer eingefüllt und die Luftblasen mit einer Spritze entfernt. Die denaturierten Proteinproben wurden in jede Tasche eingefüllt.

Die Elektrophorese erfolgte bei 20 mA bis die Bromphenolblau-Front das Ende des Trenngels erreicht hatte. Anschließend wurde das Gel entweder einer Coomassie-Färbung unterzogen oder geblottet.

Trenngel-Zusammensetzung	Acrylamid-Konzentration (%)		
	10,0	12,5	15,0
Acrylamidlösung	2,3 ml	2,9 ml	3,5 ml
3M Tris/HCl pH 8.9	0,88 ml	0,88 ml	0,88 ml
H ₂ O	3,7 ml	3,1 ml	2,5 ml
Mischung entgasen			
10 % SDS	70 µl	70 µl	70 µl
10% APS	56 µl	56 µl	56 µl
TEMED	5,6 µl	5,6 µl	5,6 µl

Tabelle 17: Trenngel-Zusammensetzung

Sammelgel-Zusammensetzung	
Acrylamidlösung	330 µl
1M Tris/HCl pH 6.8	260µl
H ₂ O	880 µl
Mischung entgasen	
10 % SDS	20 µl
10 % APS	20 µl
TEMED	1 µl

Tabelle 18: Sammelgel-Zusammensetzung

3.7.2 Western - Blot

- Transferpuffer I
- Transferpuffer II
- Transferpuffer III
- Nitrocellulose - Membran
- Semi-Dry-Blotting Apparatur

Die Nitrocellulose-Membran und 15 Whatman 3MM-Filterpapiere wurden auf die zu blottende Gelgröße zurechtgeschnitten. Die Elektrodenplatten der Blotting-Apparatur wurden gleichmäßig mit H₂O benetzt. Beim Zusammenbau der Transfereinheit mußte darauf geachtet werden, daß keine Luftblasen auftraten, da sonst an dieser Stelle der Proteintransfer unterbrochen wäre. Die Transfereinheit wurde wie folgt aufgebaut:

Kathode (-) 5 Lagen 3MM-Filterpapier getränkt in Puffer III
2 Lagen 3MM-Filterpapier getränkt in Puffer II
Polyacrylamidgel
Nitrocellulose-Membran
3 Lagen 3MM-Filterpapier getränkt in Puffer I
Anode (+) 5 Lagen 3MM-Filterpapier getränkt in Puffer I

Die obere Elektrodenplatte wurde mit ungefähr 1 kg beschwert. Der Transfer wurde bei 64 mA für 1,5 h durchgeführt.

3.7.3 PonceauS-Färbung von geblotteten Proteinen

- PonceauS-Färbelösung
- PBS
- 3 % BSA in TBS

Die Nitrocellulosemembran wurde für etwa 5 min in PonceauS-Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurde die gefärbte Membran durch mehrmaliges Spülen mit destilliertem H₂O unter ständiger Beobachtung bis zum Auftreten von Proteinbanden entfärbt. Die Markerbanden wurden markiert. Für eine weitere Detektion der Proteine wurde die Membran durch mehrmaliges Waschen in 3%iger BSA in TBS vollständig entfärbt und abgesättigt.

3.7.4 Immunologischer Nachweis geblotteter Proteine mittels Chemilumineszenz

- TBS
- 3 % BSA in TBS
- TBST
- 1. Antikörper: polyklonaler Anti-yrpS6A-Antikörper aus Kaninchen (2415)

1/1000 in TBST / 0,3% BSA

- 1. Antikörper: polyklonaler Anti-hrpS6-Antikörper aus Kaninchen (2414)
1/2500 in TBST / 0,3% BSA
- 2. Antikörper: Meerrettich-Peroxidase (hrp)- konjugierter-anti-Kaninchen-Ig-
Antikörper aus Esel (Amersham), (1:5000 in TBST / 0,3 % BSA)
- ECL + Western-Blot Detektionskit (Amersham), ECL-Lösungen 1 und 2

Die Nitrocellulosemembran wurde für 30 min unter leichtem Schütteln in der BSA-Lösung abgesättigt. Anschließend wurde die Membran dreimal für jeweils 15 min mit TBS gewaschen. Die Inkubation mit dem 1. Antikörper erfolgt für 4-16 h unter leichtem Schütteln bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen für 10 min mit TBST wurde die Membran für 1h mit einem hrp-konjugierten 2. Antikörper unter leichtem Schütteln inkubiert. Hiernach folgte ein viermaliges Waschen mit TBST für jeweils 10 min. Nach dem Waschen erfolgte die Detektion mit dem ECL-System. Hierfür wurden die beiden Reaktionslösungen aus dem Kit in einem Verhältnis 1:40 gemischt. Diese Mischung wurde für 5 min auf die Nitrocellulosemembran gegeben. Die Membran wurde unter eine Folie gelegt. Im Dunkeln wurde 10 - 60Sec ein Röntgenfilm aufgelegt, der dann anschließend entwickelt wurde.

4 Ergebnisse

4.1 Expression von Fusionsproteinen des ribosomalen S6-Proteins

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse beruhen auf der Expression von S6-Proteinen oder S6-Proteinfragmenten in eukaryontischen Zellen. Zu diesem Zweck wurden entsprechende Plasmidvektoren hergestellt, die auf unterschiedliche Weise zum Einsatz kamen.

So wurden unmarkierte Proteine sowie an β -Galaktosidase bzw. an das Grün-Fluoreszierende-Protein (EGFP) gekoppelte Fusionsproteine in unterschiedlichen Zelllinien exprimiert.

Die exprimierten Proteine wurden anschließend durch direkte oder indirekte Immunfluoreszenz in den Zellen lokalisiert oder im Western-Blot nachgewiesen.

4.2 Konstruktion von Expressionsvektoren für S6-Fusionsproteine

4.2.1 Vektoren zur Expression von β -Galaktosidase-Fusionsproteinen

Zur Expression von β -Galaktosidase-markierten S6-Fusionsproteinen wurden die in unserer Arbeitsgruppe entwickelten pASH und pASH-SV40-Vektoren verwendet (Lipsius *et al.*, 2005).

Unter der Kontrolle des RSV-Promoters werden das eingebrachte Gen oder Genfragment und das darauf folgende lacZ-Gen in eukaryontischen Zellen exprimiert; es entsteht ein C-terminal gekoppeltes β -Galaktosidase-S6-Fusionsprotein.

Der pASH-SV40-Vektor ermöglicht es zudem, Fusionsproteine zu exprimieren, welche das SV40-Kernlokalisierungssignal enthalten. Dieses ist notwendig, um exprimierte Proteindomänen, die kein eigenes Kernsignal enthalten, in den Zellkern zu transportieren, um dort ihre Bindungseigenschaften im Nucleolus zu untersuchen.

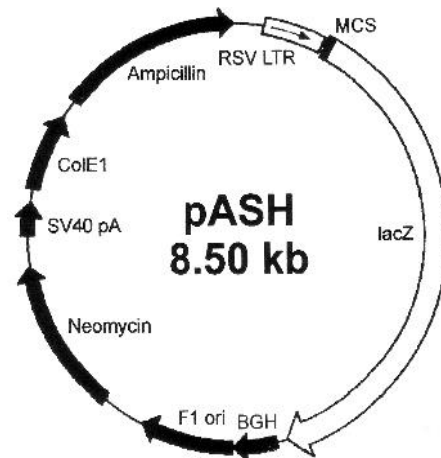


Abbildung 19: Vektorkarte von pASH (Lipsius, 1995)

In diese Vektoren wurden verschiedene hrpS6-cDNA-Fragmente kloniert. Als Templat für die notwendige PCR (Programm MABSKS6) zur Herstellung dieser Fragmente dienten folgende Vektoren:

- pBluescript-S6(WT) (*A. Bauche*)
- pASH-S6(1-249,Δ140-210) (*S. Kundu-Michalik*)
- pASH-S6(3-249, Δ(I,II,III)): I, II und III bezeichnen hier jeweils die Kernsignale des hrpS6 (*E. Lipsius*)
- pASH-S6(3-249, Δ(I,II,215/216)) (*E. Lipsius*).

Die erhaltenen Amplifikate, die zur gerichteten Klonierung an ihren 5'-Enden zusätzlich Linkersegmente mit den Restriktionsschnittstellen Afl II und Hind III aufwiesen, wurden in einem 1.5%-igen Agarosegel anhand ihrer Größe überprüft und anschließend mit den beiden Restriktionsendonucleasen Afl II und Hind III in einem Doppelverdau restringiert. Nach gelelektrophoretischer Isolierung und anschließender Aufreinigung wurden die geschnittenen cDNA-Fragmente in die entsprechenden, ebenfalls restringierten, Zielvektoren ligiert. Diese Ligationsansätze wurden wahlweise in kompetenten InvFa oder XL1-Blue-Zellen transformiert und ausplattiert.

Aus den erhaltenen Kolonien wurden die Plasmide mittels Minipräparation isoliert und ihre Richtigkeit über Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft.

Die Tabelle 19 gibt eine Übersicht über die hergestellten Konstrukte und die dabei verwendeten Primer.

Konstrukt	Primer	
S6(53-249, Δ 140-210)	MABS6A53	5'-TTGGATCCCTTAAGAGTGGTGGGAACGACAAACAA-3'
	MABS6H249	5'-GGATCCAAAGCTTTTCTGACTGGATTCAGACTT-3'
S6(64-249, Δ 140-210)	MABS6A64	5'-TTGGATCCCTTAAGAAGCAGGGTGTCTTGACCCAT-3'
	MABS6H249	5'-GGATCCAAAGCTTTTCTGACTGGATTCAGACTT-3'
S6(72-249, Δ 140-210)	MABS6A72	5'-TTGGATCCCTTAAGCGTGTCCGCCTGCTACTGAGT-3'
	MABS6H249	5'-GGATCCAAAGCTTTTCTGACTGGATTCAGACTT-3'
S6(75-249, Δ 140-210)	MABS6A75	5'-TTTTTATCTTAAGCTGCTACTGAGTAAGGGGCATTC-3'
	MABS6H249	5'-GGATCCAAAGCTTTTCTGACTGGATTCAGACTT-3'
SV40-S6(53-159)	MABS6A53	5'-TTGGATCCCTTAAGAGTGGTGGGAACGACAAACAA-3'
	MABS6H159	5'-GGATCCAAAGCTTCTTACAACATACTGGCGGAC-3'
SV40-S6(72-159)	MABS6A72	5'-TTGGATCCCTTAAGCGTGTCCGCCTGCTACTGAGT-3'
	MABS6H159	5'-GGATCCAAAGCTTCTTACAACATACTGGCGGAC-3'
SV40-S6(72-120)	MABS6A72	5'-TTGGATCCCTTAAGCGTGTCCGCCTGCTACTGAGT-3'
	MABS6H120	5'-GGATCCAAAGCTTGCATCCTTCTCTTTTTC ACAATAA-3'
SV40-S6(72-102)	MABS6A72	5'-TTGGATCCCTTAAGCGTGTCCGCCTGCTACTGAGT-3'
	MABS6H102	5'-GGATCCAAAGCTTACAATGCAACCACGAAGT-3'
SV40-S6(72-98)	MABS6A72	5'-TTGGATCCCTTAAGCGTGTCCGCCTGCTACTGAGT-3'
	MABS6H98	5'-GGATCCAAAGCTTCGAAGTATTTCTCTTTCT-3'
SV40-S6(72-94)	MABS6A72	5'-TTGGATCCCTTAAGCGTGTCCGCCTGCTACTGAGT-3'
	MABS6H94	5'-GGATCCAAAGCTTCTCTTTCTTTCTCCAGTTCT-3'
S6(173-203)	MABS6A173	5'-TTTTTATCTTAAGGCACCCAAGATTCAGCGTCTTGTA-3'
	MABS6H203	5'-GGATCCAAAGCTTTTATTTTCTTGGTACGCTGCTT-3'
SV40-S6(173-249, Δ (I,II,III))	MABS6A173	5'-TTTTTATCTTAAGGCACCCAAGATTCAGCGTCTTGTA-3'
	MABS6H249	5'-GGATCCAAAGCTTTTCTGACTGGATTCAGACTT-3'
SV40-S6(173-249, Δ (I,II,215/216))	MABS6A173	5'-TTTTTATCTTAAGGCACCCAAGATTCAGCGTCTTGTA-3'
	MABS6H249	5'-GGATCCAAAGCTTTTCTGACTGGATTCAGACTT-3'
Sequenzierprimer	pASH-For	5'-GGTCTGACATGGATTGGACG-3'
	pASH-Rev	5'-GGAGTGCTGCAAGGCG-3'

Tabelle 19: Hergestellte hrpS6-Konstrukte in pASH und pASH-SV40-Vektoren mit den zugehörigen Primern

Die so erhaltenen Plasmide konnten direkt in Lokalisationsstudien eingesetzt werden, wobei die Detektion immunocytoologisch erfolgte.

4.2.1.1 Vektoren zur Expression von EGFP-Fusionsproteinen

Um EGFP-markierte Fusionsproteine in eukaryontischen Zellen zu exprimieren, wurde der Expressionsvektor pEGFP-C1 verwendet.

Der eukaryontische Expressionsvektor pEGFP-C1 kodiert für eine rot-verschobene Variante des wildtyp EGFPs (Prasher *et al.*, 1992; Chalfie *et al.*, 1994, Inouye *et al.*, 1994) die zugunsten einer helleren Fluoreszenz und einer höheren Expression in Mammalia-Zellen optimiert wurde.

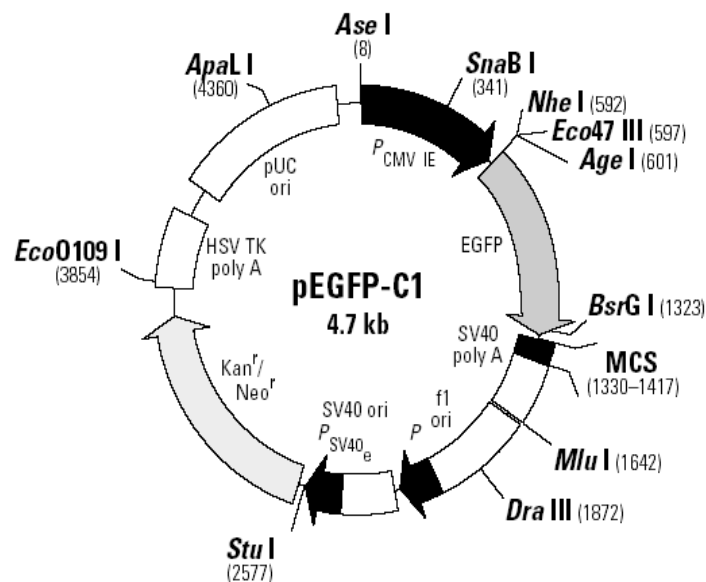


Abbildung 20: Vektorkarte des pEGFP-C1-Vektors (Clontech)

In dieser Arbeit wurden folgende Plasmide, die bereits zuvor in unserer Arbeitsgruppe entwickelt wurden, eingesetzt:

- pEGFP-C1-S6(3-249) (*E. Lipsius*)
- pEGFP-C1-S6(3-249, Δ (I,II)) (*E. Lipsius*)
- pEGFP-C1-S6(3-249, Δ (I,II,III)) (*E. Lipsius*)
- pEGFP-C1-S6(3-249, Δ (I,II,215/216)) (*E. Lipsius*)

Sie exprimieren N-Terminal an EGFP gekoppelte Varianten des hrpS6, wobei es sich um die Wildtypform und Deletionskonstrukte handelt, denen zwei oder mehrere Kernsignale fehlen.

4.2.2 Vektoren zur Expression von unmarkierten Proteinen

Der Vektor pcDNA5FRT/TO wurde verwendet, um unmarkierte Proteine in eukaryontischen Zellen zu exprimieren. Dieser Vektor ermöglicht es, einklonierte Gene unter der Kontrolle eines induzierbaren Promoters zu exprimieren und kann eingesetzt werden, um stabile Zelllinien zu erhalten.

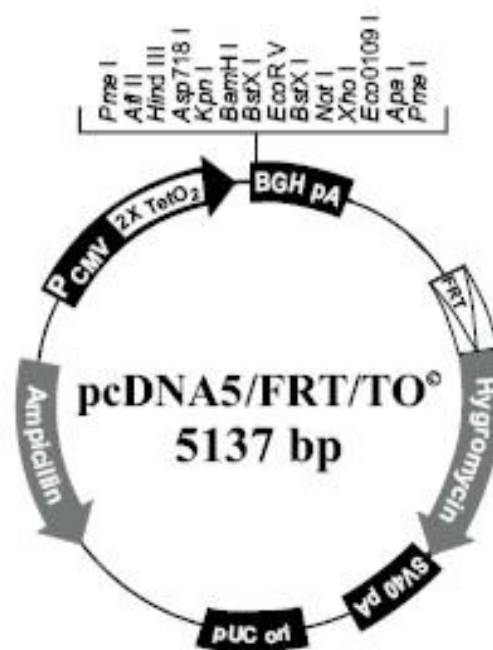


Abbildung 21: Vektorkarte von pcDNA5FRT/TO (Invitrogen)

4.2.2.1 Klonierung der hrpS6-Konstrukte

Da an β -Galaktosidase oder EGFP fusioniertes hrpS6 im Nucleolus akkumuliert und nicht in Ribosomen eingebaut wird (Walter *et al.*, 2000), wurde dieser Vektor verwendet, um ungekoppelte Varianten des hrpS6 in eukaryontischen Zellen zu exprimieren, die dann z.B. über Antikörper detektiert werden konnten.

Als Templat für die PCR (Programm MAB46-52) dienen die oben beschriebenen EGFP-Vektoren. Die dabei verwendeten Primer ergänzten die vorhandene Sequenz um folgende Eigenschaften:

- Startkodon und Kozaksequenz, dabei entstand nach dem Methionin noch ein Alanin
- Kodons der bei der ursprünglichen Klonierung verlorenen ersten Aminosäuren
- Linkersegmente mit den Schnittstellen Hind III (5´) und BamH I (3´)

4.2.2.2 Klonierung der yrpS6A-Konstrukte

In diesen pcDNA5FRT/TO-Vektor wurden ebenfalls verschiedene Konstrukte einkloniert, die auf dem ribosomalen Hefeprotein yrpS6A basieren. Als Templat diente dabei pBluescript-S10 (wobei S10 die frühere Bezeichnung von yrpS6A ist).

Klonierung des yrpS6A in pcDNA5FRT/TO

Mittels PCR wurde yrpS6A in den pcDNA5FRT/TO-Vektor eingebracht. Dabei wurden die Primer so gewählt, dass das Amplifikat folgende Eigenschaften hatte:

- Kozaksequenz, dabei entstand nach dem ersten Methionin noch ein Alanin
- Linkersegmente mit den Schnittstellen Hind III (5´) und BamH I (3´)

Konstrukt	Primer	
yrpS6A	MA-Kozak-For	5´-CCC <u>GGGAAGCTT</u> ACCATGGCGAAGTTGAACATTTCT-3´
	MA-S10Rev	5´-GGG <u>CCGGATCCTT</u> AAGCCTTCAAAGAAGAAGCTC-3´

Tabelle 20: Verwendete Primer zur Klonierung von yrpS6A in pcDNA5FRT/TO

Klonierung von yrpS6A-HCT in pcDNA5FRT/TO

Das Konstrukt yrpS6A-HCT (HCT steht dabei für *human C-Terminus*) besteht aus dem ribosomalen Hefeprotein, das C-terminal mit den entsprechenden zehn Aminosäuren des menschlichen ribosomalen Proteins hrpS6 ergänzt wurde.

Um dies zu erreichen, wurde die yrpS6A-cDNA durch zwei aufeinander folgende PCRs um die Kodons dieser zehn Aminosäuren erweitert. Die verwendeten Primer, die zudem die Schnittstellen Hind III und BamH I zur späteren Ligation in den Zielvektor enthielten, sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Konstrukt	Primer	
yrpS6A-HCT	MA-Kozak-For	5' -CCC <u>GGGAAGCTT</u> ACCATGGCGAAGTTGAACATTTCT-3'
	SP-S6aRev1	5' -GGATTCAGACTTAGAAGTAGAAGCCTTCAAAGAAGAAGC-3'
	SP-S6aRev2	5' -ATAT <u>GGATCCTT</u> ATTTCTGACTGGATTCAGACTTAGAAGTAGA-3'

Tabelle 21: Verwendete Primer zur Klonierung von yrpS6A-HCT in pcDNA5FRT/TO

In einer ersten PCR wurde mit den Primern MA-Kozak-For und SP-S6aRev1 das Wildtyp-S6A aus Hefe aus pEGFP-N1 mit dem PCR-Programm MA38-55 amplifiziert. Das erhaltene Amplifikat wurde dann mit den Primern MA-Kozak-For und SP-S6aRev2 erneut in einer PCR mit demselben Programm vervielfältigt, dieses Produkt wurde dann zur Ligation in den Vektor vorbereitet. Die weiteren Schritte entsprechen denen der vorangegangenen Konstrukte. Die Sequenzierung zeigte keine unerwünschten Mutationen im translatierten Protein.

hrpS6 Literatur	1	M-KLNISFPA TGCQKLVLD DERKLRTFYE KRMATEVAAD ALGEEWKGYV VRISGGNDKQ	59
yrpS6A	1	.A.....Y.V N.S..TF.I. ..HRI.V.FD..RIG..VDG. .V.D.F.... FK.....	60
yrpS6A-HCT	1	.A.....Y.V N.S..TF.I. ..HRI.V.FD..RIG..VDG. .V.D.F.... FK.....	60
hrpS6 Literatur	60	EGFPMKQGVLT HGRVRLLLSK GHSCYRPRRT GERKRKSVRG CIVDANLSVL NLVIVKKGKQ	119
yrpS6A	61L. PT.IK...T. NV.....D A..GPD.A.. A.....Q	120
yrpS6A-HCT	61L. PT.IK...T. NV.....D A..GPD.A.. A.....Q	120
hrpS6 Literatur	120	DIPGLTDTTV PRLGPKRAS RIRKLFNLSK EDDVRQYVVR KPLNKEGKKP RTKAPKIQL	179
yrpS6A	121	ELE..... .K.....N N...F.G...DF.I. REVT.-.E.T Y.....	179
yrpS6A-HCT	121	ELE..... .K.....N N...F.G...DF.I. REVT.-.E.T Y.....	179
hrpS6 Literatur	180	VTPRVLQHKR RRIALKKQRT KKNKEEAAEY AKLLAKRMKE AKEKRQEQIA KRRRLSSLRA	239
yrpS6A	180	...QR..R.. HQR...VRNA QAQR.A.... .Q.....LS. R.AEKA.--I RK..A...K.	237
yrpS6A-HCT	180	...QR..R.. HQR...VRNA QAQR.A.... .Q.....LS. R.AEKA.--I RK..A...K.	237
hrpS6 Literatur	240	STSKSESSQK	249
yrpS6A			
yrpS6A-HCT	238	247

Tabelle 22: Sequenzvergleich von hrpS6, yrpS6A und yrpS6A-HCT

4.2.3 Expression von hrpS6-Fusionsproteinen zur Untersuchung der Nucleolaren Bindungssequenzen

4.2.4 Bisher identifizierte Nucleolare Bindungssequenzen von hrpS6

Bisherige Untersuchungen der Nucleolaren Bindungssequenzen, im folgenden NuBiS genannt, des humanen ribosomalen Proteins S6 identifizierten eine C-terminal lokalisierte NuBiS. Diese konnte auf den Aminosäurebereich von Thr171 bis Ala210 eingegrenzt werden (Schmidt *et al.* 1995).

Bei seinem Homologen in der Hefe, dem ribosomalen Protein yrpS6A, wurden

später zwei NuBiS identifiziert (Lipsius *et al.*, 2005). Die C-terminal gelegene NuBiS II entspricht in etwa der beim Menschen, sie befindet sich im Aminosäurebereich Lys173 – Ala213. Das ribosomale Protein yrpS6A weist zudem eine N-Terminale NuBiS auf. Sie konnte auf den Bereich Lys73 – Pro135 eingegrenzt werden und wurde NuBiS I genannt.

Die folgende Abbildung fasst diese Ergebnisse zusammen und verdeutlicht zudem die vorliegende Übereinstimmung der Kernlokalisierungssignale (NLS) sowie der NuBiS II bei beiden Proteinen.

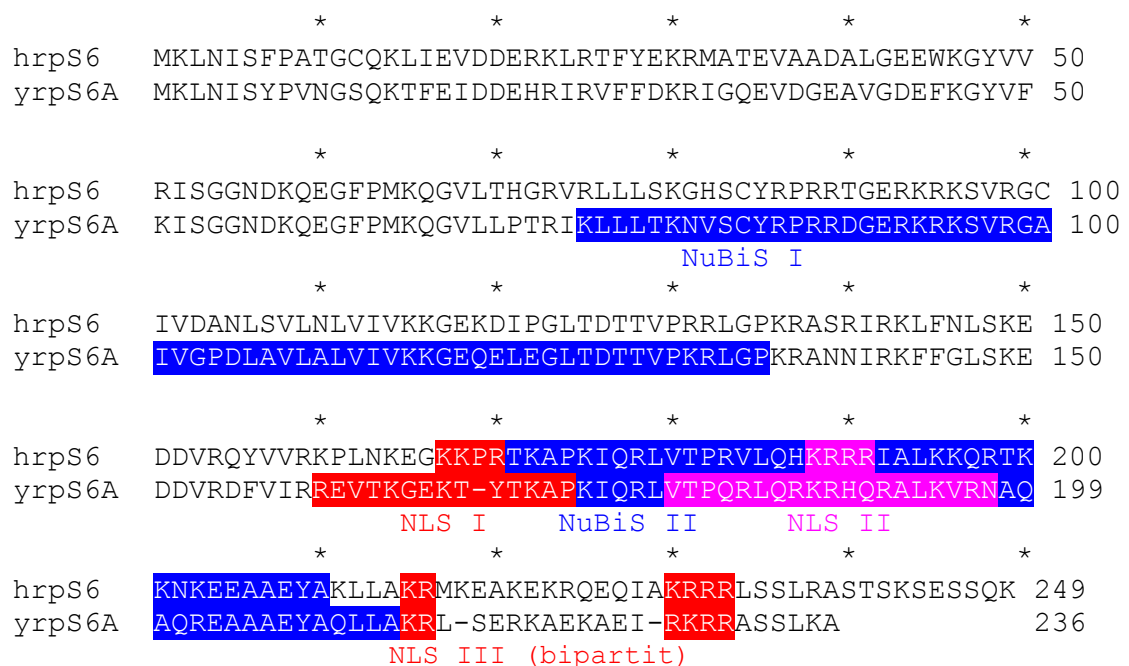


Abbildung 22: Verteilung der bislang identifizierten NLS (rot) und NuBiS (blau) bei hrpS6 und yrpS6A

4.2.5 Die N-terminale NuBiS I des humanen rpS6

Die Abbildung 22 zeigt, dass das Hefe yrpS6A eine Nucleolare Bindungssequenz im N-terminalen Bereich besitzt. Um festzustellen, ob das humane rpS6 ebenfalls eine entsprechende N-terminale NuBiS besitzt, wurden verschiedene an β -Galaktosidase gekoppelte hrpS6-Fragmente in COS-Zellen exprimiert.

Dazu wurden die COS-Zellen mit den vorbereiteten pASH-Plasmiden unter Verwendung des FuGene 6-Reagenzes transfiziert. Die Zellen wurden 36 bis 48 Stunden inkubiert. Dann erfolgte die immunocytoologische Lokalisation der Fusionsproteine unter Verwendung eines spezifischen β -Galaktosidase-

Antikörpers.

Als Kontrollen dienten die Immunfluoreszenzen von exprimierter β -Galaktosidase und an das Kernimportsignal SV40 gekoppelte β -Galaktosidase, die folgend abgebildet sind.

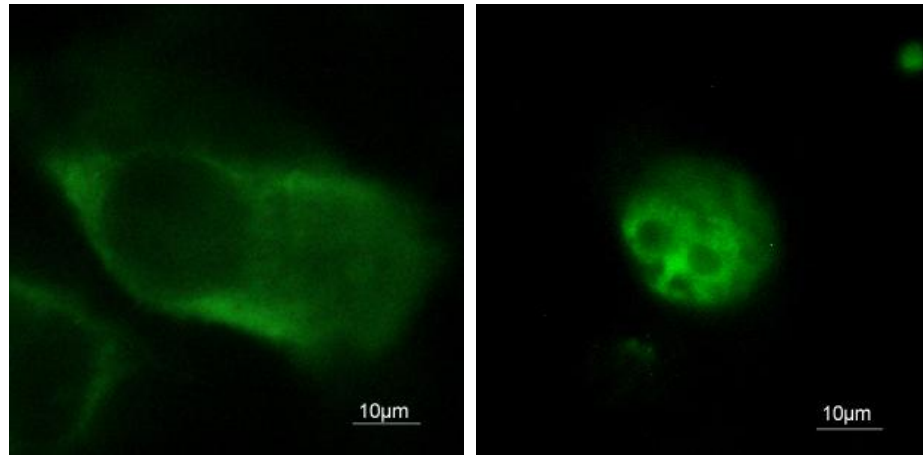
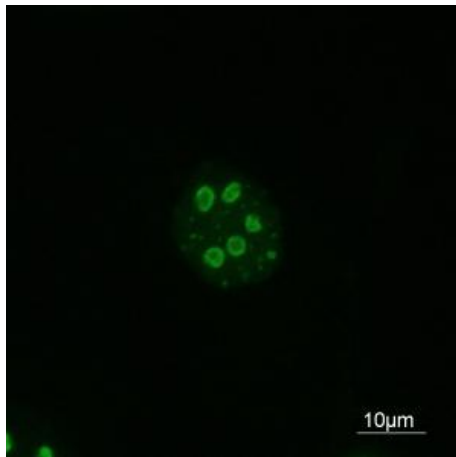


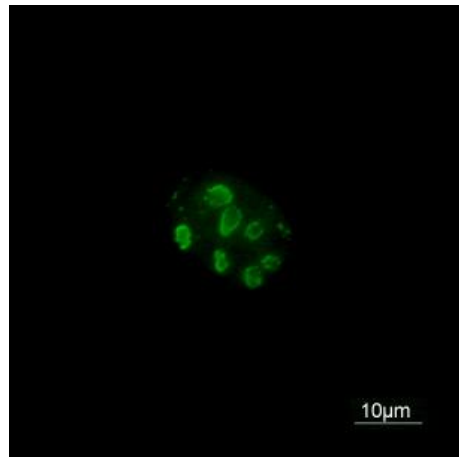
Abbildung 23: Immunfluoreszenzaufnahmen von exprimierter β -Galaktosidase: β -Galaktosidase (links) lokalisiert in Cytoplasma wohingegen es nach Kopplung an das SV40-NLS (rechts) im Nucleoplasma detektiert wird.

In einem ersten Schritt wurde auf Grundlage der Arbeiten von Kundu-Michalik (1997) und den Daten aus der Hefe-NuBiS I der Bereich von Ser53 bis Arg140 exprimiert. Das entsprechende Konstrukt S6(53-249, Δ 140-210) enthält zusätzlich das dritte Kernsignal, das einen Import des Fusionsproteins in den Zellkern gewährleistet. Dieser Aminosäurebereich lässt das Fusionsprotein eindeutig im Nucleolus akkumulieren. Die cytologische Fluoreszenz entspricht dem des Wildtyp-hrpS6 (Abbildung 24).

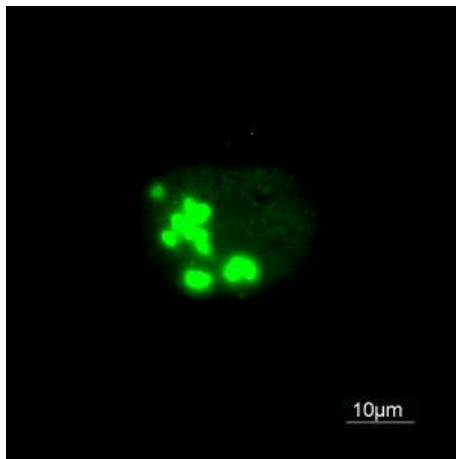
Dieses Fragment wurde N-terminal stufenweise verkürzt, die dabei entstandenen Konstrukte hrpS6(64-249, Δ 140-210) und S6(72-249, Δ 140-210) lokalisierten ebenfalls eindeutig am Nucleolus. Verkürzt man das letzte Fragment um weitere drei Aminosäuren, so lokalisiert S6(75-249, Δ 140-210) aufgrund des enthaltenen NLS III im Kern, die Nucleoli zeigen keine hervorgehobene Fluoreszenz (Abbildung 24). Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Kundu-Michalik (1997).



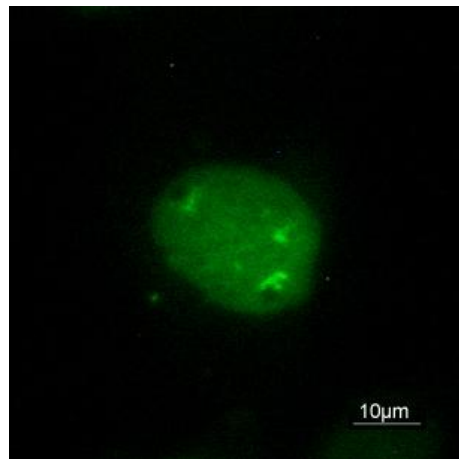
S6(53-249,Δ140-210)



S6(64-249,Δ140-210)



S6(72-249,Δ140-210)



S6(75-249,Δ140-210)

Abbildung 24: N-terminale Eingrenzung der NuBiS I des hrpS6. Die Aufnahmen zeigen, dass die Fragmente S6(53-249,Δ140-210), S6(64-249,Δ140-210) und S6(72-249,Δ140-210) in den Nucleoli akkumulieren und keine weitere Fluoreszenz im Kern aufweisen. Das Konstrukt S6(75-249,Δ140-210) lokalisiert im Nucleoplasma, was aufgrund des C-terminalen NLS III zu erwarten ist. Die letzte Aufnahme zeigt die Lokalisation von β -Galaktosidase.

Um sich nun C-terminal an die NuBiS I-Grenze des hrpS6 heranzutasten, wurde in der folgenden Versuchsreihe der bereits beschriebene pASH-SV40-Vektor verwendet. Dieser kodiert neben dem lacZ-Gen zur Expression der β -Galaktosidase für das SV40-NLS. Somit können Fragmente einkloniert werden, die über kein eigenes Kernsignal verfügen; sie werden nach der Expression dennoch in den Kern importiert und können so gegebenenfalls an die Nucleoli binden.

Dabei wurde ausgehend vom Aminosäurebereich Ser53 – Arg159, der von

Klokow als evolutionäre Homologiedomäne identifiziert wurde (Klokow, unveröffentlicht) und den bisher gesammelten Daten, C-terminal verkürzt.

Die dabei entstandenen Konstrukte weisen erneut charakteristische Lokalisationen in der Zelle auf (Abbildung 26).

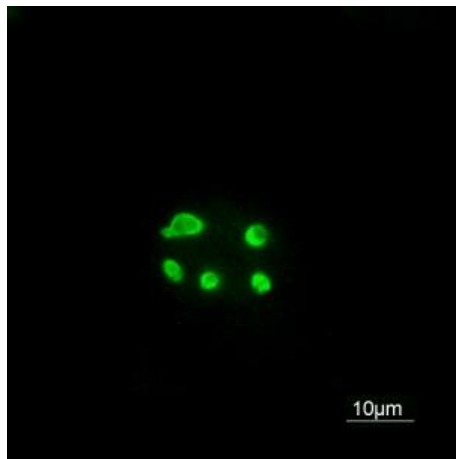
Das Konstrukt SV40-S6(53-159) lokalisiert erwartungsgemäß in den Nucleoli, die bereits identifizierte Sequenz zwischen den Aminosäuren Arg72 und Arg140 ist in diesem Konstrukt vollständig enthalten. Die neue Anordnung des Kernsignales, das sich nun N-Terminal davon befindet, beeinflusst die Lokalisation bemerkenswerterweise nicht.

Genauso verhält es sich mit dem Fragment SV40-S6(72-159), das in den Nucleoli akkumuliert. Unter Berücksichtigung der Proline an den Positionen 130 und 122, die in der Literatur allgemein als Helixbrecher bezeichnet werden, wurde nun das Konstrukt SV40-S6(72-120) kloniert und exprimiert. Die Expression dieses Konstruktes zeigte erneut eine deutliche Akkumulation der Fusionsproteine in den Nucleoli.

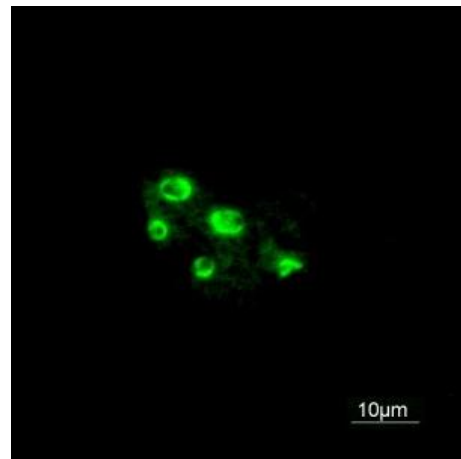
Nach Betrachtung der Ladungsverteilung der Aminosäuren im bisher identifizierten Bereich, wurde entschieden, das Fragment auf den Aminosäurebereich 72 bis 102 zu reduzieren, da sich im Bereich 103-120 kaum geladene Aminosäuren befinden (Abbildung 25).

72-**R****V****R****L****L****L****s****K****G****H****S****C****Y****R**_{gy}**P****R****R****T****G****E**
R**k****R****K****S****V****R****G****C****I****V****D****A****N****L****S****v****L****N****L****V****I**
v**K****K****G****E****k****D**-122

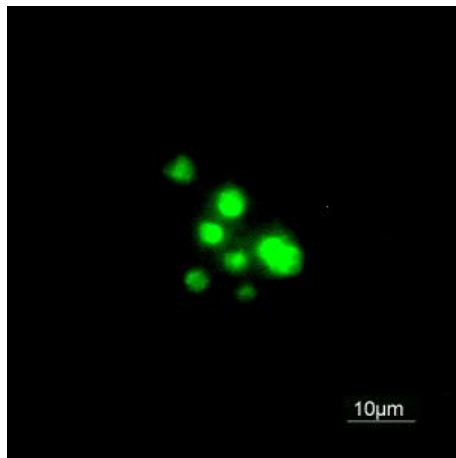
Abbildung 25: Sequenz des Aminosäurebereiches 72 bis 122 von hrpS6. Die Größe der Aminosäuren spiegelt ihren Grad der evolutionären Konservierung wieder, der zu einem späteren Zeitpunkt diskutiert wird (basische Aminosäuren sind rot dargestellt, Proline grün).



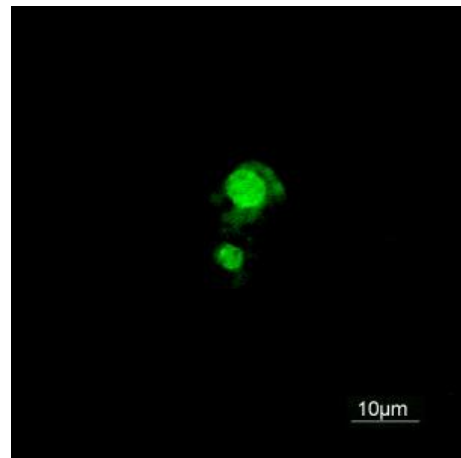
SV40-S6(53-159)



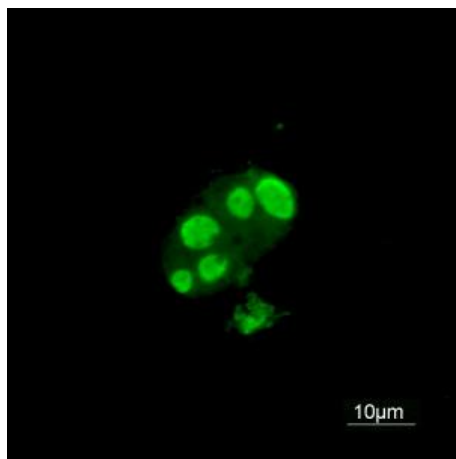
SV40-S6(72-159)



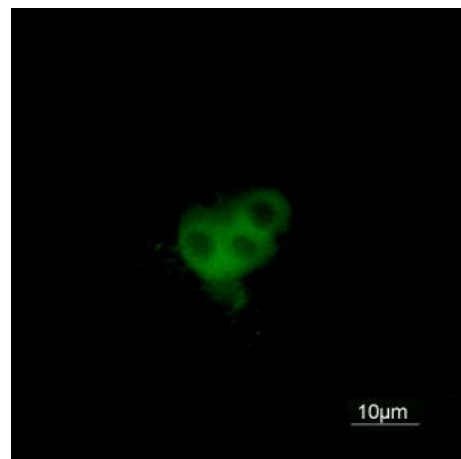
SV40-S6(72-120)



SV40-S6(72-102)



SV40-S6(72-98)



SV40-S6(72-94)

Abbildung 26: C-terminale Eingrenzung der NuBiS I. Die Aufnahmen zeigen, dass die Fragmente SV40-S6(53-159), SV40-S6(72-159) und SV40-S6(72-120) in den Nucleoli akkumulieren und kein Fusionsprotein im Kern nachgewiesen werden kann. Die Konstrukte SV40-S6(72-102) und SV40-S6(72-98) lokalisieren sowohl in den Nucleoli wie auch eindeutig im Kern. Das Konstrukt SV40-S6(72-94) lokalisiert ausschließlich im Nucleoplasma.

Exprimiert man das Konstrukt SV40-S6(72-102) (Abbildung 26), erkennt man neben der nucleolaren Fluoreszenz eine sehr schwache Fluoreszenz im Kern. Dies beruht wahrscheinlich auf der Tatsache, dass die Bindung des exprimierten Fragmentes nicht mehr optimal an die ribosomale RNA möglich ist. Um sicherzustellen, dass es sich jedoch weiterhin um eine spezifische Bindung des Konstruktes in den Nucleoli handelt, wurde daher eine weitere schrittweise C-terminale Verkürzung des Fragmentes vorgenommen. Dabei wurden jeweils vier Aminosäuren deletiert.

Das Konstrukt SV40-S6(72-98) unterscheidet sich in seiner Lokalisation nicht wesentlich gegenüber dem vorigen, die Nucleoli weisen weiterhin eine starke Fluoreszenz auf, wobei der Kern ebenfalls ein verhältnismäßig schwaches Signal zeigt.

Die weitere Verkürzung zum Konstrukt SV40-S6(72-94) führte allerdings zu einem kompletten Verlust der Nucleolus-Bindung des Fusionsproteins. Die Nucleoli wiesen überhaupt keine Fluoreszenzsignale auf, die Fusionsproteine lokalisierten eindeutig im Kern.

Dies Ergebnisse belegen, dass der Aminosäurebereich 99-120 nicht absolut essentiell für eine Nucleolusakkumulation ist.

Die Ergebnisse, die in Abbildung 26 auf Seite 83 dargestellt sind, belegen, dass der Aminosäurebereich Arg72 bis Arg98 eine eigenständige Nucleolare Bindungssequenz bildet. Diese besitzt kein eigenes Kernsignal und ist, unabhängig von der Position des eingebrachten Kernsignales, in der Lage die gekoppelte β -Galaktosidase in die Nucleoli zu transportieren.

Diese Nucleolare Bindungssequenz wurde NuBiS I des hrpS6 genannt.

4.2.6 Die C-terminale NuBiS II des humanen rpS6

4.2.6.1 Aminosäuresequenz von NuBiS II des humanen rpS6

Die C-terminale NuBiS II des humanen rpS6 konnte in vorherigen Untersuchungen bereits stark eingegrenzt werden (Schmidt *et al.*, 1995).

Die Identifizierung der konservierten NuBiS, sowie die erhobenen Daten von Klokow (unveröffentlicht), lassen die Vermutung zu, dass es sich bei Nucleolaren

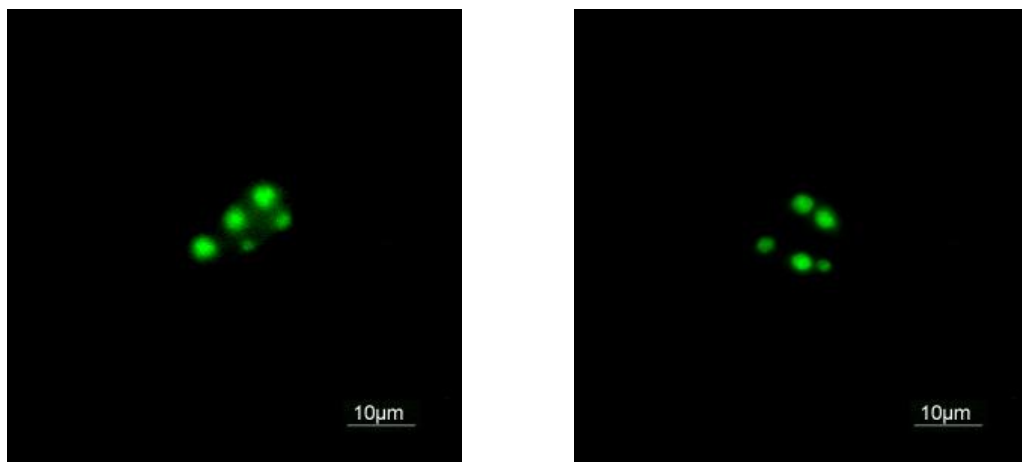
Bindungssequenzen um evolutionär stark konservierte Domänen handelt.

Betrachtet man nun die Konservierung des Aminosäurebereiches rund um die NuBiS II bei einigen ausgewählten Spezies (Abbildung 27), so erkennt man eine Abnahme des Konservierungsgrades am Ende der bislang eingegrenzten NuBiS I.

171-**A****P****K****I****Q****R****L****V****T****P**_R**V****L****Q****R****K****R**_R**R****I****A****L**
K**K**_K**R**_V**A****K**_N**K**-210

Abbildung 27: Sequenz des Aminosäurebereiches 171 bis 210 des hrpS6. Die Größe der Aminosäuren spiegelt ihren Grad der evolutionären Konservierung wieder, der zu einem späteren Zeitpunkt diskutiert wird (basische Aminosäuren sind rot dargestellt, Proline grün).

Es wurde daher über PCR ein Konstrukt synthetisiert, das für den höchstkonservierten Bereich im hrpS6-Protein kodiert. Dieses Konstrukt, pASH-S6(173-203), wurde in COS-Zellen exprimiert und die an das Fragment gekoppelte β -Galaktosidase mittels Antikörper detektiert.



S6(171-210)

S6(173-203)

Abbildung 28: Verkürzung der C-terminalen NuBiS II. Die Konstrukte S6(171-210) und S6(173-203) lokalisieren eindeutig und auf identische Weise in den Nucleoli.

Die in Abbildung 28 dargestellten Fluoreszenzaufnahmen zeigen, dass dieser auf 31 Aminosäuren reduzierte Bereich das Fusionsprotein quantitativ im Nucleolus akkumulieren läßt.

4.2.6.2 Abhängigkeit der NuBiS II vom NLS II

Die Experimente zur N-terminalen NuBiS haben gezeigt, dass diese kein eigenes Kernsignal besitzt. Die C-terminale NuBiS unterscheidet sich in dieser Hinsicht, da sich das NLS II (KRRR) im Aminosäurebereich 188 – 191 befindet. Die Expression ausgewählter Konstrukte sollte die Notwendigkeit des Tetrapeptids KRRR innerhalb der Nucleolaren Bindungssequenz zeigen.

Dazu wurde der gesamte C-Terminus eines vorliegenden Deletionskonstruktes, in dem die Kernsignale über PCR-Mutagenese entfernt wurden, über PCR in den pASH-SV40-Vektor kloniert. Die erhaltenen Plasmide pASH-SV40-S6(173-249, Δ (II,III)), in dem das bipartite NLS III komplett deletiert wurde, und pASH-SV40-S6(173-249, Δ (II,215/216)), in dem lediglich der erste Teil des bipartiten NLS III entfernt wurde, wurden in COS-Zellen 48 Stunden exprimiert und die Fusionsproteine anschließend immunocytoologisch detektiert (Abbildung 29).

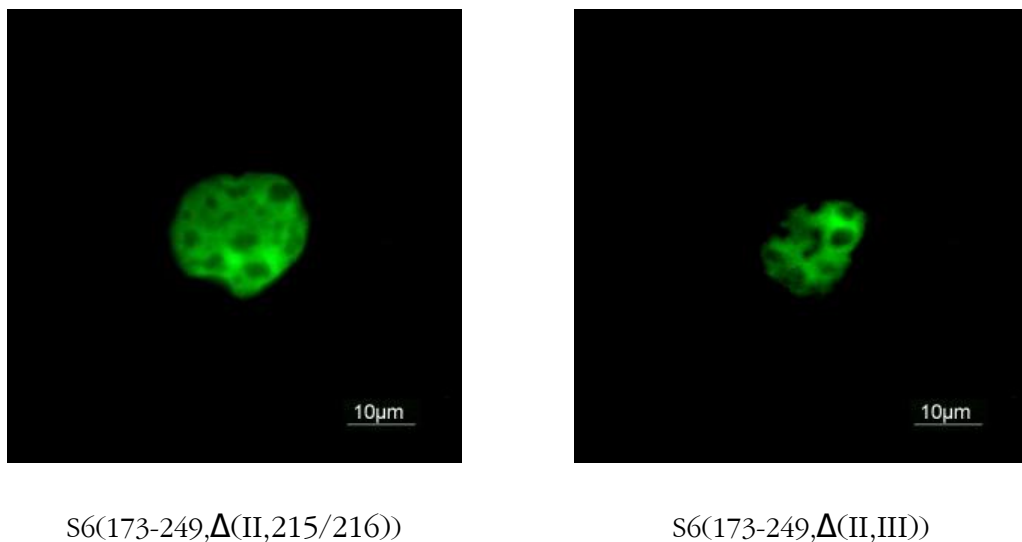


Abbildung 29: Abhängigkeit der C-terminalen NuBiS II von NLS II. Die Konstrukte S6(173-249, Δ (II,215/216)) (oben) und S6(173-249, Δ (II,III)) (unten) lokalisieren im Kern. Die Nucleoli werden ausgespart.

Das heterologe SV40-NLS führt zu einer ausgeprägten Kernlokalisierung der beiden Konstrukte, die Nucleoli blieben allerdings deutlich ausgespart. Dies belegt, dass das Tetrapeptid KRRR für die Funktion der Nucleolus-Bindenden-Sequenz essentiell ist.

4.2.7 Vergleich der Nucleolaren Bindungssequenzen der S6-Proteine

Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass das humane ribosomale Protein hrpS6 zwei voneinander unabhängige Nucleolare Bindungssequenzen aufweist.

Die N-terminal gelegene NuBiS I konnte auf eine Sequenz von 27 Aminosäuren reduziert werden, die sich von Aminosäure Arg72 bis Aminosäure Arg98 erstreckt. Sie besitzt kein eigenes Kernsignal und ihre Funktion ist unabhängig von der Position des zur Untersuchung eingebrachten Kernsignals.

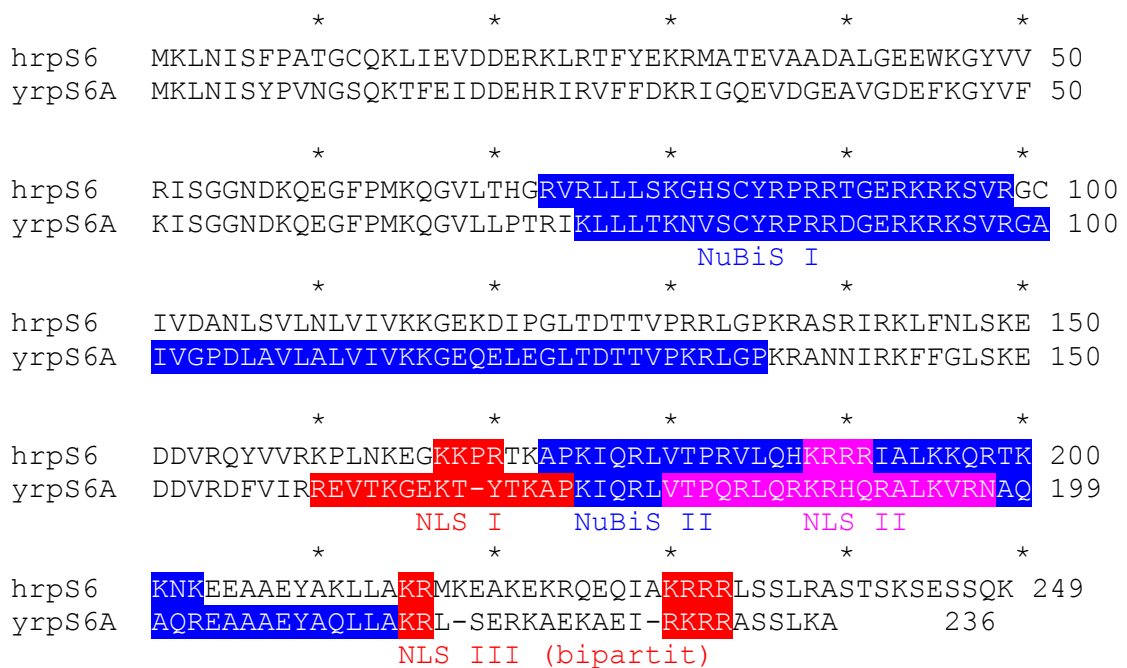


Abbildung 30: Übersicht der Kernlokalisierungssignale (rot) und Nucleolaren Bindungssequenzen (blau) bei hrpS6 und yrpS6A

Die C-terminal gelegene NuBiS II konnte auf eine Sequenz von 31 Aminosäuren eingegrenzt werden, die von Aminosäure Ala173 bis Aminosäure Lys203 reicht. Das Tetrapeptid KRRR im Aminosäurebereich 188 – 191 bildet dabei das zweite Kernsignal des hrpS6 und ist essentiell für die Funktion der NuBiS II. Ob seine Eigenschaft als Kernlokalisierungssignal, also als Bindungspartner für Kernimportfaktoren, die Bindung an die Nucleoli beeinflusst, oder die Deletion dieser vier Aminosäuren die strukturelle Integrität der NuBiS II schädigt, wird zu einem späteren Zeitpunkt diskutiert.

4.3 Generelle Abhängigkeit von Nucleolaren Bindungssequenzen und Kernlokalisationsignalen

Die Untersuchungen zu den beiden Nucleolaren Bindungssequenzen des humanen ribosomalen Proteins S6 haben gezeigt, dass beide unabhängig voneinander funktionieren.

Durch die Kopplung an die β -Galaktosidase konnte die Funktion der NuBiS nur in Anwesenheit eines Kernlokalisations-signalen untersucht werden. Die β -Galaktosidase, mit einem Molekulargewicht der Monomere von etwa 116kDa, bildet in der Zelle Tetramere und kann somit aufgrund ihrer Größe die Kernmembran nicht mittels passiver Diffusion durch die Kernporen passieren.

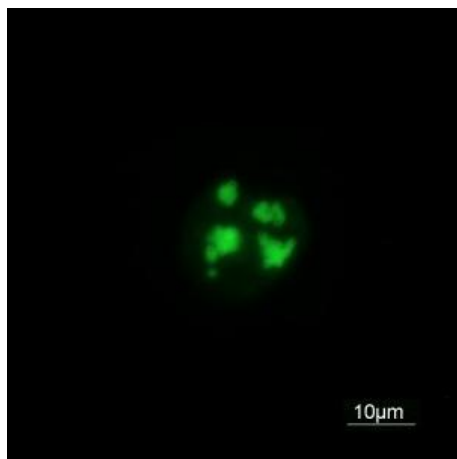
Anders verhält sich in dieser Hinsicht das Reporterprotein EGFP, das grün fluoreszierende Protein. Aufgrund seiner Größe von etwa 27kDa (Prasher *et al.*, 1992), ist es durchaus in der Lage, ohne NLS in den Zellkern hinein zu diffundieren. Dies wird bei Transfektion des nativen pEGFP-C1-Vektors in COS-Zellen sichtbar.

Diese Eigenschaft kann man sich zu Nutze machen, indem man an das EGFP Proteine oder Proteinfragmente koppelt, ohne dabei die passive Diffusionsgrenze der Kernporen von etwa 60kDa zu überschreiten.

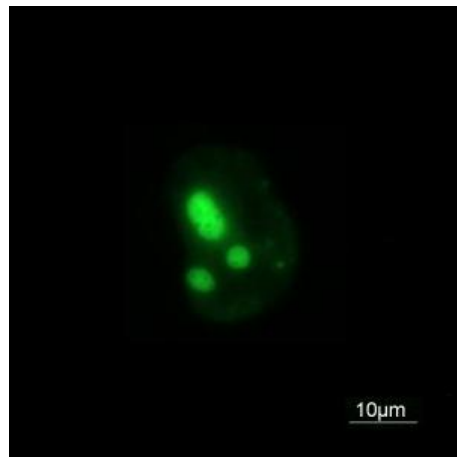
Daher wurden unterschiedliche hrpS6 sowie hrpS6-Deletionskonstrukte, denen Kernlokalisations-signale fehlen, in den pEGFP-C1 Vektor kloniert und in COS-Zellen über 36 bzw. 48 Stunden exprimiert (auf S.).

Erwartungsgemäß lokalisiert EGFP-S6 in den Nucleoli. Durch die drei Kernsignale wird das S6-Fusionsprotein quantitativ in den Kern importiert und kann dann in den Nucleoli mittels der beiden Nucleolaren Bindungssequenzen akkumulieren. Vorherige Experimente zeigten, dass das EGFP den Einbau des hrpS6 in die 40S-Untereinheit verhindert (Kruppa, persönliche Mitteilung).

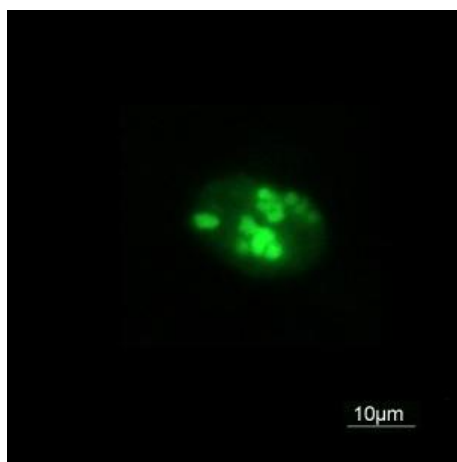
Dem Konstrukt EGFP-S6(3-249, Δ (I,II)) fehlen die ersten beiden Kernsignale, dadurch wird die C-terminale NuBiS II zerstört. Durch das intakte NLS III wird das Fusionsprotein in den Zellkern transportiert und akkumuliert in den Nucleoli.



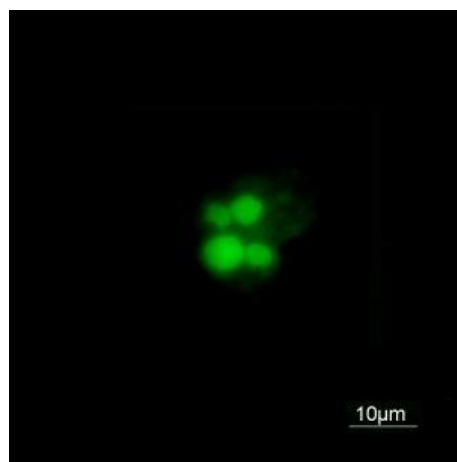
GFP-S6(3-249)



GFP-S6(3-249, $\Delta(I,II)$)



GFP-S6(3-249, $\Delta(I,II,215/216)$)



GFP-S6(3-249, $\Delta(I,II,III)$)

Abbildung 31: Unabhängigkeit der Nucleolaren Bindungssequenzen von den Kernsignalen: Deletiert man zwei oder sogar alle drei Kernsignale des hrpS6, so kann man das GFP-Fusionsprotein eindeutig am Nucleolus detektieren.

Zerstört man das dritte Kernsignal vollständig ($\Delta(I,II,III)$) so besitzt das Fusionsprotein kein funktionierendes Kernimportsignal mehr. Dennoch akkumulieren die Fusionsproteine eindeutig in den Nucleoli. Dies beruht zunächst auf dem beschriebenen Phänomen der passiven Diffusion. Dabei befinden sich die im Cytoplasma und die im Nucleoplasma gelösten Proteine in einem Fließgleichgewicht. Im hier vorliegenden Fall sind aber keine EGFP-Fusionsproteine im Cytoplasma zu finden, auch der Anteil an im Nucleoplasma befindlichen Fusionsproteinen ist gering. Es ist sehr wahrscheinlich, dass das exprimierte Protein nach und nach in den Nucleoli bindet und dadurch das Gleichgewicht der ungebundenen Proteine zu Gunsten der nuklearen

Lokalisation verschiebt.

Diese Ergebnisse zeigen zum ersten Mal, dass ribosomale Proteine, die kein Kernsignal tragen und somit kein Substrat für die Importin-abhängige Kernimportmaschinerie bilden, im Nucleolus binden können. Auch wenn NLS und NuBiS in Proteinsequenzen durchaus überlappen können, so bilden sie die Grundlage für zwei von einander funktionell getrennte Mechanismen: In einem ersten Schritt werden die Proteine über den Kernimport-Mechanismus ins Nucleoplasma transportiert, darauf folgt in einem unabhängigen, vermittelten oder unvermittelten Prozess die Bindung in den Nucleoli.

Fasst man die bisherigen Erkenntnisse über Kernsignale und Nucleolare Bindungssequenzen zusammen, so kann man feststellen:

- hrpS6 besitzt drei von einander unabhängige Kernsignale: NLS I, NLS II und NLS III (Schmidt *et al.*, 1995)
- hrpS6 besitzt zwei von einander unabhängige Nucleolare Bindungssequenzen: NuBiS I und NuBiS II
- die nucleolare Akkumulation des gesamten hrpS6 funktioniert auch gänzlich ohne Kernsignale
- die NuBiS I besitzt kein eigenes Kernsignal
- die NuBiS II funktioniert nur, wenn das Tetrapeptid KRRR, das dem NLS II entspricht, enthalten ist.

4.4 Substitution des humanen rpS6 durch das homologe yrpS6A aus der Hefe

Die ribosomale S6-Proteinfamilie ist innerhalb der Eukaryonten stark konserviert, bei den Prokaryonten ist das S6-Protein nicht vorhanden. Diese Arbeit konnte belegen, dass sowohl Kernimportsignale wie auch Nucleolare Bindungssequenzen seit über einer Milliarde Jahren, als sich die späteren Primaten von den Hefen evolutionär differenzierten, konserviert blieben. Im S6-Protein entstanden während der Evolution drei zusätzliche Phosphorylierungsstellen am C-Terminus, welche die bereits existenten und somit konservierten zwei Phosphorylierungsstellen in der Hefe ergänzten.

Die Arbeit von Hahn (1994) belegte die Möglichkeit, das yrpS6A der Hefe partiell durch sein menschliches Homolog zu substituieren, wobei translationsaktive Ribosomen entstanden. Offenbar wurden die ribosomalen Bindungssequenzen auf der 18S rRNA der Hefe von dem humanen S6-Protein erkannt.

Auf dieser Arbeit aufbauend, sollen später Versuche zum umgekehrten Sachverhalt durchgeführt werden: Gelingt die Expression des yrpS6A in humanen Zellen? Ist das exprimierte yrpS6A-Protein in der Lage, das endogene humane hrpS6 in seiner Funktion zu ersetzen? Sind die Bindungssequenzen auf der humanen 18S rRNA erhalten geblieben?

An dieser Stelle wurden daher erste Vorversuche durchgeführt, welche die prinzipielle Möglichkeit zur heterologen Expression von yrpS6A in menschlichen Zellen nachweisen sollten. Desweiteren sollte überprüft werden, ob das exprimierte Protein in der Immuncytologie und im Western-Blot detektiert und identifiziert werden kann.

Dazu wurde, wie bereits beschrieben, die cDNA von yrpS6A in den pcDNA5FRT/TO-Vektor kloniert. Die erhaltenen Plasmide wurden in eukaryontischen Zellen transfiziert und das exprimierte Protein immuncytologisch und im Western-Blot nachgewiesen.

Die verschiedenen in diesem Teil der Arbeit verwendeten Konstrukte wurden in einem Vorversuch in HEK-, COS- und HeLa-Zellen transfiziert. Die Zellen wurde 48 Stunden inkubiert, geerntet und die gesammelten Zelllysate in der SDS-PAGE aufgetrennt.

Dabei wurde deutlich, dass nur Konstrukte mit einer vollständigen Kozaksequenz nachweisbare Proteinnengen exprimierten. Zudem konnten yrpS6A und yrpS6A-HCT ausschließlich in COS-Zellen nachgewiesen werden und auch dies nur in geringer Menge.

Folgende Versuche fanden daher ausschließlich, wenn nicht anders erwähnt, in COS-Zellen statt.

4.4.1 Expression und Detektion von yrpS6A

Das Hefe rps6A wurde in COS-Zellen exprimiert und sowohl immuncytologisch wie auch im Western-Blot nachgewiesen. Dadurch gelang es sowohl die

intrazelluläre Lokalisation des yrpS6A als auch den Einbau in die 40S-Untereinheit festzustellen.

4.4.1.1 Detektion von yrpS6A in der Immunfluoreszenz

YrpS6A wurde mittels der Transfektion mit pcDNA5FRT/TO-yrpS6A in COS-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden 48 Stunden inkubiert, auf dem Objektträger fixiert und yrpS6A mit einem affinitätsgereinigten S6A-Antikörper (2415, 1:100) und folgend mit einem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper (Alexa488-Anti-Rabbit, 1:500) immunocytoologisch detektiert.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 32 zeigen eine ausgeprägte nucleolare Fluoreszenz, die auf eine vollständige Akkumulation von yrpS6A in den Nucleoli der COS-Zellen schließen lässt.

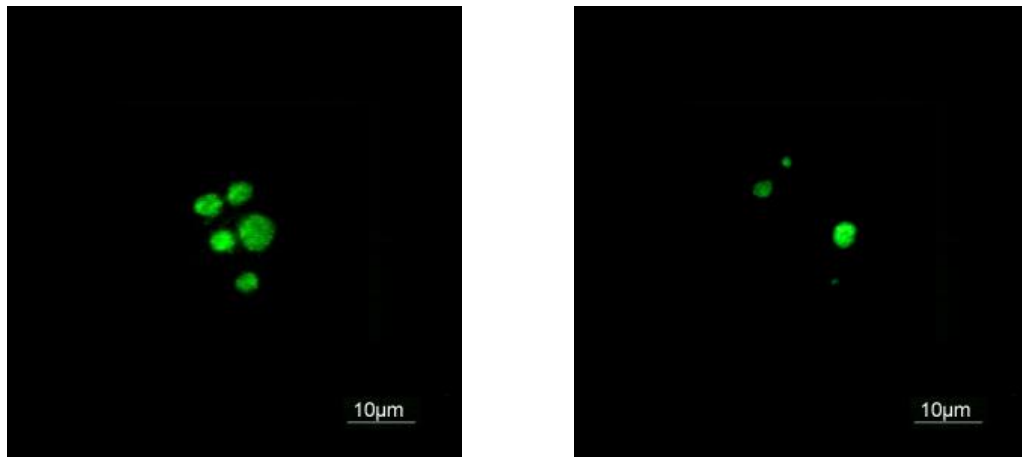


Abbildung 32: Nucleolare Lokalisation von yrpS6A (links) und yrpS6A- β -Galaktosidase (rechts, Lipsius *et al.*, 2005) in COS-Zellen. Unterschiede in der Fluoreszenzintensität resultieren aus der Verwendung von zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen, Alexa-488 beim yrpS6A, FITC bei der yrpS6A- β -Galaktosidase

Aufgrund seiner bereits beschriebenen Merkmale (Lipsius *et al.*, 2005) war zu erwarten, dass yrpS6A aktiv in den Kern importiert wird und dann in den Nucleoli, dem Syntheseort der Ribosomen, akkumuliert. Es wurde angenommen, dass eine weitere Prozessierung des yrpS6A und sein Einbau in die ribosomale 40S-Untereinheit stattfinden würde, da die strukturelle Ähnlichkeit zu hrpS6 sehr ausgeprägt ist..

Der Vergleich mit der Lokalisation von yrpS6A- β -Galaktosidase-Fusionsproteinen, zeigt keine Unterschiede in der Fluoreszenzverteilung innerhalb der Zelle. Da

aufgrund der bereits erwähnten Tetramerisierung der β -Galaktosidase das yrpS6A- β -Galaktosidase-Fusionsprotein nicht in die 40S-Untereinheit eingebaut wird, scheint eine Integration von nativem yrpS6A in die 40S ribosomale Untereinheit demnach nicht statt zu finden.

Um diese cytologische Beobachtung zu überprüfen, wurde die Verteilung von yrpS6A in den verschiedenen Zellfraktionen durch Western-Blot verifiziert.

4.4.1.2 Detektion von yrpS6A in Zellfraktionen

Mittels Detergenz wurden Cytoplasma und Kerne der yrpS6A exprimierenden Zellen voneinander getrennt. Die Risiken einer Kontamination der Kernfraktion mit endoplasmatischem Retikulum wurde durch zusätzliche Detergenz-Waschschritte minimiert. Aus dem Cytoplasma wurden die Ribosomen durch ein Sucrosekissen sedimentiert. Die unterschiedlichen erhaltenen Fraktionen wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und yrpS6A mittels Antikörper (Anti-yrpS6A, 2415, aufgereinigt, 1:500) detektiert.

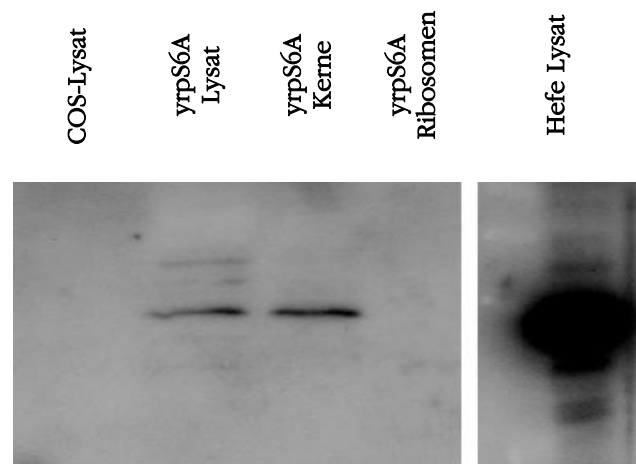


Abbildung 33: Verteilung von yrpS6A in den gesammelten Fraktion transfizierter COS-Zellen. yrpS6A kann im Gesamtzelllysat sowie im Kernextrakt transfizierter COS-Zellen detektiert werden. Die sedimentierten Ribosomen weisen kein yrpS6A auf. Es wurde in jeder Spur die Proteinmenge aus 100.000 Zellen aufgetragen.

Der Western-Blot zeigt, dass das native yrpS6A der Hefe in COS-Zellen exprimiert und quantitativ in den Kern importiert wird. Die Immunfluoreszenz belegt sogar,

dass yrpS6A an die Nucleoli bindet, was aufgrund der bisherigen Ergebnisse zu erwarten war. Lipsius (Lipsius *et al.* 2005) konnte bereits zeigen, dass an β -Galaktosidase gekoppeltes yrpS6A in COS-Zellen in den Nucleoli akkumuliert, jedoch aufgrund der β -Galaktosidase nicht in die 40S-Untereinheiten integriert wird.

Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass nicht an ein Reporterprotein fusioniertes yrpS6A in den Nucleoli verbleibt. yrpS6A kann weder im Western-Blot in der ribosomalen Fraktion nachgewiesen werden, noch wird in der Immuncytologie yrpS6A im Cytoplasma detektiert.

Um die Bedeutung des dem yrpS6a fehlenden C-Terminus des hrpS6 in der Biogenese der 40S-Untereinheit zu untersuchen, wurde das Konstrukt yrpS6A-HCT kloniert, in dem der phosphorylierbare C-terminale Bereich des humanen hrpS6A am Ende des yrpS6A kodiert ist. HCT steht dabei für humaner C-Terminus. Die Expression dieses Konstruktes ist folgend beschrieben.

4.4.2 Expression und Detektion des c-terminal verlängerten yrpS6A

Die Untersuchung zur Expression von yrpS6A-HCT erfolgte analog zur Analyse von yrpS6A.

4.4.2.1 Detektion von yrpS6A-HCT in der Immunfluoreszenz

Auf Objektträgern ausgesäte COS-Zellen wurden mit pcDNA5FRT/TO-yrpS6A-HCT transfiziert und 48 Stunden inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen fixiert und yrpS6A mit einem affinitätsgereinigten S6A-Antikörper (Tier 2415, 1:100) und anschließend mit einem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper (Alexa488-Anti-Rabbit, 1:500) immuncytologisch detektiert.

YrpS6A-HCT zeigt eine ausgeprägte nucleolare sowie eine deutliche cytoplasmatische Fluoreszenz in den COS-Zellen (Abbildung 34 auf S.95). Ähnliche Lokalisationen kann man beobachten, wenn man hrpS6 immuncytologisch nachweist oder S16-EGFP exprimiert. Die cytoplasmatischen Signale von hrpS6 und S16-EGFP stammen von 40S- oder 80S-Ribosomen (Bisotti, 2002), das heißt die Proteine sind integrale Bestandteile von ribosomalen Partikeln.

Die Detektion von hrpS6 zeigt, dass es vornehmlich im Cytoplasma lokalisiert. Nucleoli treten nur schwach in der Immunfluoreszenz auf, da hrpS6 sehr schnell in die 40S-Untereinheit integriert wird und hrpS6 daher am Nucleolus nur schwer detektierbar ist.

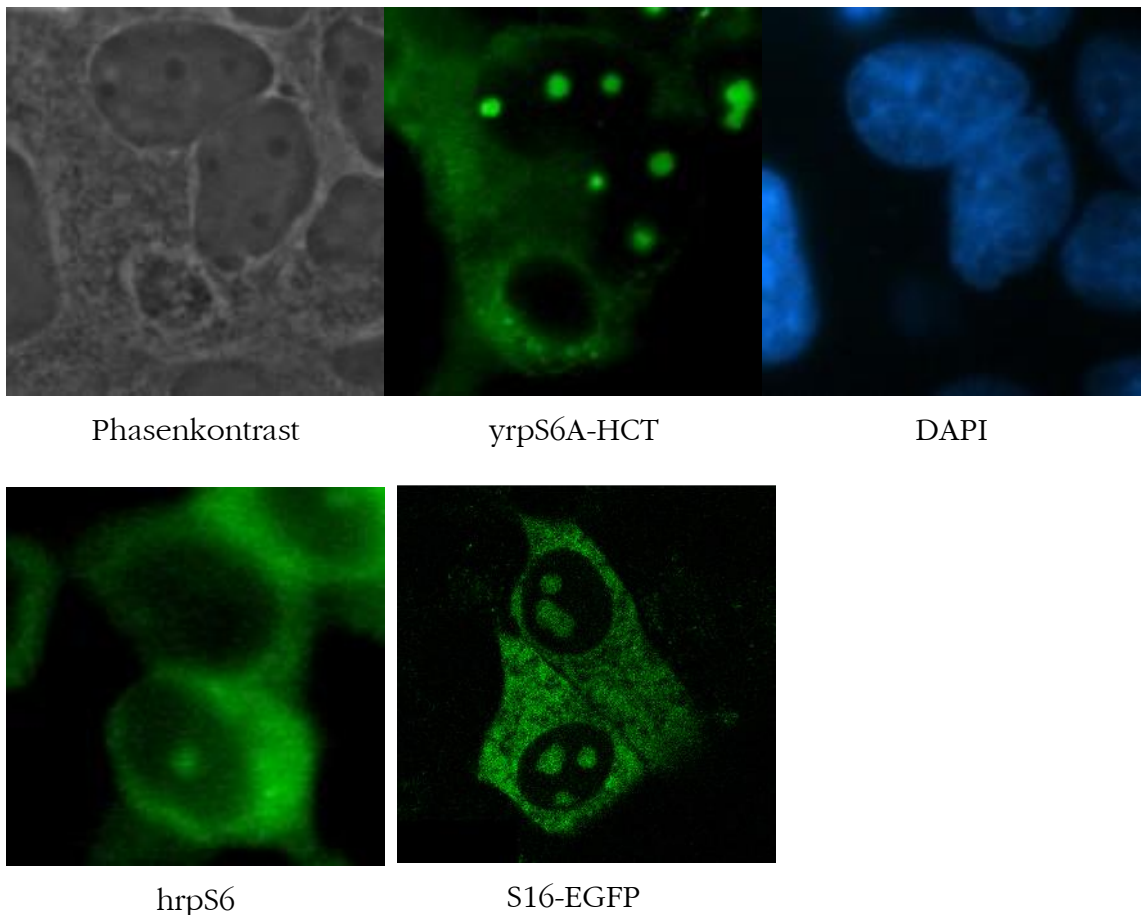


Abbildung 34: Lokalisation von yrpS6A-HCT, hrpS6 und S16-EGFP. YrpS6-HCT lokalisiert im Cytoplasma sowie in den Nucleoli der COS-Zellen. HrpS6 (detektiert mit S6-Antikörper, Tier 2414, 1:100) ist vorwiegend im Cytoplasma, vereinzelt auch in den Nucleoli detektierbar. Die Fluoreszenz von S16-EGFP tritt gleichmäßig im Cytoplasma und den Nucleoli auf (Bisotti, 2002).

Die Expression von S16-EGFP, welches analog zum yrpS6A-HCT ebenfalls ein zum endogenen Protein konkurrierendes Protein darstellt, führt zu einer gleichmäßigen Fluoreszenz in den Nucleoli und im Cytoplasma.

Durch seine starke Expression unter der Kontrolle des CMV-Promoters kommt es zu einer sichtbaren Akkumulation von S16-EGFP in den Nucleoli. Trotz der Fusion an EGFP wird S16-EGFP in die 40S-Untereinheit integriert und kann an

der Translation teilnehmen.

S16-EGFP und yrpS6A-HCT zeigen sehr ähnliche Lokalisationen, sodass man einen Einbau von yrpS6A-HCT in die humane 40S-Untereinheit postulieren kann. Um dies zu bestätigen, wurden aus transfizierten Zellen Ribosomen isoliert, um im Western-Blot yrpS6A-HCT nachzuweisen.

4.4.2.2 Detektion von yrpS6A-HCT in Zellfraktionen

Die mit yrpS6A-HCT transfizierten Zellen wurden mittels Detergenz lysiert. Aus der cytoplasmatischen Fraktion wurden die Ribosomen durch ein Sucrosekissen sedimentiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und yrpS6A-HCT wurde im Western-Blot mittels Antikörper (Anti-S6A, 2415, affinitätsgereinigt, 1:500) detektiert (s. Abbildung 35).

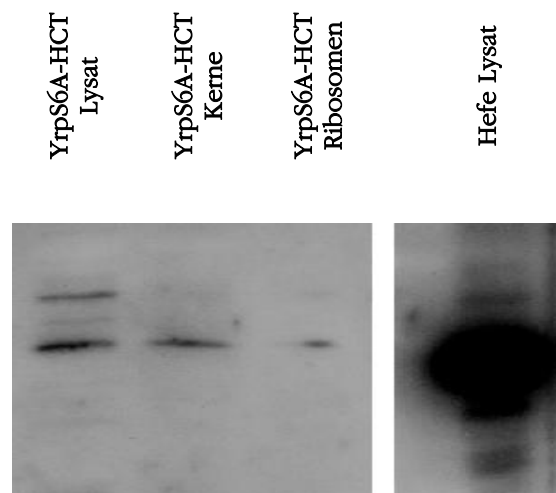


Abbildung 35: Verteilung von yrpS6A-HCT in den gesammelten Fraktionen transfizierter COS-Zellen. yrpS6A-HCT kann wie yrpS6A im Gesamtzelllysate sowie im Kernextrakt detektiert werden. Zudem weisen die sedimentierten Ribosomen ebenfalls ein schwaches Signal auf. Es wurde in jeder Spur die Proteinmenge aus 150.000 Zellen aufgetragen.

YrpS6A-HCT zeigt in diesem Versuch eine schwache Expression, die aber ausreichend ist, um das Protein sowohl im Kern wie auch in den Ribosomen nachzuweisen.

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass heterologe ribosomale Proteine bei dieser Isolierungsmethode mit den Ribosomen

kosedimentieren können, da sie womöglich aufgrund ihrer Basizität unspezifisch an der ribosomalen RNA haften bleiben, dabei allerdings nicht als Bestandteil der ribosomalen Untereinheit angesehen werden können. Als Kriterium für ribosomale Proteine gilt in der Literatur die hochsalzresistente Bindung an die ribosomale Untereinheit.

4.1.1.1 Detektion von yrpS6A-HCT in hochsalzgewaschenen 40S-Untereinheiten

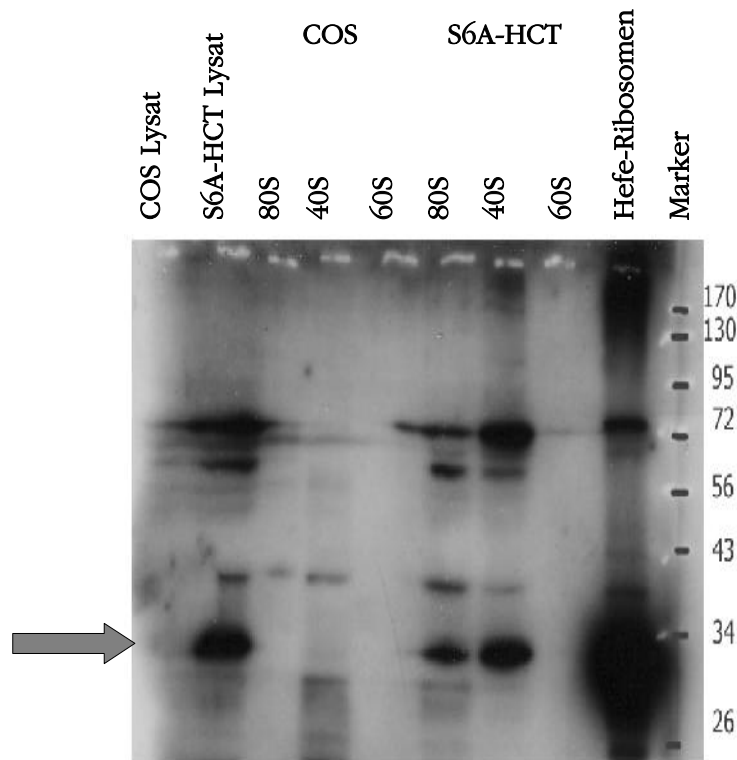


Abbildung 36: Detektion von yrpS6A-HCT nach dem Puromycinrelease mit einem Anti-S6A-Antikörper. yrpS6A-HCT wird sowohl im Gesamtzelllysate wie auch in den 40S- und 80S-ribosomalen Einheiten detektiert. Es wurden in allen Spuren äquivalente Proteinmengen aufgetragen.

Um festzustellen, ob das in der ribosomalen Fraktion detektierte yrpS6A-HCT ein fester Bestandteil der 40S-Untereinheit bildet oder lediglich kosedimentiert, wurden COS-Zellen erneut mit dem yrpS6A-HCT-Plasmid transfiziert und die Ribosomen aus diesen Zellen sedimentiert. Diese wurden dann bei 500 mM KCl mit Puromycin inkubiert und in den dissoziierten 40S- und 60S- Untereinheiten wurde mit einem S6A-Antikörper (Tier 2415, Serum 1:1000) das yrpS6A-HCT

nachgewiesen (Abbildung 36).

Der Blot bestätigt die zuvor erhaltenen Daten: yrpS6A-HCT wird sowohl in den 80S-Ribosomen, wie auch in den hochsalzgewaschenen 40S-Untereinheiten detektiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass nach Ergänzung des humanen C-Terminus yrpS6A in die humanen Ribosomen eingebaut wird.

Der folgende Versuch sollte nun klären, inwiefern yrpS6A-HCT-Ribosomen aktiv an der Translation beteiligt sind.

4.4.2.3 Detektion von yrpS6A-HCT in aufgereinigten Polysomen

Um die Beteiligung von yrpS6A-HCT-Ribosomen an der Translation zu überprüfen, wurden aus transfizierten COS-Zellen, die Polysomen aufgearbeitet. Sie entsprechen den Ribosomen, die gerade durch Bindung der mRNA translatieren und bilden so das Gegenstück zu den 80S-Ribosomen.

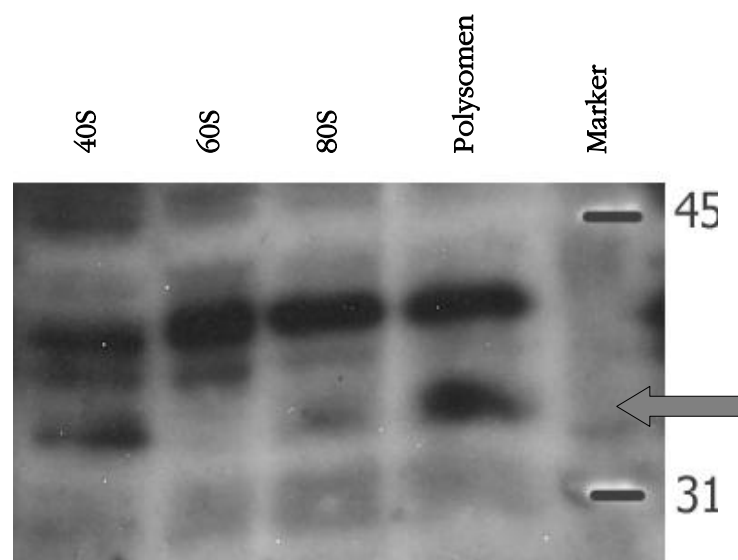


Abbildung 37: Detektion von yrpS6A-HCT in den verschiedenen Fraktionen des Polysomenprofils: yrpS6A-HCT wird erneut in den 40S- wie auch in den 80S-Partikeln detektiert, zudem weisen auch die Polysomen ein starkes Signal auf.

Dazu wurde die cytoplasmatische Fraktion der mit pcDNA5FRT/TO-yrpS6A-HCT transfizierten Zellen auf einem Dichtegradienten getrennt. Durch photometrische Bestimmung wurden die einzelnen Fraktionen (40S, 60S, 80S und Polysomen) im erhaltenen Profil identifiziert und getrennt gesammelt. Die Fraktionen wurden mit Trichloressigsäure gefällt, mit Aceton gewaschen und in Gelprobenpuffer

aufgenommen.

Die Fraktionen wurden dann in der SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde geblottet und yrpS6A-HCT detektiert.

Dieser Blot zeigt Signale von yrpS6A-HCT in der 40S-Fraktion und der Polysomenfraktion, die sich deutlich vom sehr starken Hintergrund abheben. In der 80S-Fraktion kann yrpS6A-HCT ebenfalls detektiert werden, auch wenn das Signal relativ schwach ist. Das Auftreten der yrpS6A-HCT Bande deutet darauf hin, dass Ribosomen, in denen hrpS6 durch yrpS6A-HCT ersetzt wurde, an der Translation teilnehmen.

Untersuchungen zur Phosphorylierung von yrpS6A-HCT konnte nicht durchgeführt werden, da sich im Western-Blot mit spezifischen Phospho-Antikörpern, yrpS6A-HCT nicht von endogenem hrpS6 unterscheiden ließ.

5 Diskussion

5.1 Die multiplen Kernsignale des hrpS6 und des yrpS6A

Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass sowohl das humane ribosomale Protein hrpS6, wie auch sein Homolog aus der Hefe, das ribosomale Protein yrpS6A, drei voneinander unabhängige Kernsignale besitzen (Schmidt *et al.*, 1995; Lipsius *et al.*, 2005).

Bei vielen eukaryontischen Proteinen sind die Kernimportsignale inzwischen bekannt, es wurde eine Vielzahl an Proteinen identifiziert, deren Kernimport durch mehrere Kernimportsignale gewährleistet wird. So besitzt zum Beispiel der murine Transkriptionsfaktor mElf3 vier NLS (Do *et al.*, 2006), beim p53-Protein sind drei NLS identifiziert worden (Shaulsky *et al.*, 1990) und Proteine mit zwei NLS wurden ebenfalls früh beschrieben (Garcia-Bustos *et al.*, 1991).

Die vorliegenden Ergebnisse haben gezeigt, dass die nucleolare Akkumulation des hrpS6 auch ohne vorhandene Kernsignale funktioniert. Das hrpS6, wie die meisten ribosomalen Proteine, ist mit seinen 30kDa wesentlich kleiner als die theoretische Ausschlussgrenze der Kernpore, die bei etwa 40 bis 60 kDa liegt (Pante *et al.*, 1996b).

In diesem Kontext drängt sich die Frage auf, warum die Proteine der S6-Familie sowohl im Menschen wie auch in der Hefe gleich drei Kernsignale besitzen, die während der Evolution über eine Milliarde Jahre konserviert blieben. Dies spricht für einen bedeutenden Vorteil, den die Zelle aus dem durch die Verwendung eines Kernimportsignales ermöglichten aktiven Kernimport, zieht. Der Vorteil des aktiven Transports würde bereits einen hohen evolutionären Selektionsdruck auf ein Kernsignal ausüben, warum also drei Kernsignale?

Zum einen werden im Cytosol befindliche ribosomale Proteine sehr schnell degradiert (Tsay *et al.*, 1988); ein aktiver, direkt auf die Translation folgender Kernimport, verhindert also den Verlust von neu synthetisierten S6. Da die gesamte Ribosomenbiogenese in der Hefezelle etwa 30% der gespeicherten Energie verbraucht (Warner, 1999), scheint dies ein vernünftiger und einfacher Mechanismus zu sein, um unnötige und energieverbrauchende Schritte zu

vermeiden.

Die Anwesenheit von insgesamt drei Kernsignalen erscheint jedoch weiterhin verwunderlich. Mehrere Erklärungen scheinen plausibel.

Schon früh konnte eine Beziehung zwischen der Anzahl der NLS-Sequenzen pro Trägerprotein und der Transportgeschwindigkeit des Proteins durch die Kernpore festgestellt werden (Dworetzky *et al.*, 1988). Die Transportrate des Trägerproteins durch die Kernpore erhöhte sich um den Faktor acht, wenn die Anzahl der an dieses gekoppelten NLS-Peptide von zwei auf sechs gesteigert wurde (Lanford *et al.*, 1986). In der Zelle bedeutet dies, dass das zu importierende Protein durch Bindung an mehrere Importin-Proteine besser mit den Nucleoporinen, den Proteinen der Kernpore, interagieren und diese somit schneller passieren kann. Dass hrpS6 und yrpS6A drei Kernsignale besitzen, würde in diesem Kontext bedeuten, dass diese Proteine dadurch noch schneller in den Kern importiert werden könnten und für den Zusammenbau der kleinen ribosomalen Untereinheit zur Verfügung stünden. Es erscheint allerdings schwer vorstellbar, dass der Nutzen einer erhöhten Kerntranslokationsrate einen derartigen evolutionären Druck auf die S6-Proteinfamilie ausüben konnte.

Es wäre denkbar, dass diese drei Kernsignale unter unterschiedlichen Bedingungen funktionieren. Verschiedene Möglichkeiten können dabei diskutiert werden.

Das NLS III (230-233) liegt genau vor den ersten Phosphorylierungsstellen Ser235 und Ser236, die Phosphorylierungsstellen Ser240, Ser244 und Ser247 folgen dicht. Eine Veränderung des Phosphorylierungsmusters kann dabei die Erkennung des NLS III durch den Kernimportfaktor beeinflussen. Dies wurde bereits bei mehreren Proteinen beschrieben: Die Affinität des Importin α/β 1-Komplexes zu den Kernimportsignalen des SV40-großen T-Antigens sowie des Dorsal-Proteins von *Drosophila* wird durch Phosphorylierung um den Faktor 100 erhöht (Briggs *et al.*, 1998; Hubner *et al.*, 1997). Fehlen die Phosphorylierungsstellen, so akkumulieren die Proteine etwa 50 mal langsamer im Kern (Xiao *et al.*, 1998).

Substratphosphorylierung kann aber auch zu einem verminderten Kernimport führen. Bei Phosphatmangel in der Zelle wird der ansonsten cytoplasmatische Transkriptionsfaktor TF Pho4 dephosphoryliert und in den Kern importiert. Dort können dann spezifische Gene transkribiert werden (Hood *et al.*, 1999).

Kann dieses Modell einer bewussten Kontrolle des Kernimportes durch Phosphorylierung auch auf hrpS6 und sein NLS III übertragen werden? Da das hrpS6 drei unabhängige Kernsignale besitzt, aber nur eins durch die Phosphorylierung kontrollierbar scheint, kann dies nur schwer nachvollzogen werden. Die Anwesenheit mehrerer Kernsignale deutet darauf hin, dass ihre Entstehung der ungewollten Blockierung des NLS III durch Phosphorylierung entgegenwirken soll. Eine eventuelle, durch Wachstumsbedingungen erforderliche, posttranslationale Phosphorylierung von S6, ein Mechanismus, der sich erst später entwickelte, könnte in diesem Modell zu einem verminderten Kernimport führen. Um einen ebenso effizienten Kernimport zu gewährleisten, entstanden dann weitere Kernsignale.

Aus der Literatur lassen sich weitere Modelle ableiten. Die Mechanismen des Kernimports können durch weitere Faktoren kontrolliert oder gestört werden. So wird der Kernimport der p65-Untereinheit von NF- κ B mittels Maskieren des NLS durch das Protein I- κ B verhindert (Huxford *et al.*, 1998).

Für das hrpS6 sind mehrere Bindungspartner identifiziert worden.

Der in diesem Zusammenhang am besten beschriebene Ligand des hrpS6 ist die p70-S6-Kinase; in der Hefe kommt sie nicht vor. In diesem Kontext spielt sie jedoch wohl keine Rolle, man geht davon aus, dass die p70-S6-Kinase kein freies hrpS6 phosphoryliert. Dies spiegelt sich insbesondere im Verhältnis der Substrataffinität dieser Kinase zur 40S-Untereinheit im Vergleich zu S6-Peptiden wieder. Die p70-S6-Kinase erkennt das hrpS6 an einer C-terminalen Domäne, die mit dem zweiten Teil des NLS III beginnt. Die Deletion des NLS III führt zum Verlust der Bindungseigenschaften von hrpS6 und der Kinase (Flotow *et al.*, 1992). Es ist also durchaus vorstellbar, dass die Sequenz des NLS III im Menschen aufgrund seiner Relevanz für die Phosphorylierung und weniger für den Kernimport erhalten blieb.

Ein weiterer Bindungspartner des hrpS6 ist das Hitzeschockprotein Hsp90. Die Bindung von Hsp90 an hrpS6 verhindert die Ubiquitinylierung von hrpS6 und somit seine Degradation (Kim *et al.*, 2006). Die Bindungsdomäne von Hsp90 im hrpS6 ist bislang unbekannt, die Größe von Hsp90 (90kDa) lässt aber vermuten, dass wesentliche Teile des hrpS6 bei der Bindung verdeckt werden und die Erkennung von einem oder vielleicht mehreren der Kernimportsignale durch

Importin α erschwert wird.

Diese Modelle lassen keinen endgültigen Schluss zu, liefern jedoch eine gemeinsame Erkenntnis: Drei Kernsignale, die wie beim hrpS6 und dem yrpS6A über das Protein und somit wohl auch im Raum verteilt sind, bieten den Importfaktoren mehrere Bindungsstellen um auf verschiedene Situationen – Phosphorylierung, Liganden – in der Zelle zu reagieren.

5.2 Die zwei Nucleolaren Bindungssequenzen des humanen hrpS6 und yrpS6A der Hefe

Bei den Proteinen der S6-Familie im Menschen und in der Hefe wurden nun insgesamt zwei konservierte Nucleolare Bindungssequenzen identifiziert (s. Ergebnisse und Schmidt *et al.*, 1995; Lipsius *et al.*, 2005).

Während die Mechanismen der Kerntranslokation ribosomaler Proteine intensiv beschrieben wurden (Jäkel *et al.*, 1998; Rout *et al.*, 1997), sind die Prozesse der nucleolaren Bindung noch weitgehend unbekannt. Sequentielle und strukturelle Anforderungen an die ribosomalen Proteine sind ebenso wenig einheitlich beschrieben wie eventuelle Transport- und Bindungsmechanismen (Melese *et al.*, 1995).

Erste Auswertungen des nucleolaren Proteoms lassen keine Sequenzen erkennen, die allen nucleolaren Proteinen gemein und für Ihre nucleolare Akkumulation verantwortlich wären. Alles deutet darauf hin, dass wohl eine Vielzahl verschiedener Mechanismen für die nucleolare Akkumulation dieser Proteine verantwortlich ist (Andersen *et al.*, 2002; Scherl *et al.*, 2002).

Die bisher veröffentlichten Untersuchungen an ribosomalen Proteinen lassen vermuten, dass ihre nucleolare Akkumulation durch die Bindung mehrerer Domänen innerhalb jedes ribosomalen Proteins an die ribosomale RNA bedingt ist (Melese *et al.*, 1995). Unterstützt wird diese Theorie durch die Aufklärung der Struktur der 30S-Untereinheit von *Thermus thermophilus*; dort konnten zahlreiche Protein-RNA-Interaktionen nachgewiesen werden (Brodersen *et al.*, 2002). Untersuchungen zu diesen Bindungen zeigten, dass es sich hierbei vornehmlich um Salzbindungen zwischen positiv geladenen Aminosäureseitenketten und negativ geladenen Sauerstoffatomen in der rRNA handelt, wobei die beteiligte

RNA meistens eine Helix-Struktur aufweist (Allers *et al.*, 2001).

Allerdings gehören hrpS6 und yrpS6A einer rein eukaryontischen Proteinfamilie an, es ist kein homologes Protein in prokaryontischen Organismen identifiziert worden. Daher lassen sich weder die genaue Position von S6 noch mögliche Bindungspartner in der 40S-Untereinheit direkt aus der Struktur der 30S-Untereinheit ableiten. Inwiefern interessante Ladungsverteilungen innerhalb der Nucleolaren Bindungssequenzen von hrpS6 und yrpS6A identifiziert werden können, wird später für jede NuBiS diskutiert.

Aufgrund der fehlenden strukturellen Daten ist ein Vergleich mit weiteren RNA-Bindungsmotiven sinnvoll. Es sind verschiedene RNA-Bindungsdomänen beschrieben worden: hnRNP-Proteine weisen häufig die so genannte repetitive RGG-Box auf. Dabei handelt es sich um fünf Wiederholungen der Sequenz Arg-Gly-Gly mit verschiedenen eingestreuten aromatischen Aminosäuren (Kiledjian *et al.*, 1992). Eine weitere für hnRNP-Proteine typische RNA-Bindungsdomäne ist das RNP-Motiv, das aus einem hochkonservierten viersträngigen β -Faltblatt besteht, das von zwei α -Helices flankiert wird (Haynes, 1992). Auch hier sollen die Nucleolaren Bindungssequenzen der S6-Familie mit bestehenden Literaturdaten später verglichen werden.

5.2.1 Die N-terminale NuBiS I

5.2.1.1 Sequenz, Konservierung

Die N-terminale NuBiS I des hrpS6 konnte auf den Aminosäurebereich Arg72 bis Arg98 eingegrenzt werden, entsprechend an β -Galaktosidase gekoppelte Fragmente lokalisierten eindeutig am Nucleolus, wiesen aber ebenfalls eine nucleare Lokalisation auf. In der folgenden Betrachtung, wird daher der Bereich zwischen Arg72 und Asp120 berücksichtigt, der ausschließlich am Nucleolus lokalisierte. Dies ist auch in Bezug auf die N-terminale NuBiS I des yrpS6A sinnvoll, die auf den Bereich Lys74 bis Pro135 eingegrenzt wurde.

Folgend sind die identifizierten Sequenzen der NuBiS I von hrpS6 und yrpS6A dargestellt, konservierte Aminosäuren sind rot, positiv geladene Aminosäuren (Arginin und Lysin) blau hervorgehoben (Abbildung 38).

Man erkennt deutlich, dass es sich hierbei um einen bei den beiden Proteinen

hochkonservierten Bereich handelt, der Konservierungsgrad liegt bei etwa 72% (PAM120-Matrix). Insbesondere die blau hervorgehobenen Arginin- und Lysinreste des hrpS6 können fast ausnahmslos im yrpS6A wiedergefunden werden. Einzige Ausnahme hierbei bilden hrpS6-Arg72 und Arg74, wobei letzteres im yrpS6A durch ein Lysin gewissermaßen ausgeglichen wird.

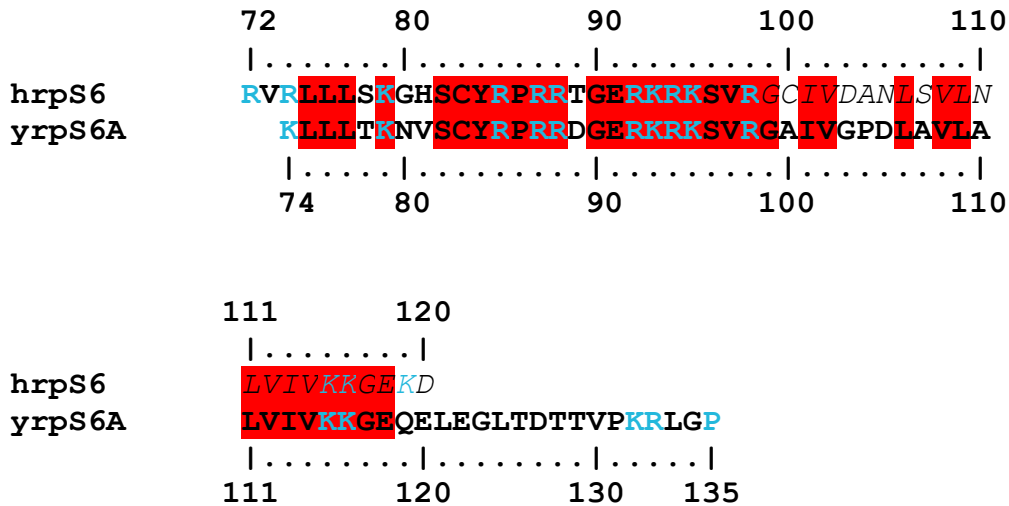


Abbildung 38:Sequenzen der N-terminalen NuBiS I von hrpS6 und yrpS6A; basische Aminosäuren sind blau dargestellt, konservierte Aminosäuren sind rot hinterlegt.

Erstaunlicherweise erscheint aber genau jenes Arg72-Val73-Arg74-Tripeptid für die Funktion der humanen NuBiS I als essentiell. Konstrukte, denen diese Sequenz fehlte, lokalisierten ausnahmslos im Nucleoplasma (s. Abbildung 31, Seite 89 und Kundu-Michalik, 1997). Dieser Bereich kann daher ohne Zweifel als Beginn der Minimalsequenz der humanen NuBiS I bezeichnet werden.

Die genaue Bestimmung des Endes der NuBiS I ist hingegen schwieriger. Vorausgegangene Arbeiten zur Untersuchung von Nucleolaren Bindungssequenzen haben gezeigt, dass die Funktion einer NuBiS meistens nicht mit einer spezifischen Aminosäure steht und fällt, die Verkürzung um jeweils eine Aminosäure einer NuBiS bedeutete eine schrittweise Verlagerung der Proteinlokalisierung vom Nucleolus zum Nucleoplasma.

Ähnliches kann man auch bei der humanen NuBiS beobachten. Das Konstrukt SV40-S6(72-120) lokalisiert ausnahmslos in den Nucleoli. Im Aminosäurebereich 103 bis 120 befinden sich aber kaum positive Ladungen, so dass man bei dem Konstrukt SV40-S6(72-102) weiterhin eine nucleolare Akkumulation erwarten

würde (s.u.). Tatsächlich lässt sich dieses Fusionsprotein im Nucleolus nachweisen, jedoch deutet die ebenfalls vorhandene Kernlokalisation auf eine abgeschwächte oder behinderte Affinität zum Bindungspartner am Nucleolus. Die schrittweise Verkürzung um jeweils vier Aminosäuren zeigte, dass die Bindung am Nucleolus für das Konstrukt SV40-S6(72-94) nicht mehr möglich ist. Die Sequenz zwischen den Argininen an den Positionen 72 und 98 kann daher als absolute Minimalsequenz betrachtet werden.

Die Tatsache, dass das Konstrukt SV40-S6(72-120) als einziges in der Lage ist, ausschließlich in den Nucleoli zu binden, erfordert eine grundlegende Diskussion zur Definition von Nucleolaren Bindungssequenzen, die zur Zeit in der Literatur noch nicht stattgefunden hat.

Welches sind die Gründe, die zur partiellen Lokalisation von SV40-S6(72-98) und SV40-S6(72-102) führen? Wenn essentielle Aminosäuren der NuBiS durch Kopplung an die β -Galaktosidase zum Teil verdeckt werden, sind diese nicht ausreichend exponiert und können von den Bindungspartnern nicht erkannt werden. Dies würde bedeuten, dass die Ergebnisse durch die angewandte Methode im geringen Umfang verfälscht werden. Das Konstrukt SV40-S6(72-120) würde unter diesen Umständen nur deshalb so eindeutig am Nucleolus lokalisieren, weil die zusätzlichen Aminosäuren als „Spacer“ (Abstandshalter) dem Fusionsprotein die notwendige Flexibilität geben.

Daher wird vorerst die Minimalsequenz der humanen NuBiS I des hrpS6 mit dem Aminosäurebereich 72 bis 98 angegeben, jedoch soll in der weiteren Diskussion der Bereich bis zu Asp120 mit berücksichtigt werden, um so mögliche Eigenschaften dieser Domäne besser beschreiben zu können.

Der hohe Grad der Konservierung der Sequenz der NuBiS I von hrpS6 und yrpS6A kann auf weitere Organismen ausgedehnt werden. Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht der der NuBiS I entsprechenden Sequenzen unterschiedlicher Organismen. Dabei wird deutlich, dass eine Vielzahl der Organismen einen weitaus höheren Konservierungsgrad in Bezug auf die humane NuBiS I zeigen, als dies bei *S. cerevisiae* festgestellt wurde.

Homo Sapiens	RV RLLLS K GHSCY R -- PRRT GE RKRK SVRGCIVDANLSVLNLVIV KK GEKD	
Gallus Gallus	RV RLLLS K GHSCY R -- PRRT GE RKRK SVRGCIVDANLSVLNLVIV KK GEKD	100%
F.rubripes	RV RLLLS K GHSCY R -- PRRT GE RKRK SVRGCIVDANLSVLNLVIV KK GEKD	100%
Xenopus	RV RLLLS K GHSCY R -- PRRT GE RKRK SVRGCIVDANLSVLNLVIV KK GEKD	98%
Catfish	RV RLLLS K GHSCY R -- PRRT GE RKRK SVRGCIVDANLSVLNLVIV IR GEKD	96%
Trout	RV RLLL A KGHSCY R -- PRRT GE RKRK SVRGCI G DANLSVLNLVIV IK GEKD	94%
Lancelet	RV RLLL G KGHSCY R -- PRRT GE RKRK SVRGCI V SNLSVLNLVIV IK GEQD	92%
Drosophila	RV RLLL K KGHSCY R -- PRRT GE RKRK SVRGCIVDAN M SVLALVIV IK GEKD	90%
Aedes	RV RLLL K KGHSCY R -- PRRT GE RKRK SVRGCI V Q N LSALALIV IK GEKD	88%
Yellowf. m.	RV RLLL K KGHSCY R -- PRRT GE RKRK SVRGCI V Q N LSALALIV IK GEKD	88%
Aplysia	RV RLLL D K N HSCY R -- PRRT GE RKRK SVRGCI V SNLSVL S LVIV IK GEQD	88%
Armyworm	RV RLLL M S K GHSCY R -- PRR DGE RKRK SVRGCIVDANLSVLALVIV IK GEQE	88%
C. elegans	RV RLLL K KG Q SCY R -- E R K N G E RKRK SVRGCIVDAN M SALS L VIV IK GDGE	78%
Asparagus	RV RLLL H R G T P C F R G Y G R R N G E RKRK SVRGCI V SPDLSVLNLVIV IK GEKD	73%
Nicotiana	RV RLLL Y R G T P C F R G Y G R R N G E RKRK SVRGCI V SPDLSVLNLVIV IK GEKD	73%
Arabidopsis	RV RLLL H R G T P C F R G H G R R T G E RKRK SVRGCI V SPDLSVLNLVIV IK GVSD	73%
Cerevisiae	RI K LL L T K N V S CY R -- P R R D G E RKRK SVR G A I V G P D L A V L A L VIV IK GEQE	72%
Zea Mays	RV RLLL H R G T P C F R G Y G R R N G E RKRK SVRGCI V SQDLSVINLVIV IK GEKD	71%
Leishmania	RV S LL V K R G A I G F N T R G Y Q E R R R K N V R G C V L A S D I A L V N V T I S V G D Q P	35%

Abbildung 39: Konservierung der Sequenz der NuBiS I bei Proteinen der S6-Familie

Das legt den Schluss nahe, dass es sich bei diesen Sequenzen ebenfalls um Nucleolaren Bindungssequenzen handeln dürfte.

5.2.1.2 Physikochemische Eigenschaften der NuBiS I

Bislang beschriebene Protein-RNA-Interaktionsdomänen ribosomaler Proteine bestehen meist aus einer Häufung von Aminosäuren mit positiv geladenen Seitenketten, also von Argininen und Lysinen (Allers *et al.*, 2001). Dies trifft auch auf die NuBiS I der S6-Familie zu.

Beim hrpS6 enthält der Bereich zwischen den Aminosäuren 72 und 98 insgesamt elf geladene Aminosäuren (41%), die gesamte NuBiS I bringt es auf einen Anteil von etwa 30% an Lysinen und Argininen in der Sequenz, beim yrpS6A sind es knapp 25%.

	72	80	90	100	110	120	135

S6	RV RLLLS K GHSCY R PRRT GE RKRK SVRGCIVDANLSVLNLVIV KK GEKD					
S6A	K LLLT K NV S CY R PRRD GE RKRK SVR G A I V G P D L A V L A L VIV KK GEQE L E G L T D T T V P K R L G P					

Abbildung 40: Basische Aminosäuren bilden 41% der Aminosäuren der NuBiS I bei hrpS6 und 25% bei yrS6A.

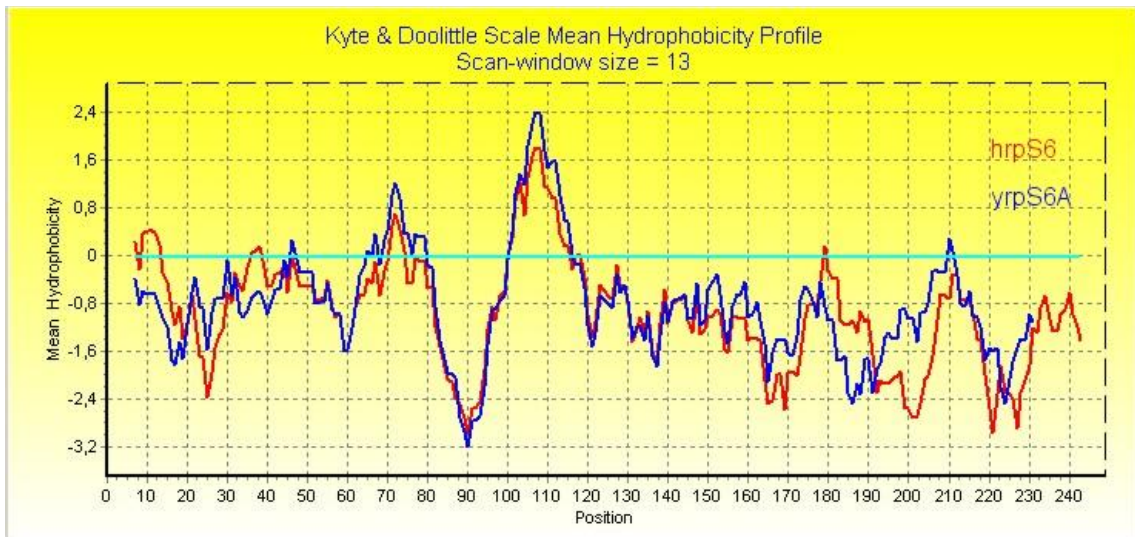


Abbildung 41: Kyte und Doolittle Hydrophobizitäts-Analyse der gesamten hrpS6 und yrpS6A-Sequenzen (Kyte *et al.*, 1982)

Diese hohe Anzahl an positiven Ladungen ist im Vergleich zur restlichen S6-Sequenz charakteristisch für diese Domäne. Die Abbildung 41 zeigt sehr deutlich, dass eine ausgeprägte Hydrophilizität aus dieser Ladungsverteilung an dieser Proteinposition entsteht.

Die als NuBiS I charakterisierte Sequenz entspricht aufgrund ihrer Ladungsverteilung durchaus den bereits beschriebenen Eigenschaften von Nucleolaren Bindungssequenzen und RNA-Bindungsmotiven, eine direkte Bindung an die ribosomale RNA scheint hier sehr wahrscheinlich.

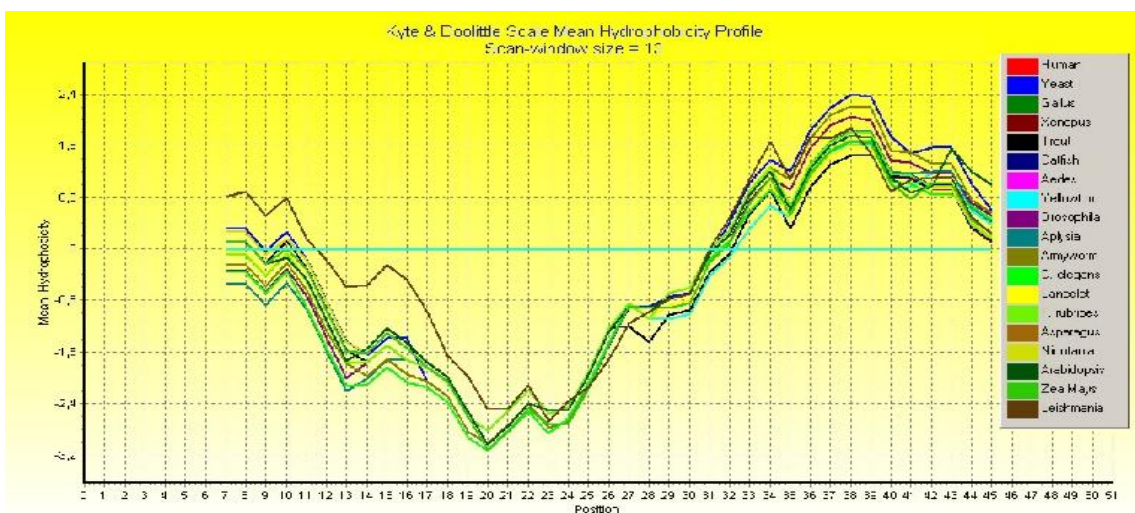


Abbildung 42: Kyte und Doolittle Hydrophobizitäts-Analyse der NuBiS I-Sequenzen von hrpS6A, yrpS6A und der unterschiedlichen homologen Sequenzen.

Diese physikalischen Eigenschaften lassen sich auch bei allen anderen bereits herangezogenen Sequenzen identisch berechnen. Selbst *Leishmania* (braun) verhält sich trotz seiner verhältnismäßig geringen Homologie ähnlich und weist eine ausgeprägte Hydrophilizität auf (Abbildung 42).

5.2.1.3 Strukturelle Eigenschaften der NuBiS I

Aufgrund ihrer hohen Basizität ist es bislang noch nicht gelungen, hrpS6 oder yrpS6A zu kristallisieren und Strukturdaten zu ermitteln. Diese würden es ermöglichen, die identifizierten Domänen der S6-Proteinfamilie mit besonderen Strukturmerkmalen in Verbindung zu bringen, um so weitere Erkenntnisse über ihre Wirkungsweise zu gewinnen.

Neueste Entwicklungen in der Informatik ermöglichen inzwischen *ab initio* Vorhersagen von Sekundär- und sogar Tertiärstrukturen, also dreidimensionale Strukturen zu berechnen, die nicht auf bekannten, homologen kristallisierten Strukturen basieren. Aufgrund seiner relativ geringen Größe eignet sich die gesamte Proteinsequenz von hrpS6 zur Berechnung einer Tertiärstruktur sowohl mit der Rosetta-Methode (Simons *et al.*, 1997; Bystroff *et al.*, 2000), wie auch mit der Robetta-Methode (Chivian *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004; Chivian *et al.*, 2005).

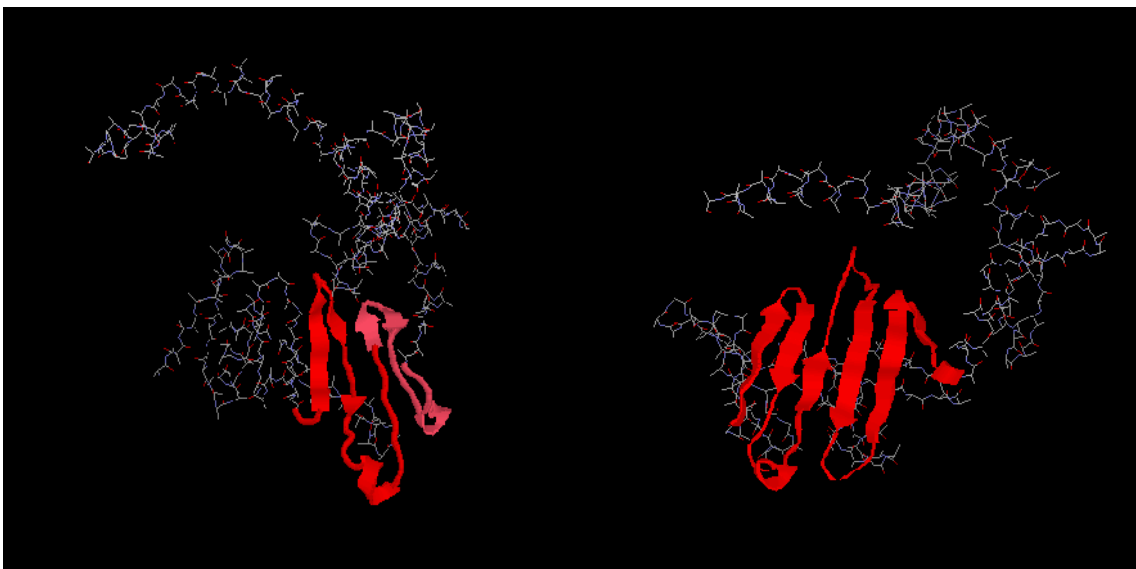


Abbildung 43: Rosetta-Strukturvorhersagen von hrpS6 (links) und yrpS6A (rechts). Die NuBiS I ist jeweils rot hervorgehoben.

Die Berechnungen der *ab initio*-Strukturen von hrpS6 und yrpS6A liefern mit diesen beiden Servern unterschiedliche Ergebnisse. An dieser Stelle sollen

lediglich mögliche Struktureigenschaften der NuBiS I anhand der Rosetta-Vorhersage betrachtet werden.

Die Rosetta-Strukturvorhersage ermöglicht zwei interessante Überlegungen. Allem Anschein nach kann man die sequentielle Konservierung der NuBiS I auch auf ihre 3D-Struktur ausweiten.

Bei yrpS6A, dessen NuBiS I sich über die Aminosäuren 74 bis 135 erstreckt, wird deutlich, dass diese Domäne in der Lage ist, eine durchgehende β -Faltblatt-ähnliche Struktur zu bilden. Im Vergleich dazu wirkt die Strukturvorhersage der humanen NuBiS I ein wenig „verküppelt“: Es bildet sich keine eindeutige Struktur heraus, das Muster von parallel verlaufenden Strängen bleibt allerdings bestehen

Zweitens erscheint eine solch ausgeprägte und präzise Tertiärstruktur als Bindungs- bzw. Anlagerungsdomäne geradezu prädestiniert.

Die Bedeutung dieser Struktur wird später im Vergleich zur NuBiS II und weiteren bekannten Nucleolaren Bindungssequenzen diskutiert, um generelle Anforderungen für Sequenz und Struktur von Nucleolaren Bindungssequenzen im Hinblick auf ihre Bindung an die ribosomale RNA zu formulieren.

5.2.2 Die C-terminale NuBiS II der S6-Familie

5.2.2.1 Sequenz, Konservierung

Die zweite Nucleolare Bindungssequenz innerhalb der Proteine der S6-Familie befindet sich C-terminalen Bereich dieser Proteine. Dabei konnte die bisher im hrpS6 ermittelte Sequenz, die sich von Aminosäure 170 bis Aminosäure 210 erstreckte, weiter eingegrenzt werden. Es zeigte sich kein Verlust in der Intensität der nucleolaren Akkumulation bei der Expression des Aminosäurebereiches 173 bis 203.

Interessanterweise ließ sich das ursprüngliche Konstrukt SV40-S6(170-210) problemlos auf die hier dargestellte Sequenz SV40-S6(173-203) reduzieren, ohne dass die Funktion der NuBiS II dabei verloren oder verändert wurde. Die Zellen zeigten eine deutliche und ausgeprägte nucleolare Fluoreszenz (s. Abbildung 28, Seite 85).

Im Gegensatz dazu gelang es nicht, beim yrpS6A die Sequenz der NuBiS II weiter zu verkürzen, ohne einen steigenden Verlust der nucleolaren Bindung des Fusionsproteins zu beobachten (Walter *et al.*, 2000, Lipsius *et al.*, 2005).

Bei der Betrachtung dieser Fakten muss man berücksichtigen, dass alle Untersuchungen im selben Zellsystem durchgeführt wurden. Dies bedeutet, dass die exprimierte NuBiS II, sei es von Mensch oder Hefe, am selben Ligand in der Zellen binden muss. Entsprechend wird das Fehlen erforderlicher Bindungsstrukturen im homologen Bereich 174-202 von yrpS6A durch die folgenden Aminosäuren kompensiert werden. Insbesondere das fehlende KKNK-Motiv, welches die humane NuBiS II terminiert, erscheint in diesem Fall ausschlaggebend.

Folgend sind die identifizierten Sequenzen der NuBiS II von hrpS6 und yrpS6A dargestellt, konservierte Aminosäuren sind rot, positiv geladene Aminosäuren (Arginin und Lysin) blau hervorgehoben.

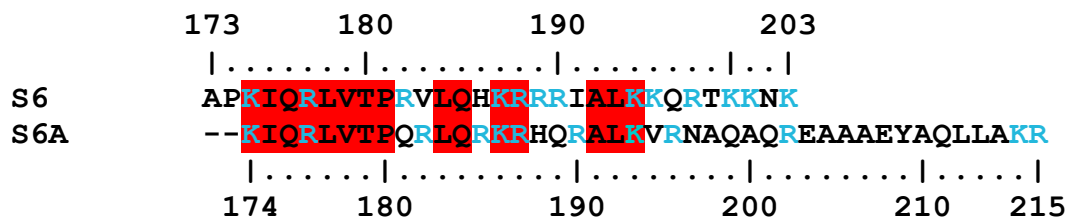


Abbildung 44:Sequenzen der C-terminalen NuBiS II von hrpS6 und yrpS6A; basische Aminosäuren sind blau dargestellt, konservierte Aminosäuren sind rot hinterlegt.

Wie bei der NuBiS I zeigt sich ein hoher Konservierungsgrad, der in der Verteilung der Arginine und Lysine allerdings nicht so ausgeprägt hervorsteicht.

Zieht man die entsprechenden Sequenzen weiterer Organismen hinzu, zeigt sich, dass diese ebenfalls stark konserviert sind. Hefe und Mensch weisen eine Homologie von etwa 50% auf, wobei diese ausreichend ist, um bei beiden Proteinen eine Nucleolus-Akkumulation im identischen Zellsystem herbeizuführen. Andere Organismen weisen in Bezug auf die humane NuBiS I eine wesentlich höhere sequentielle Konservierung auf.

Von daher scheint es sehr wahrscheinlich, dass die hier abgebildeten Sequenzen ebenfalls komplette oder zumindest Teile von Nucleolaren Bindungssequenzen darstellen.

Human	APKIQRLVTPRVLQHKRRRIALKKQRTKKNK	
Gallus	APKIQRLVTPRVLQHKRRRIALKKQRTQKNK	97%
Xenopus	APKIQRLVTPRVLQHKRRRIALKKQRTQKNK	97%
Trout	APRIQRLVTPRVLQHKRRRIALKKQRTQKNK	94%
Catfish	APKIQRLVTPRVLQHKRRRIALKRQRTQKNK	94%
Aplysia	APKIQRLVTPVVLQKRRARIMALKKRVTKRR	71%
Armyworm	APKIQRLVTPVVLQRRRHRLALKKRRLAKRR	71%
Asparagus	APKIQRLVTPPLTLQKRRARIAEKRRVARAK	71%
Zea Mays	APKIQRLVTPPLTLQKRRARIAADKKRRIITKKK	71%
Nicotiana	APKIQRLVTPPLTLQKRRARIAADKKRRIAKAK	71%
Arabidopsis	APKIQRLVTPPLTLQKRRARIAADKKRRIAKSD	68%
Aedes	APKIQRLITPVLQKRRHRLAIKKRRVESRK	65%
Yellowfever m.	APKIQRLITPVLQKRRHRLAIKKRRVESRK	65%
Drosophila	APKIQRLITPVLQKRRHRIALKKRQIASK	65%
Lancelet	TPKIQRLITPQLQKRRHMRVAKRRRYAKQR	52%
Yeast	APKIQRLVTPQLQKRRHQRALKVRNAQAQR	52%
C. elegans	APKIQRLITPARIARKKYYLLRQKRNQIKMR	39%
Leishmania m.	APKIQRLITPVRKARRAKKAKDAIAKVRASA	35%

Abbildung 45: Konservierung der Sequenz der NuBiS II bei Proteinen der S6-Familie

5.2.2.2 Physikochemische Eigenschaften der NuBiS II

Die NuBiS II zeigt ebenfalls eine ausgeprägte Häufung von basischen Aminosäuren. Die humane NuBiS II weist 13 Arginine und Lysine auf, bei einer Gesamtlänge von gerade 31 Aminosäuren. Dies entspricht den bereits beschriebenen Eigenschaften von Nucleolaren Bindungssequenzen, wie sie auch die N-terminale NuBiS I aufwies, und die entscheidend für die Bindung an die ribosomale RNA sind.

Die Analyse des Hydrophilizitätsprofils des hrpS6 und des yrpS6A (Abbildung 41, Seite 108) zeigte ein sehr charakteristisches Profil im Bereich der NuBiS I auf, wo hingegen im Aminosäurebereich der NuBiS II keine auffälligen Muster zu erkennen sind, so dass sich die Diskussion mehr auf strukturelle Eigenschaften der NuBiS II verlagert.

5.2.2.3 Strukturelle Eigenschaften der NuBiS II

Genauso wie für die NuBiS I anhand des Rosetta-Servers eine Strukturvorhersage berechnet wurde, so konnte auch für die NuBiS II eine aussagekräftige Struktur berechnet werden.

Die humane NuBiS II bildet in diesem Modell eine sehr gleichmäßige und ausgeprägte α -Helix aus (s. Abbildung 46, links); diese Vorhersage wird durch eine Vielzahl an 2D-Vorhersageprogrammen gestützt (Daten nicht gezeigt); beim yrpS6A (rechts) handelt es sich ebenfalls um einen Helixbereich, der allerdings an mehreren Positionen unterbrochen ist. Dabei fällt auf, dass die durch Kopplung an β -Galaktosidase eingegrenzte Sequenz der NuBiS II in dem Strukturmodell einen ebenfalls definierten Bereich innerhalb der Sekundär- und Tertiärstruktur einnimmt, der zudem stark an der Proteinoberfläche exponiert ist.

Innerhalb der NuBiS II befindet sich das zweite Kernsignal des hrpS6 und des yrpS6A, das NLS II. Die Aufklärung der Strukturen der am Kernimport beteiligten Importine zeigte, dass die Bindung jener Importine an das Importsubstrat durch Erkennung von Helixstrukturen gesteuert werden kann (Cingolani *et al.*, 1999), so dass diese Strukturvorhersage in dieser Hinsicht durchaus plausibel erscheint.

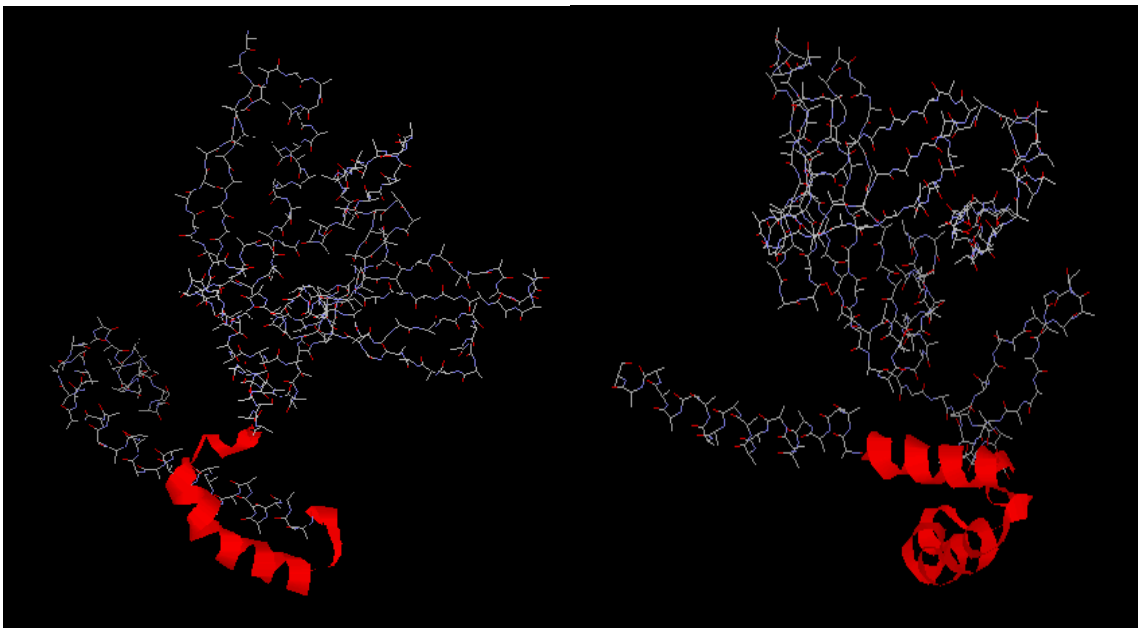


Abbildung 46: Rosetta-Strukturvorhersagen von hrpS6 (links) und yrpS6A (rechts). Die NuBiS II ist jeweils rot hervorgehoben

Inwiefern die berechnete Struktur der NuBiS II zur Bindung von hrpS6 und yrpS6A und an der ribosomalen RNA im Nucleolus beiträgt, soll, ebenso wie für die NuBiS I, zu einem späteren Zeitpunkt diskutiert und verglichen werden.

5.2.2.4 Abhängigkeit der NuBiS II vom NLS II

Teile der hier in der Arbeit vorgelegten Ergebnisse belegen, dass die NuBiS II nur dann funktional ist, wenn das integrierte NLS II (KRRR) intakt vorhanden ist.

```
          173      180      190      203
          |.....|.....|.....|...|
S6       APKIQRLVTPRVLQHKRRRRIALKKQRTKKNK
```

Abbildung 47: Sequenz der NuBiS II und des enthaltenen NLS II

Die Expression von SV40-S6(173-249, Δ (II,215/216)) und SV40-S6(173-249, Δ (II,III)), welches nur die NuBiS II und kein NLS enthält, lokalisierte eindeutig im Kern und sparte die Nucleoli aus.

Handelt es sich hierbei um eine Kopplung der Funktionsmechanismen von Nucleolaren Bindungssequenzen und Kernimportsignalen oder ist das NLS II-Tetrapeptid nur als Sequenzbestandteil der NuBiS II essentiell?

Um dies festzustellen, kann man weitere Ergebnisse dieser Arbeit heranziehen. Davon ausgehend, dass es eine funktionelle Kopplung von Nucleolaren Bindungssequenzen und Kernimportsignalen gibt, dürften Konstrukte, die kein eigenes oder eingebrachtes (SV40) Kernsignal enthalten, nie am Nucleolus akkumulieren, da der Prozess der nucleolaren Bindung durch mangelnde Erkennung durch Importine nicht initiiert werden könnte.

Das Konstrukt GFP-S6(3-249, Δ (I,II,III)), welches durch passive Diffusion in den Kern gelangt und beide Nucleolaren Bindungssequenzen des hrpS6 aufweist, zeigt allerdings eine eindeutige nucleolare Fluoreszenz. Dies widerspricht der Ausgangshypothese und bedeutet, dass mindestens eine der beiden Nucleolaren Bindungssequenzen, nämlich das NuBiS I, auch ohne vorhandene Kernsignale funktional ist.

Dies verleitet zu der Annahme, dass das NLS II-Tetrapeptid für die NuBiS II als essentieller Bestandteil der Bindungsmechanismen am Nucleolus zu betrachten ist und somit eine Doppelfunktion besitzt.

Die Deletion des NLS II kann zu Veränderungen der Tertiärstruktur der NuBiS II führen. Um dies zu belegen, wurde erneut auf dem Rosetta-Server eine Strukturvorhersage berechnet. Dabei wurde die Sequenz hrpS6 Δ II als Grundlage

verwendet. Die folgende Abbildung zeigt die berechnete Struktur der NuBiS II beim hrpS6 (links) und beim hrpS6 Δ II (rechts), es wurde dabei die gesamte Sequenz des hrpS6 bei der Berechnung berücksichtigt.

Man erkennt, dass die Deletion des NLS II zu einem Verlust der Strukturinformation der NuBiS II geführt hat. Die ursprünglich durchgehende α -Helix ist an der Stelle des NLS II unterbrochen.

Durch den zusätzlichen Verlust der hohen Dichte an basischen Aminosäuren, die das NLS II in die NuBiS II einbringt, kann man mit hoher Wahrscheinlichkeit den Verlust von nucleolaren Bindungseigenschaften der NuBiS II auf das Fehlen des Tetrapeptids KRRR zurückführen.

Ein mechanistischer Zusammenhang zwischen nucleolarer Akkumulation und Kerntranslokationsprozessen muss somit ausgeschlossen werden.

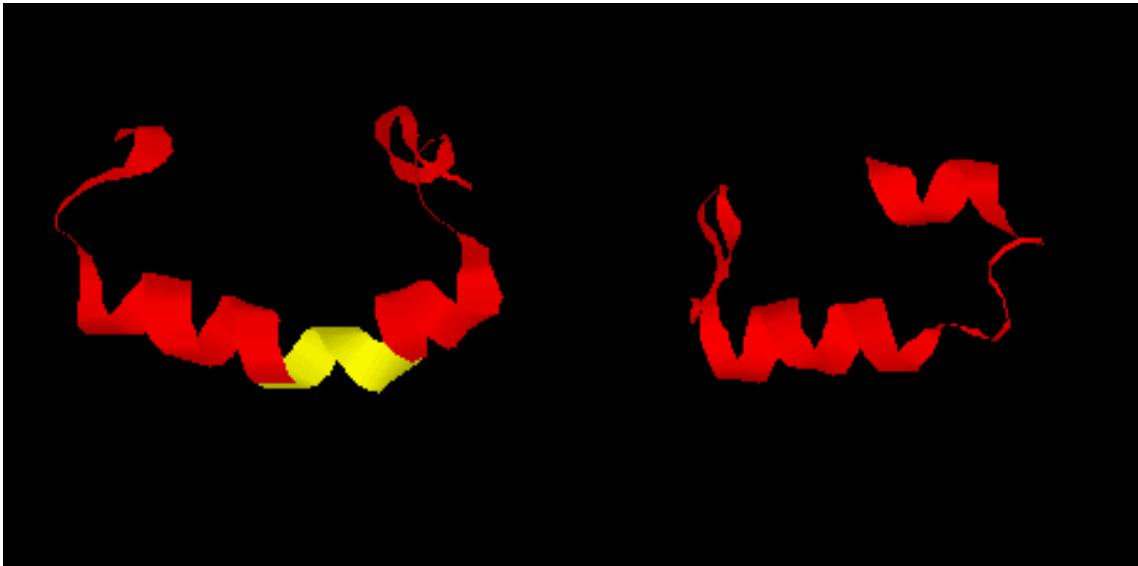


Abbildung 48: Struktur der NuBiS II in Abhängigkeit des NLS II (gelb), links Wildtyp-S6, rechts S6 Δ II

5.2.3 Nucleolaren Bindungssequenzen und ihre Tertiärstruktur

Die Untersuchungen der Nucleolaren Bindungssequenzen von hrpS6 und yrpS6A haben gezeigt, dass diese zwar unterschiedliche, aber dennoch definierte Tertiärstrukturen ausbilden. Die NuBiS I bildet in den Strukturvorhersagen eine β -Faltblattstruktur aus, die NuBiS II präsentiert sich als α -Helix.

Bisherige Untersuchungen an ribosomalen Proteinen deuten darauf hin, dass ihre nucleolare Akkumulation durch die Bindung an die ribosomale RNA bedingt ist (Melese *et al.*, 1995)

Der hohe Anteil an basischen Aminosäuren und die sich daraus ergebenden physikochemischen Eigenschaften lassen auch im Falle der Proteine der S6-Familie auf eine direkte Bindung an die rRNA schließen.

Der Vergleich der Strukturvorhersagen der Nucleolaren Bindungssequenzen von hrpS6 und yrpS6A mit Strukturen bekannter RNA-Bindungsmotive und prokaryontischer Ribosomen soll diese Hypothese weiter stützen.

5.2.3.1 Struktur der Nucleolus-Bindenden-Sequenz des HIV-Rev-Proteins

Das HIV-Rev-Protein ist ein essentielles Protein der viralen Replikation. Es reguliert unter anderem das Spleißen viraler mRNAs im Nucleolus infizierter Zellen.

Die Nucleolare Bindungssequenz des HIV-Rev-Proteins wurde 1989 auf eine 16 Aminosäure lange Sequenz eingegrenzt: 35 **RQARRNRRRRWRERQR** 50 (Kubota *et al.*, 1989). Elf dieser Aminosäuren sind Arginine, deren hohes Aufkommen (zusammen mit Lysin, ebenfalls eine basische Aminosäure) bereits in den Nucleolaren Bindungssequenzen von hrpS6 und yrpS6A festgestellt werden konnte.

1995 gelang es einer Arbeitsgruppe durch Röntgenkristallographie die Struktur des HIV-Rev-Peptids (34-50) aufzuklären. Dabei zeigte sich, dass die für die Akkumulation am Nucleolus verantwortliche Domäne eine α -Helix ausbildet, wie sie auch für die NuBiS II des hrpS6A berechnet wurde.

5.2.3.2 Struktur der allgemeinen RNA-Bindungsdomäne RNP

Da nur bei wenigen nucleolaren oder Nucleolus

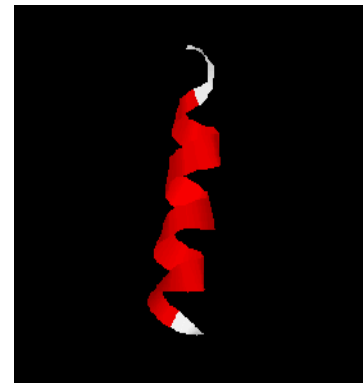


Abbildung 49: Struktur des HIV-Rev-Peptids 34-50 (Scanlon *et al.*, 1995)

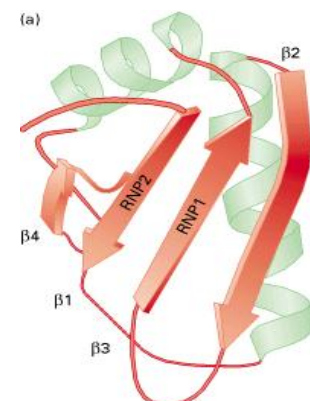


Abbildung 50: Struktur der RNP-Bindungs-domäne (Nagai *et al.*, 1995)

bindenden Proteinen sowohl NuBiS als auch Strukturdaten bekannt sind, sollen an dieser Stelle noch die Strukturmerkmale der RNA-Bindungsdomäne RNP angeführt werden.

Die RNP-Bindungsdomäne ist Bestandteil einer Vielzahl von Proteinen, die an der Prozessierung und dem Transport von RNA beteiligt sind. Die vergleichenden Untersuchungen zur Strukturaufklärung mehrerer Proteine mit RNP-Bindungsdomänen haben gezeigt, dass diese Bindungsdomäne eine hohe strukturelle Konservierung aufweist. Die β -Faltblatt-Struktur der RNP-Bindungsdomäne, welche durch die Stränge RNP1 und RNP 2 stabilisiert wird, bildet somit eine großflächige und an der Proteinoberfläche besonders exponierte Kontaktfläche zur Bindung der RNA aus (Nagai *et al.*, 1995).

5.2.3.3 RNA-Protein-Interaktionen bei prokaryontischen Ribosomen

Durch die hohe Auflösung der ermittelten dreidimensionalen Struktur prokaryontischer Ribosomen sind auch viele Interaktionen zwischen ribosomalen Proteinen und ribosomaler RNA aufgeklärt worden.

Generell sind bei jedem Protein eine Vielzahl von einzelnen Interaktionen mit der rRNA identifiziert worden. Neben den punktuellen Wechselwirkungen wurden auch spezifische Domänen identifiziert, die große Flächen für die Interaktion mit der rRNA bereitstellen (Brodersen *et al.*, 2002).

Das ribosomale Protein TtrpS5 von *Thermus thermophilus* interagiert mit der 16S-rRNA der kleinen 30S-Untereinheit durch zwei α/β -Sandwich-Domänen, die bereits bei anderen RNA-bindenden Proteinen identifiziert wurden. Durch seine Struktur bietet TtrpS5 eine rRNA-Interaktionsfläche von fast 25% seiner gesamten Proteinoberfläche.

Das wesentlich kleinere ribosomale Protein TtrpS20 bietet eine weitere

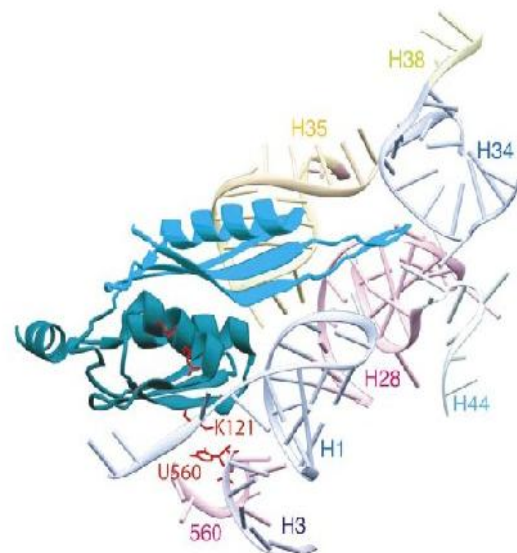


Abbildung 51: Interaktion von TtrpS5 mit der 16S-rRNA: die beiden α/β Sandwich-domänen sind in hell- und dunkelblau dargestellt. (Brodersen *et al.*, 2002)

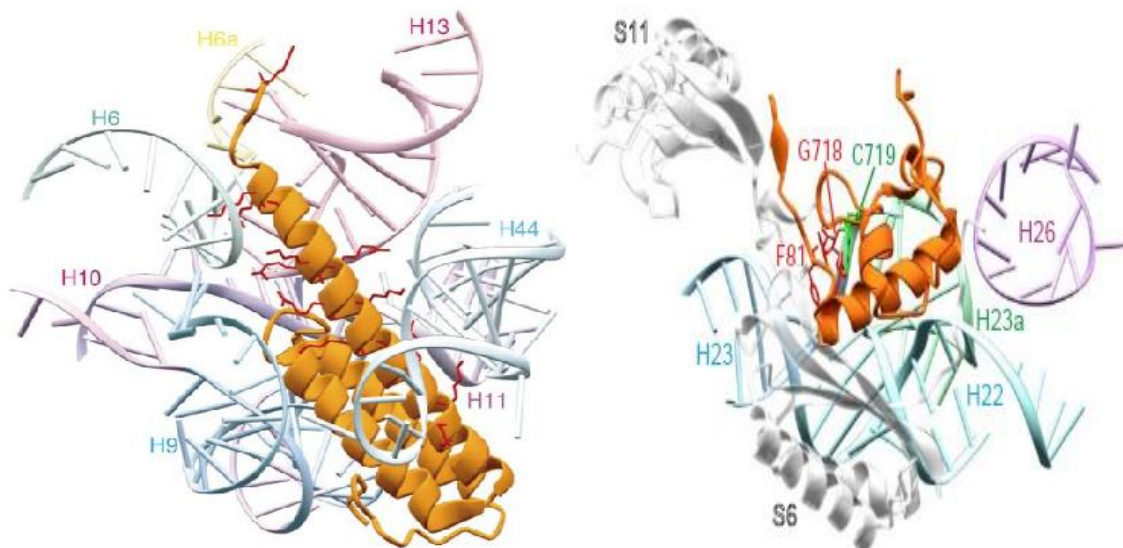


Abbildung 52: links: Interaktion von TtrpS20 mit der 16S-rRNA: die basischen Aminosäuren Arginin und Lysin sind durch rote Stäbe dargestellt, rechts: Interaktion von TtrpS18 mit der 16S-rRNA (Brodersen *et al.*, 2002)

Möglichkeit der bei *Thermus thermophilus* beobachteten Interaktionen. TtrpS20 ist das einzige Protein am unteren Ende der kleinen Untereinheit und spielt daher eine zentrale Rolle bei der Stabilisierung der rRNA in diesem Bereich. Die drei α -Helices erstrecken sich über 33, 25 und 18 Aminosäuren und bilden somit eine rRNA-Kontaktfläche aus, die über einem Drittel der gesamten Proteinoberfläche entspricht. Die zahlreichen basischen Aminosäuren bilden dabei Salzbrücken zu den Phosphatresten aus.

Das ribosomale Protein TtrpS18 bildet eine α -Helix aus, die sich an der 16S-rRNA anlagern kann und stark an die Struktur der C-terminalen Nucleolus-Bindenden-Sequenz von hrpS6 erinnert (s. Abbildung 46, S.113).

5.2.4 Schlussfolgerungen zur Funktionsweise von NuBiS I und II

Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass die Bindung an RNA-Motive keine festen Sequenz- oder Strukturanforderungen hat. Dies gilt sowohl für Bindung an ribosomale RNA in den Nucleoli sowie für die Bindung an andere RNA-Motive.

Allerdings lassen die hier vorgebrachten Daten einige Grundvoraussetzungen erkennen.

Die Sequenzlänge der meisten bekannten Nucleolaren Bindungssequenzen beträgt zwischen 20 und 40 Aminosäuren. Diese weisen typischerweise einen

hohen Anteil an den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin auf.

Damit die NuBiS an die ribosomale RNA in den Nucleoli binden können, hat sich bislang eine gute Exposition der Bindungsflächen bewährt, wobei diese durch Ausbildung spezifischer Sekundärstrukturen unterstützt wird. Dabei können sowohl α -Helixen und β -Faltblattstrukturen auftauchen.

Die in dieser Arbeit vorgebrachten Ergebnisse zu Sequenz und Struktur der Nucleolaren Bindungssequenzen des humanen hrpS6 und seinem Homolog yrpS6A aus der Hefe entsprechen in bester Weise diesen Kriterien.

Mit ihrer Länge von 25, bzw. 31 Aminosäuren, dem sehr hohen Anteil an Argininen und Lysinen, sowie die berechnete Ausbildung jeweils einer β -Faltblattstruktur und einer α -Helix, stützen diese Erkenntnisse die Überlegungen zur Funktionsweise von Nucleolaren Bindungssequenzen.

5.3 Substitution des humanen hrpS6 durch das yrpS6A der Hefe

Die bereits diskutierten Ergebnisse haben belegt, dass hrpS6 und yrpS6A einen hohen Grad an evolutionärer Konservierung aufweisen. Sowohl die Anzahl wie auch die Position der Kernimportsignale und der Nucleolaren Bindungssequenzen stimmen bei beiden Proteinen überein. Das humane hrpS6 gilt aufgrund der drei zusätzlichen Phosphorylierungsstellen als höher entwickelt als das yrpS6A. Diese drei Phosphorylierungsstellen befinden sich am C-Terminus des hrpS6, welcher durch seine zusätzlichen 10 Aminosäuren den einzigen wirklichen Unterschied zwischen den beiden Proteinen bildet.

Diese hohe evolutionäre Konservierung gilt ebenfalls, zumindest auf Sequenzebene, für eine Menge weiterer ribosomaler Proteine über eine Vielzahl von eukaryontischen Organismen hinweg. Selbst prokaryontische und die aus Prokaryonten hervorgegangenen mitochondrialen ribosomalen Proteine lassen sich zum Teil eukaryontischen ribosomalen Proteinfamilien zuordnen.

Dies lässt die Hypothese einer strukturellen und funktionellen Konservierung der Ribosomen über alle Organismen in der Evolution zu.

Daraus ergibt sich die interessante Fragestellung, inwiefern diese Nähe zwischen den einzelnen Organismen einen heterologen Austausch ribosomaler Proteine

zulässt.

Tatsächlich aber gelang es in unserer Arbeitsgruppe bereits, das humane hrpS6 in Hefezellen zu exprimieren ebenso wie der Nachweis, dass hrpS6 durch Integration in die 40S-Untereinheit aktiv an der Translation naszierender Proteine beteiligt ist (Hahn, 1996). Interessanterweise konnte, eine komplette Substitution des yrpS6A nicht erreicht werden, d.h. das exprimierte hrpS6 befand sich im benutzten Expressionssystem in einer direkten Konkurrenzsituation mit dem endogenen yrpS6A. Entsprechend gering waren die Einbauraten, da yrpS6A aufgrund seiner Passgenauigkeit einen deutlichen Selektionsvorteil hatte. Neueste Ergebnisse führen dies auf die Regulation des verwendeten Promoters während des Wachstums der Hefezellen zurück.

Der phosphorylierbare C-Terminus stellte in dieser Hinsicht kein störendes Sequenzmotiv dar; eine Phosphorylierung eben jenes humanen C-Terminus konnte allerdings auch nicht nachgewiesen werden. Dies ist mit hoher Sicherheit auf das Fehlen einer entsprechenden Kinase zurückzuführen. S6-Kinasen wie die p70- und p85-S6-Kinasen konnten bislang in Hefeorganismen nicht nachgewiesen werden.

5.3.1 Expression der yrpS6A-Konstrukte

Der nächste Schritt im Versuch, ribosomale Proteine gegeneinander auszutauschen, bedeutete nun das hrpS6 durch das in der Evolution frühere yrpS6A zu substituieren. Dies soll in einer Reihe von Experimenten gelingen, die auf die Ergebnisse dieser Arbeit aufbauen.

Es sollte daher die prinzipielle Möglichkeit zur heterologen Expression von yrpS6A in menschlichen Zellen nachgewiesen werden. Desweiteren sollte überprüft werden, ob das exprimierte Protein in der Immunocytochemie und im Western-Blot detektiert und identifiziert werden kann.

Dazu wurde die cDNA von yrpS6A in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA5FRT/TO inkloniert und exprimiert.

Erste Vorversuche zeigten, dass eine Expression des yrpS6A nur in bestimmten Zelllinien im Western-Blot nachgewiesen werden konnte. Humane HEK- und HeLa-Zellen konnten daher nicht verwendet werden. Die Versuche wurden daher

mit COS-1-Zellen durchgeführt, einer Zelllinie, die aus Affen stammt und die eine schwache, aber verwertbare Expression der yrpS6A-Konstrukte im Western-Blot zeigten.

5.3.1.1 Expression von yrpS6A

Die Expression von yrpS6A in COS-1-Zellen (s. Abbildung 32 auf Seite 92) zeigte eine ausgeprägte Akkumulation von yrpS6A in den Nucleoli der Zellen, das Nucleoplasma und das Cytoplasma wiesen keine Fluoreszenzsignale auf.

Die Untersuchungen im Western-Blot bestätigten, dass natives yrpS6A nicht in die 40S-Untereinheit eingebaut wird. Dies bedeutet, dass die festgestellte Homologie zwischen yrpS6A und hrpS6 nicht ausreichend ist, um eine Substitution zu erreichen.

Obwohl die drei Kernlokalisierungssignale und die beiden Nucleolaren Bindungssequenzen des yrpS6A in COS-Zellen funktional sind (Lipsius *et al.*, 2005), sind noch weitere Sequenzen erforderlich, um einen Einbau von S6-Proteinen in die 40S-Untereinheit von COS-Zellen zu erreichen.

Daher wurde ein Konstrukt generiert, das aus dem yrpS6A und dem ihm fehlenden C-Terminus des hrpS6 besteht. Dieses Konstrukt wurde yrpS6A-HCT (Humaner C-Terminus) genannt.

5.3.1.2 Expression von yrpS6A-HCT

Bei der Untersuchung dieses Konstruktes wurde analog vorgegangen. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich yrpS6A-HCT anders verhält als yrpS6A.

Die Immunfluoreszenz (s. Abbildung 34 auf Seite 95) zeigte eine deutliche nucleolare Akkumulation von yrpS6A-HCT wie auch bei yrpS6A. Zusätzlich konnte bei einer Vielzahl von Zellen auch eine ausgeprägte cytoplasmatische Lokalisation von yrpS6A-HCT beobachtet werden. Diese entspricht dem Verteilungsmuster, dass man bei der Expression von fluoreszenzmarkierten ribosomalen Proteinen beobachtet, deren Einbau in die 40S-Untereinheit nachgewiesen werden konnte (Bisotti *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2003).

Dieses Ergebnis wurde in einem Western-Blot überprüft. Dabei konnte, trotz der schwachen Expression yrpS6A in der ribosomalen Fraktion gefunden werden (s.

Abbildung 35 auf Seite 96).

Die Hochsalzwäsche und die Trennung von 40S- und 60S-Untereinheit durch Puromycin konnte belegen, dass yrpS6A-HCT einen integrativen Bestandteil der 40S-Untereinheit bildet. Weiterführenden Untersuchungen haben dann belegt, dass diese 40S-Untereinheiten dann auch tatsächlich an der Translation teilnehmen können (s. Abbildungen 36 und 37 auf Seite 97).

5.3.2 Das yrpS6A der Hefe kann durch gezielte Modifikationen in humane Ribosomen integriert werden

Die Expression von yrpS6A und yrpS6A-HCT lässt keine eindeutige Klärung der ursprünglichen Fragestellung zu. Es ist nicht gelungen, dass humane hrpS6 durch das native yrpS6A zu ersetzen; gleichwohl konnte durch gezielte Manipulation der yrpS6A-cDNA diese Substitution erreicht werden.

Letztendlich bedeutet dies, dass die zehn Aminosäuren des humanen C-Terminus in Kombination mit den zwei Nucleolaren Bindungssequenzen der S6-Familie, ob nun aus Mensch oder Hefe, zu einem Einbau und der Funktion des S6-Proteins in der 40S-Untereinheit bei Primaten führt.

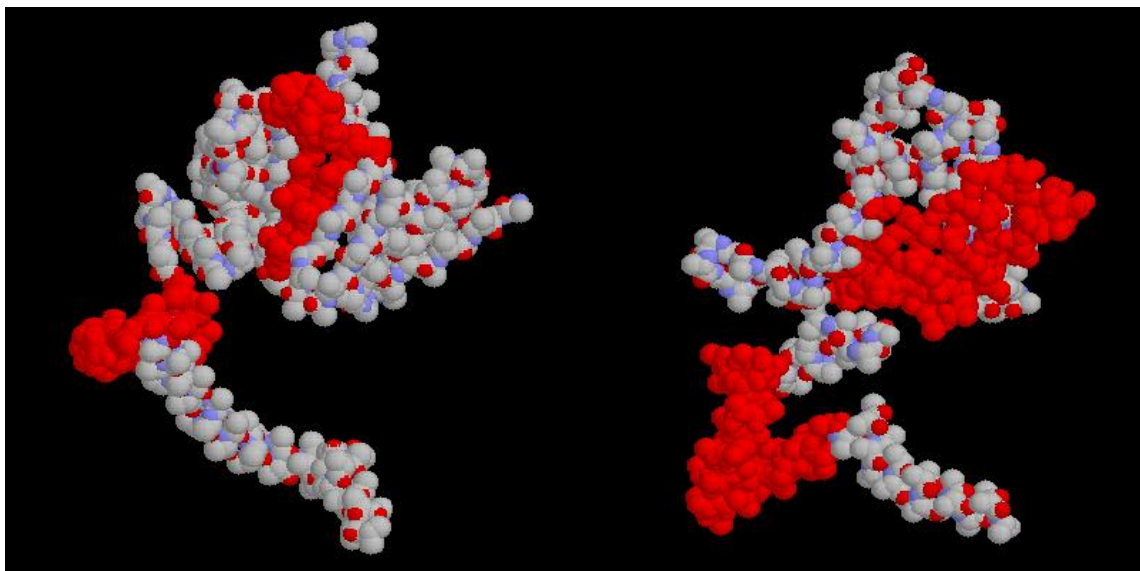


Abbildung 53: Strukturvorhersagen von hrpS6 (links) und yrpS6A (rechts): die Nucleolaren Bindungssequenzen sind rot dargestellt

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass die Nucleolaren Bindungssequenzen bei beiden Organismen konserviert blieben. Da die NuBiS des Hefeproteins im verwendeten Zellsystem funktional sind (Lipsius *et al.*, 2005), ist yrpS6A prinzipiell in der Lage an die humane ribosomale rRNA zu binden.

Betrachtet man die bereits verwendeten Strukturvorhersagen in Abbildung 53 kann man erkennen, dass die beiden Nucleolaren Bindungssequenzen trotz der hohen Ähnlichkeit der Proteine nicht identisch im Raum angeordnet sind. Man kann vermuten, dass yrpS6A zwar mit einer der beiden NuBiS an die ribosomale RNA im Nucleolus binden kann, die erforderliche zweite rRNA-Bindung aber nicht zu Stande kommt.

Die Untersuchungen zur Struktur der prokaryontischen Ribosomen haben gezeigt, dass die Struktur der ribosomalen Proteine in der ribosomalen Untereinheit sich von der Struktur von freien Proteinen unterscheiden kann. Insbesondere weisen C- und N-Termini eine hohe Variabilität auf und können sich so den Bindungsanforderungen im Ribosom anpassen (Brodersen *et al.*, 2002). NMR-Spektroskopische Untersuchungen des C-Terminus von hrpS6 haben eine ähnliche Beweglichkeit nachgewiesen (Katahira *et al.*, 1996). Durch die Modifikation von yrpS6A durch Hinzufügen des humanen C-Terminus wurden unter Umständen strukturelle Veränderungen herbeigeführt, die eine Integration in die 40S-Partikel ermöglichen.

Desweiteren wäre die Bereitstellung von weiteren punktuellen Bindungen zwischen yrpS6A-HCT und der rRNA durch den humanen C-Terminus denkbar, die für eine weitere Prozessierung des 40S-Partikel notwendig sind.

6 Zusammenfassung

Ribosomen sind Ribozyme, die die genetische Information der mRNA in das entsprechende Protein translatieren. Eukaryontische Ribosomen bestehen aus der kleinen 40S Untereinheit und der großen 60S Untereinheit, die beide im Nucleolus aus der dort synthetisierten rRNA und den aus dem Cytoplasma importierten ribosomalen Proteinen aufgebaut werden. An der Biogenese von Untereinheiten ist sowohl eine Vielzahl von Proteinfaktoren als auch von kleinen snoRNAs beteiligt, die für die Reifung der rRNA und für die Ausbildung der nativen Konformation notwendig sind. Fertiggestellte ribosomale Untereinheiten werden über den Kernporenkomplex in das Cytoplasma exportiert.

In dieser Arbeit wurden die für die nucleolare Bindung essentiellen Proteinsequenzbereiche des humanen ribosomalen S6-Proteins identifiziert und auf eine Minimalsequenz eingegrenzt. Dies gelang durch die Konstruktion und Expression von S6- β -Galactosidase-Fusionsproteinen, deren intrazelluläre Lokalisation immunocytoologisch detektiert wurde. Die Sequenz und die Länge der untersuchten S6-Oligopeptide wurden systematisch variiert bis die Minimalsequenz gefunden wurde. Im humanen S6-Protein wurden zwei nucleolare Bindungssequenzen identifiziert, die mit NuBiS bezeichnet wurden. NuBiS I liegt im aminoterminalen Bereich von S6 und besitzt kein Kernlokalisierungssignal. NuBiS II befindet sich in der C-terminalen Region von S6 und enthält das NLS II, das für die nucleolare Akkumulation unerlässlich ist. Ein Vergleich der beiden nucleolaren S6-Bindungssequenzen des Menschen mit anderen Spezies zeigt, dass offenbar diese Bindungssequenzen in der Evolution hoch konserviert worden sind.

Aus bereits in der Literatur vorhandenen Daten, insbesondere über die Struktur und Bindungsmechanismen prokaryontischer Ribosomen konnte abgeleitet werden, dass die nucleolare Akkumulation der untersuchten ribosomalen Proteine als eine Bindung an die ribosomale RNA aufzufassen ist.

Am Beispiel des humanen S6-Proteins konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass der Kernimport und die nucleolare Akkumulation voneinander sequentiell und funktionell völlig unabhängige Mechanismen sind. S6-Deletionskonstrukte, denen die Kernlokalisierungssignale fehlten, gelangten durch passive Diffusion in

den Kern und akkumulierten schließlich im Nucleolus ohne die cytoplasmatische Kernimportmaschinerie benutzt zu haben.

Die beobachtete strukturelle, evolutionäre Konservierung der nucleolaren Bindungssequenzen des humanen hrpS6 und des homologen yrpS6A aus der Hefe sollte in einem Substitutionsexperiment, das sich an diese Arbeit anschließt, funktionell verifiziert werden. Es wurden daher Vorversuche durchgeführt, die nachwiesen, dass das yrpS6A der Hefe in menschlichen Zellen exprimiert. Die Detektion von yrpS6A in der Immunocytochemie und im Western-Blot verschiedener Zellfraktionen zeigte, dass das yrpS6A-Protein der Hefe ebenso wie das humane hrpS6 im Nucleolus akkumuliert, jedoch nicht in die 40S Untereinheiten integriert wird. Weitere vorläufige Versuche, in denen die S6A-Proteinsequenz um zehn Aminosäuren des C-Terminus vom humanen S6 verlängert wurde, scheinen zu einem verbessertem Einbau des modifizierten S6A-HCT-Proteins in die kleine Untereinheit zu führen.

7 Literatur

- Adachi, Y., Copeland, T. D., Hatanaka, M. und Oroszlan, S.,** "Nucleolar targeting signal of Rex protein of human T-cell leukemia virus type I specifically binds to nucleolar shuttle protein B-23" (1993), *J Biol Chem*, 268: 13930-4.
- Adam, E. J. und Adam, S. A.,** "Identification of cytosolic factors required for nuclear location sequence-mediated binding to the nuclear envelope" (1994), *J Cell Biol*, 125: 547-55.
- Agrawal, R. K., Penczek, P., Grassucci, R. A., Li, Y., Leith, A., Nierhaus, K. H. und Frank, J.,** "Direct visualization of A-, P-, and E-site transfer RNAs in the Escherichia coli ribosome" (1996), *Science*, 271: 1000-2.
- Allers, J. und Shamoo, Y.,** "Structure-based analysis of protein-RNA interactions using the program ENTANGLE" (2001), *J Mol Biol*, 311: 75-86.
- Andersen, J. S., Lyon, C. E., Fox, A. H., Leung, A. K. L., Lam, Y. W., Steen, H., Mann, M. und Lamond, A. I.,** "Directed proteomic analysis of the human nucleolus" (2002), *Curr Biol*, 12: 1-11.
- Annilo, T., Karis, A., Hoth, S., Rikk, T., Kruppa, J. und Metspalu, A.,** "Nuclear import and nucleolar accumulation of the human ribosomal protein S7 depends on both a minimal nuclear localization sequence and an adjacent basic region" (1998), *Biochem Biophys Res Commun*, 249: 759-66.
- Arts, G. J., Fornerod, M. und Mattaj, I. W.,** "Identification of a nuclear export receptor for tRNA" (1998), *Curr Biol*, 8: 305-14.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Capel, M., Moore, P. B. und Steitz, T. A.,** "Placement of protein and RNA structures into a 5 Å-resolution map of the 50S ribosomal subunit" (1999), *Nature*, 400: 841-7.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B. und Steitz, T. A.,** "The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution" (2000), *Science*, 289: 905-20.
- Bastos, R., Lin, A., Enarson, M. und Burke, B.,** "Targeting and function in mRNA export of nuclear pore complex protein Nup153" (1996), *J Cell Biol*, 134: 1141-56.
- Bastos, R., Pante, N. und Burke, B.,** "Nuclear pore complex proteins" (1995), *Int Rev Cytol*, 162B: 257-302.
- Bischoff, F. R. und Gorlich, D.,** "RanBP1 is crucial for the release of RanGTP from importin beta-related nuclear transport factors" (1997), *FEBS Lett*, 419: 249-54.
- Bischoff, F. R. und Ponstingl, H.,** "Mitotic regulator protein RCC1 is complexed with a nuclear ras-related polypeptide" (1991), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 10830-4.
- Bischoff, F. R., Krebber, H., Smirnova, E., Dong, W. und Ponstingl, H.,** "Co-activation of RanGTPase and inhibition of GTP dissociation by Ran-GTP binding protein RanBP1" (1995), *EMBO J*, 14: 705-15.
- Bisotti, M. A.,** *Expression von fluoreszenzmarkierten ribosomalen Proteinen und deren Integration in translationsaktive Ribosomen*, Hamburg: 2002.

- Briggs, L. J., Stein, D., Goltz, J., Corrigan, V. C., Efthymiadis, A., Hubner, S. und Jans, D. A.**, "The cAMP-dependent protein kinase site (Ser312) enhances dorsal nuclear import through facilitating nuclear localization sequence/importin interaction" (1998), *J Biol Chem*, 273: 22745-52.
- Brodersen, D. E., Clemons, W. M. J., Carter, A. P., Wimberly, B. T. und Ramakrishnan, V.**, "Crystal structure of the 30 S ribosomal subunit from *Thermus thermophilus*: structure of the proteins and their interactions with 16 S RNA" (2002), *J Mol Biol*, 316: 725-68.
- Bystroff, C., Thorsson, V. und Baker, D.**, "HMMSTR: a hidden Markov model for local sequence-structure correlations in proteins" (2000), *J Mol Biol*, 301: 173-90.
- Caron, E., Cote, C., Parisien, M., Major, F. und Perreault, C.**, "Identification of two distinct intracellular localization signals in STT3-B" (2006), *Arch Biochem Biophys*, 445: 108-14.
- Cate, J. H., Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Earnest, T. N. und Noller, H. F.**, "X-ray crystal structures of 70S ribosome functional complexes" (1999), *Science*, 285: 2095-104.
- Cavaille, J., Hadjiolov, A. A. und Bachellerie, J. P.**, "Processing of mammalian rRNA precursors at the 3' end of 18S rRNA. Identification of cis-acting signals suggests the involvement of U13 small nucleolar RNA" (1996), *Eur J Biochem*, 242: 206-13.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. und Prasher, D. C.**, "Green fluorescent protein as a marker for gene expression" (1994), *Science*, 263: 802-5.
- Chelsky, D., Ralph, R. und Jonak, G.**, "Sequence requirements for synthetic peptide-mediated translocation to the nucleus" (1989), *Mol Cell Biol*, 9: 2487-92.
- Chi, N. C., Adam, E. J., Visser, G. D. und Adam, S. A.**, "RanBP1 stabilizes the interaction of Ran with p97 nuclear protein import" (1996), *J Cell Biol*, 135: 559-69.
- Chivian, D., Kim, D. E., Malmstrom, L., Bradley, P., Robertson, T., Murphy, P., Strauss, C. E. M., Bonneau, R., Rohl, C. A. und Baker, D.**, "Automated prediction of CASP-5 structures using the Robetta server" (2003), *Proteins*, 53 Suppl 6: 524-33.
- Chivian, D., Kim, D. E., Malmstrom, L., Schonbrun, J., Rohl, C. A. und Baker, D.**, "Prediction of CASP6 structures using automated Robetta protocols" (2005), *Proteins*, 61 Suppl 7: 157-66.
- Cingolani, G., Petosa, C., Weis, K. und Muller, C. W.**, "Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha" (1999), *Nature*, 399: 221-9.
- Clark, M. W., Leonard, K. und Lake, J. A.**, "Ribosomal crystalline arrays of large subunits from *Escherichia coli*" (1982), *Science*, 216: 999-1001.
- Clemons, W. M. J., May, J. L., Wimberly, B. T., McCutcheon, J. P., Capel, M. S. und Ramakrishnan, V.**, "Structure of a bacterial 30S ribosomal subunit at 5.5 Å resolution" (1999), *Nature*, 400: 833-40.
- Conti, E. und Izaurralde, E.**, "Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age" (2001), *Curr Opin Cell Biol*, 13: 310-9.

- Coutavas, E., Ren, M., Oppenheim, J. D., D'Eustachio, P. und Rush, M. G., "Characterization of proteins that interact with the cell-cycle regulatory protein Ran/TC4" (1993), *Nature*, 366: 585-7.
- Dechampsme, A. M., Koroleva, O., Leger-Silvestre, I., Gas, N. und Camier, S., "Assembly of 5S ribosomal RNA is required at a specific step of the pre-rRNA processing pathway" (1999), *J Cell Biol*, 145: 1369-80.
- Dingwall, C. und Laskey, R. A., "Nuclear targeting sequences--a consensus?" (1991), *Trends Biochem Sci*, 16: 478-81.
- Dingwall, C., Robbins, J. und Dilworth, S. M., "Characterisation of the nuclear location sequence of Xenopus nucleoplamin" (1989), *J Cell Sci Suppl*, 11: 243-8.
- Do, H., Song, H., Yang, H., Kim, D., Kim, N., Kim, J., Cha, K., Chung, H. und Kim, J., "Identification of multiple nuclear localization signals in murine Elf3, an ETS transcription factor" (2006), *FEBS Lett*, 580: 1865-71.
- Duverger, E., Pellerin-Mendes, C., Mayer, R., Roche, A. C. und Monsigny, M., "Nuclear import of glycoconjugates is distinct from the classical NLS pathway" (1995), *J Cell Sci*, 108 (Pt 4): 1325-32.
- Dworetzky, S. I., Lanford, R. E. und Feldherr, C. M., "The effects of variations in the number and sequence of targeting signals on nuclear uptake" (1988), *J Cell Biol*, 107: 1279-87.
- Fahrenkrog, B., "The nuclear pore complex, nuclear transport, and apoptosis" (2006), *Can J Physiol Pharmacol*, 84: 279-86.
- Fankhauser, C., Izaurralde, E., Adachi, Y., Wingfield, P. und Laemmli, U. K., "Specific complex of human immunodeficiency virus type 1 rev and nucleolar B23 proteins: dissociation by the Rev response element" (1991), *Mol Cell Biol*, 11: 2567-75.
- Fisher, E. M., Beer-Romero, P., Brown, L. G., Ridley, A., McNeil, J. A., Lawrence, J. B., Willard, H. F., Bieber, F. R. und Page, D. C., "Homologous ribosomal protein genes on the human X and Y chromosomes: escape from X inactivation and possible implications for Turner syndrome" (1990), *Cell*, 63: 1205-18.
- Flotow, H. und Thomas, G., "Substrate recognition determinants of the mitogen-activated 70K S6 kinase from rat liver" (1992), *J Biol Chem*, 267: 3074-8.
- Fornierod, M., Ohno, M., Yoshida, M. und Mattaj, I. W., "CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals" (1997), *Cell*, 90: 1051-60.
- Fournier, M. J. und Maxwell, E. S., "The nucleolar snRNAs: catching up with the spliceosomal snRNAs" (1993), *Trends Biochem Sci*, 18: 131-5.
- Frank, J., Zhu, J., Penczek, P., Li, Y., Srivastava, S., Verschoor, A., Radermacher, M., Grassucci, R., Lata, R. K. und Agrawal, R. K., "A model of protein synthesis based on cryo-electron microscopy of the E. coli ribosome" (1995), *Nature*, 376: 441-4.
- Frey, S., Richter, R. P. und Gorlich, D., "FG-rich repeats of nuclear pore proteins form a three-dimensional meshwork with hydrogel-like properties" (2006), *Science*, 314: 815-7.

- Fried, H. und Kutay, U., "Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory" (2003), *Cell Mol Life Sci*, 60: 1659-88.
- Fujiwara, T., Suzuki, S., Kanno, M., Sugiyama, H., Takahashi, H. und Tanaka, J., "Mapping a nucleolar targeting sequence of an RNA binding nucleolar protein, Nop25" (2006), *Exp Cell Res*, 312: 1703-12.
- Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M. und Nishida, E., "CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal" (1997), *Nature*, 390: 308-11.
- Gadal, O., Strauss, D., Kessl, J., Trumpower, B., Tollervey, D. und Hurt, E., "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" (2001), *Mol Cell Biol*, 21: 3405-15.
- Garcia-Bustos, J., Heitman, J. und Hall, M. N., "Nuclear protein localization" (1991), *Biochim Biophys Acta*, 1071: 83-101.
- Gerace, L. und Burke, B., "Functional organization of the nuclear envelope" (1988), *Annu Rev Cell Biol*, 4: 335-74.
- Gerace, L. und Foisner, R., "Integral membrane proteins and dynamic organization of the nuclear envelope" (1994), *Trends Cell Biol*, 4: 127-31.
- Grandi, P., Rybin, V., Bassler, J., Petfalski, E., Strauss, D., Marzioch, M., Schafer, T., Kuster, B., Tschochner, H., Tollervey, D., Gavin, A. C. und Hurt, E., "90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors" (2002), *Mol Cell*, 10: 105-15.
- Granneman, S. und Baserga, S. J., "Ribosome biogenesis: of knobs and RNA processing" (2004), *Exp Cell Res*, 296: 43-50.
- Gritz, L., Abovich, N., Teem, J. L. und Rosbash, M., "Posttranscriptional regulation and assembly into ribosomes of a *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal protein-beta-galactosidase fusion" (1985), *Mol Cell Biol*, 5: 3436-42.
- Gustafson, W. C., Taylor, C. W., Valdez, B. C., Henning, D., Phippard, A., Ren, Y., Busch, H. und Durban, E., "Nucleolar protein p120 contains an arginine-rich domain that binds to ribosomal RNA" (1998), *Biochem J*, 331 (Pt 2): 387-93.
- Görlich, D., Henklein, P., Laskey, R. A. und Hartmann, E., "A 41 amino acid motif in importin-alpha confers binding to importin-beta and hence transit into the nucleus" (1996a), *EMBO J*, 15: 1810-7. (a)
- Görlich, D., Kostka, S., Kraft, R., Dingwall, C., Laskey, R. A., Hartmann, E. und Prehn, S., "Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope" (1995a), *Curr Biol*, 5: 383-92. (a)
- Görlich, D., Pante, N., Kutay, U., Aebi, U. und Bischoff, F. R., "Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import" (1996b), *EMBO J*, 15: 5584-94. (b)
- Görlich, D., Vogel, F., Mills, A. D., Hartmann, E. und Laskey, R. A., "Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import" (1995b), *Nature*, 377: 246-8. (b)

- Görlich, D., "Transport into and out of the cell nucleus" (1998), *EMBO J*, 17: 2721-7.
- Hadjiolov, A. A., *The nucleolus and ribosome biogenesis*, Wien [u.a.]: Springer, 1985.
- Hall, M. N., Craik, C. und Hiraoka, Y., "Homeodomain of yeast repressor alpha 2 contains a nuclear localization signal" (1990), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 6954-8.
- Haupt, S., Stroganova, T., Ryabov, E., Kim, S. H., Fraser, G., Duncan, G., Mayo, M. A., Barker, H. und Taliansky, M., "Nucleolar localization of potato leafroll virus capsid proteins" (2005), *J Gen Virol*, 86: 2891-6.
- Haynes, S. R., "The RNP motif protein family" (1992), *New Biol*, 4: 421-9.
- Heinze, H., Arnold, H. H., Fischer, D. und Kruppa, J., "The primary structure of the human ribosomal protein S6 derived from a cloned cDNA" (1988), *J Biol Chem*, 263: 4139-44.
- Henderson, A. S., Warburton, D. und Atwood, K. C., "Letter: Ribosomal DNA connectives between human acrocentric chromosomes" (1973), *Nature*, 245: 95-7.
- Ho, J. H., Kallstrom, G. und Johnson, A. W., "Nmd3p is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit" (2000), *J Cell Biol*, 151: 1057-66.
- Hood, J. K. und Silver, P. A., "In or out? Regulating nuclear transport" (1999), *Curr Opin Cell Biol*, 11: 241-7.
- Hubner, S., Xiao, C. Y. und Jans, D. A., "The protein kinase CK2 site (Ser111/112) enhances recognition of the simian virus 40 large T-antigen nuclear localization sequence by importin" (1997), *J Biol Chem*, 272: 17191-5.
- Hurt, E., Hannus, S., Schmelzl, B., Lau, D., Tollervey, D. und Simos, G., "A novel in vivo assay reveals inhibition of ribosomal nuclear export in ran-cycle and nucleoporin mutants" (1999), *J Cell Biol*, 144: 389-401.
- Huxford, T., Huang, D. B., Malek, S. und Ghosh, G., "The crystal structure of the I κ B α /NF- κ B complex reveals mechanisms of NF- κ B inactivation" (1998), *Cell*, 95: 759-70.
- Imamoto, N., Tachibana, T., Matsubae, M. und Yoneda, Y., "A karyophilic protein forms a stable complex with cytoplasmic components prior to nuclear pore binding" (1995), *J Biol Chem*, 270: 8559-65.
- Inouye, S. und Tsuji, F. I., "Evidence for redox forms of the Aequorea green fluorescent protein" (1994), *FEBS Lett*, 351: 211-4.
- Izaurrealde, E. und Mattaj, I. W., "RNA export" (1995), *Cell*, 81: 153-9.
- Izaurrealde, E., Kutay, U., von Kobbe, C., Mattaj, I. W. und Görlich, D., "The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus" (1997), *EMBO J*, 16: 6535-47.
- Jarrous, N., Wolenski, J. S., Wesolowski, D., Lee, C. und Altman, S., "Localization in the nucleolus and coiled bodies of protein subunits of the ribonucleoprotein ribonuclease P" (1999), *J Cell Biol*, 146: 559-72.

- Johnson, A. W., Lund, E. und Dahlberg, J.,** "Nuclear export of ribosomal subunits" (2002), *Trends Biochem Sci*, 27: 580-5.
- Jäkel, S. und Görlich, D.,** "Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells" (1998), *EMBO J*, 17: 4491-502.
- Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D. und Smith, A. E.,** "A short amino acid sequence able to specify nuclear location" (1984), *Cell*, 39: 499-509.
- Kass, S., Tyc, K., Steitz, J. A. und Sollner-Webb, B.,** "The U3 small nucleolar ribonucleoprotein functions in the first step of preribosomal RNA processing" (1990), *Cell*, 60: 897-908.
- Katahira, R., Flotow, H., Thomas, G. und Nosaka, A. Y.,** "Solution structure of the phosphorylated sites of ribosomal protein S6 by ¹H NMR spectroscopy" (1996), *Int J Pept Protein Res*, 47: 282-8.
- Keminer, O. und Peters, R.,** "Permeability of single nuclear pores" (1999), *Biophys J*, 77: 217-28.
- Kenmochi, N., Kawaguchi, T., Rozen, S., Davis, E., Goodman, N., Hudson, T. J., Tanaka, T. und Page, D. C.,** "A map of 75 human ribosomal protein genes" (1998), *Genome Res*, 8: 509-23.
- Kiledjian, M. und Dreyfuss, G.,** "Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box" (1992), *EMBO J*, 11: 2655-64.
- Kim, D. E., Chivian, D. und Baker, D.,** "Protein structure prediction and analysis using the Robetta server" (2004), *Nucleic Acids Res*, 32: W526-31.
- Kim, T., Jang, C., Kim, H. D., Lee, J. Y., Ahn, B. und Kim, J.,** "Interaction of Hsp90 with ribosomal proteins protects from ubiquitination and proteasome-dependent degradation" (2006), *Mol Biol Cell*, 17: 824-33.
- Knippers, R.,** *Molekulare Genetik*, Stuttgart [u.a.]: Thieme, 2001.
- Kubota, S., Siomi, H., Satoh, T., Endo, S., Maki, M. und Hatanaka, M.,** "Functional similarity of HIV-I rev and HTLV-I rex proteins: identification of a new nucleolar-targeting signal in rev protein" (1989), *Biochem Biophys Res Commun*, 162: 963-70.
- Kundu-Michalik, S.,** *Nucleolusbindende Domäne im humanen ribosomalen S6-Protein*, 1997.
- Kutay, U., Bischoff, F. R., Kostka, S., Kraft, R. und Gorlich, D.,** "Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor" (1997), *Cell*, 90: 1061-71.
- Kuzumaki, T., Tanaka, T., Ishikawa, K. und Ogata, K.,** "Rat ribosomal protein L35a multigene family: molecular structure and characterization of three L35a-related pseudogenes" (1987), *Biochim Biophys Acta*, 909: 99-106.
- Kyte, J. und Doolittle, R. F.,** "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein" (1982), *J Mol Biol*, 157: 105-32.
- Lake, J. A.,** "Ribosome structure determined by electron microscopy of *Escherichia coli* small subunits, large subunits and monomeric ribosomes" (1976),

J Mol Biol, 105: 131-9.

Lanford, R. E., Kanda, P. und Kennedy, R. C., "Induction of nuclear transport with a synthetic peptide homologous to the SV40 T antigen transport signal" (1986), *Cell*, 46: 575-82.

Leger-Silvestre, I., Milkereit, P., Ferreira-Cerca, S., Saveanu, C., Rousselle, J., Choismel, V., Guinefoleau, C., Gas, N. und Gleizes, P., "The ribosomal protein Rps15p is required for nuclear exit of the 40S subunit precursors in yeast" (2004), *EMBO J*, 23: 2336-47.

Lin, E., Lin, S. W. und Lin, A., "The participation of 5S rRNA in the co-translational formation of a eukaryotic 5S ribonucleoprotein complex" (2001), *Nucleic Acids Res*, 29: 2510-6.

Lipsius, E. *Nuclearer Import und nucleolare Akkumulation des ribosomalen S6-Proteins*, 1998.

Lipsius, E., Walter, K., Leicher, T., Phlippen, W., Bisotti, M. A. und Kruppa, J., "Evolutionary conservation of nuclear and nucleolar targeting sequences in yeast ribosomal protein S6A" (2005), *Biochem Biophys Res Commun*, 333: 1353-60.

Lodish, H., *Molecular cell biology*, New York, NY [u.a.]: Freeman, 2000.

Lomholt, B., Frederiksen, S., Nielsen, J. N. und Hallenberg, C., "Additional assignment of the human 5S rRNA genes to chromosome region 1q31" (1995), *Cytogenet Cell Genet*, 70: 76-9.

Long, E. O. und Dawid, I. B., "Repeated genes in eukaryotes" (1980), *Annu Rev Biochem*, 49: 727-64.

Maden, T., "Ribosomal RNA. Click here for methylation" (1996), *Nature*, 383: 675-6.

Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L. und Melchior, F., "A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2" (1997), *Cell*, 88: 97-107.

Marion, M. J. und Marion, C., "Localization of ribosomal proteins on the surface of mammalian 60S ribosomal subunits by means of immobilized enzymes. Correlation with chemical cross-linking data" (1987), *Biochem Biophys Res Commun*, 149: 1077-83.

Marion, M. J. und Marion, C., "Ribosomal proteins S2, S6, S10, S14, S15 and S25 are localized on the surface of mammalian 40 S subunits and stabilize their conformation. A study with immobilized trypsin" (1988), *FEBS Lett*, 232: 281-5.

Matunis, M. J., Coutavas, E. und Blobel, G., "A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex" (1996), *J Cell Biol*, 135: 1457-70.

Mazelis, A. G. und Petermann, M. L., "Physical-chemical properties of stable yeast ribosomes and ribosomal subunits" (1973), *Biochim Biophys Acta*, 312: 111-21.

Melchior, F., Paschal, B., Evans, J. und Gerace, L., "Inhibition of nuclear protein import by nonhydrolyzable analogues of GTP and identification of the small

- GTPase Ran/TC4 as an essential transport factor" (1993), *J Cell Biol*, 123: 1649-59.
- Melese, T. und Xue, Z.**, "The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome" (1995), *Curr Opin Cell Biol*, 7: 319-24.
- Michael, W. M. und Dreyfuss, G.**, "Distinct domains in ribosomal protein L5 mediate 5 S rRNA binding and nucleolar localization" (1996), *J Biol Chem*, 271: 11571-4.
- Milkereit, P., Strauss, D., Bassler, J., Gadal, O., Kuhn, H., Schutz, S., Gas, N., Lechner, J., Hurt, E. und Tschochner, H.**, "A Noc complex specifically involved in the formation and nuclear export of ribosomal 40 S subunits" (2003a), *J Biol Chem*, 278: 4072-81. (a)
- Milkereit, P., Strauss, D., Bassler, J., Gadal, O., Kuhn, H., Schutz, S., Gas, N., Lechner, J., Hurt, E. und Tschochner, H.**, "A Noc complex specifically involved in the formation and nuclear export of ribosomal 40 S subunits" (2003b), *J Biol Chem*, 278: 4072-81. (b)
- Moore, M. S. und Blobel, G.**, "The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus" (1993), *Nature*, 365: 661-3.
- Moore, P. B.**, "The ribosome at atomic resolution" (2001), *Biochemistry*, 40: 3243-50.
- Moreland, R. B., Nam, H. G., Hereford, L. M. und Fried, H. M.**, "Identification of a nuclear localization signal of a yeast ribosomal protein" (1985), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82: 6561-5.
- Morimoto, T., Blobel, G. und Sabatini, D. D.**, "Ribosome crystallization in chicken embryos. I. Isolation, characterization, and in vitro activity of ribosome tetramers" (1972), *J Cell Biol*, 52: 338-54.
- Moroianu, J. und Riordan, J. F.**, "Identification of the nucleolar targeting signal of human angiogenin" (1994), *Biochem Biophys Res Commun*, 203: 1765-72.
- Moroianu, J., Hijikata, M., Blobel, G. und Radu, A.**, "Mammalian karyopherin alpha 1 beta and alpha 2 beta heterodimers: alpha 1 or alpha 2 subunit binds nuclear localization signal and beta subunit interacts with peptide repeat-containing nucleoporins" (1995), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 6532-6.
- Morton, N. E.**, "Parameters of the human genome" (1991), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 7474-6.
- Murdoch, K. J. und Allison, L. A.**, "A role for ribosomal protein L5 in the nuclear import of 5S rRNA in *Xenopus* oocytes" (1996), *Exp Cell Res*, 227: 332-43.
- Nagai, K., Oubridge, C., Ito, N., Avis, J. und Evans, P.**, "The RNP domain: a sequence-specific RNA-binding domain involved in processing and transport of RNA" (1995), *Trends Biochem Sci*, 20: 235-40.
- Nigg, E. A.**, "Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation" (1997), *Nature*, 386: 779-87.
- Nissan, T. A., Bassler, J., Petfalski, E., Tollervey, D. und Hurt, E.**, "60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm" (2002), *EMBO J*, 21: 5539-47.

- Nomura, M.**, "Assembly of bacterial ribosomes" (1973), *Science*, 179: 864-73.
- Ohtsubo, M., Okazaki, H. und Nishimoto, T.**, "The RCC1 protein, a regulator for the onset of chromosome condensation locates in the nucleus and binds to DNA" (1989), *J Cell Biol*, 109: 1389-97.
- Oshima, A., Tsuji, A., Nagao, Y., Sakuraba, H. und Suzuki, Y.**, "Cloning, sequencing, and expression of cDNA for human beta-galactosidase" (1988), *Biochem Biophys Res Commun*, 157: 238-44.
- Pante, N. und Aebi, U.**, "Molecular dissection of the nuclear pore complex" (1996b), *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 31: 153-99. (b)
- Pante, N. und Aebi, U.**, "Toward the molecular dissection of protein import into nuclei" (1996a), *Curr Opin Cell Biol*, 8: 397-406. (a)
- Pante, N. und Kann, M.**, "Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm" (2002), *Mol Biol Cell*, 13: 425-34.
- Peters, R.**, "Translocation through the nuclear pore complex: selectivity and speed by reduction-of-dimensionality" (2005), *Traffic*, 6: 421-7.
- Pittman, R. H., Andrews, M. T. und Setzer, D. R.**, "A feedback loop coupling 5 S rRNA synthesis to accumulation of a ribosomal protein" (1999), *J Biol Chem*, 274: 33198-201.
- Planta, R. J. und Mager, W. H.**, "The list of cytoplasmic ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*" (1998), *Yeast*, 14: 471-7.
- Pollard, V. W., Michael, W. M., Nakielny, S., Siomi, M. C., Wang, F. und Dreyfuss, G.**, "A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway" (1996), *Cell*, 86: 985-94.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. und Cormier, M. J.**, "Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein" (1992), *Gene*, 111: 229-33.
- Quaye, I. K., Toku, S. und Tanaka, T.**, "Sequence requirement for nucleolar localization of rat ribosomal protein L31" (1996), *Eur J Cell Biol*, 69: 151-5.
- Rapoport, T. A., Jungnickel, B. und Kutay, U.**, "Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes" (1996), *Annu Rev Biochem*, 65: 271-303.
- Raska, I., Shaw, P. J. und Cmarko, D.**, "Structure and function of the nucleolus in the spotlight" (2006), *Curr Opin Cell Biol*, 18: 325-34.
- Reed, M. L., Dove, B. K., Jackson, R. M., Collins, R., Brooks, G. und Hiscox, J. A.**, "Delineation and modelling of a nucleolar retention signal in the coronavirus nucleocapsid protein" (2006), *Traffic*, 7: 833-48.
- Rexach, M. und Blobel, G.**, "Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins" (1995), *Cell*, 83: 683-92.
- Ribbeck, K. und Gorlich, D.**, "Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes" (2001a), *EMBO J*, 20: 1320-30. (a)

- Ribbeck, K. und Gorlich, D., "Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes" (2001b), *EMBO J*, 20: 1320-30. (b)
- Ribbeck, K., Kutay, U., Paraskeva, E. und Gorlich, D., "The translocation of transportin-cargo complexes through nuclear pores is independent of both Ran and energy" (1999), *Curr Biol*, 9: 47-50.
- Ribbeck, K., Lipowsky, G., Kent, H. M., Stewart, M. und Gorlich, D., "NTF2 mediates nuclear import of Ran" (1998), *EMBO J*, 17: 6587-98.
- Richards, S. A., Lounsbury, K. M., Carey, K. L. und Macara, I. G., "A nuclear export signal is essential for the cytosolic localization of the Ran binding protein, RanBP1" (1996), *J Cell Biol*, 134: 1157-68.
- Rosorius, O., Fries, B., Stauber, R. H., Hirschmann, N., Bevec, D. und Hauber, J., "Human ribosomal protein L5 contains defined nuclear localization and export signals" (2000), *J Biol Chem*, 275: 12061-8.
- Rouquette, J., Choemmel, V. und Gleizes, P., "Nuclear export and cytoplasmic processing of precursors to the 40S ribosomal subunits in mammalian cells" (2005), *EMBO J*, 24: 2862-72.
- Rout, M. P. und Wenthe, S. R., "Pores for thought: nuclear pore complex proteins" (1994), *Trends Cell Biol*, 4: 357-65.
- Rout, M. P., Aitchison, J. D., Suprapto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y. und Chait, B. T., "The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism" (2000), *J Cell Biol*, 148: 635-51.
- Rout, M. P., Blobel, G. und Aitchison, J. D., "A distinct nuclear import pathway used by ribosomal proteins" (1997), *Cell*, 89: 715-25.
- Rudt, F. und Pieler, T., "Cytoplasmic retention and nuclear import of 5S ribosomal RNA containing RNPs" (1996), *EMBO J*, 15: 1383-91.
- Russo, G., Ricciardelli, G. und Pietropaolo, C., "Different domains cooperate to target the human ribosomal L7a protein to the nucleus and to the nucleoli" (1997), *J Biol Chem*, 272: 5229-35.
- Scanlon, M. J., Fairlie, D. P., Craik, D. J., Englebretsen, D. R. und West, M. L., "NMR solution structure of the RNA-binding peptide from human immunodeficiency virus (type 1) Rev" (1995), *Biochemistry*, 34: 8242-9.
- Schaap, P. J., van't Riet, J., Woldringh, C. L. und Raue, H. A., "Identification and functional analysis of the nuclear localization signals of ribosomal protein L25 from *Saccharomyces cerevisiae*" (1991), *J Mol Biol*, 221: 225-37.
- Schatz, G. und Dobberstein, B., "Common principles of protein translocation across membranes" (1996), *Science*, 271: 1519-26.
- Scheer, U. und Benavente, R., "Functional and dynamic aspects of the mammalian nucleolus" (1990), *Bioessays*, 12: 14-21.
- Scherl, A., Coute, Y., Deon, C., Calle, A., Kindbeiter, K., Sanchez, J., Greco, A., Hochstrasser, D. und Diaz, J., "Functional proteomic analysis of human nucleolus" (2002), *Mol Biol Cell*, 13: 4100-9.
- Schlenstedt, G., Smirnova, E., Deane, R., Solsbacher, J., Kutay, U., Gorlich, D.,

- Ponstingl, H. und Bischoff, F. R.**, "Yrb4p, a yeast ran-GTP-binding protein involved in import of ribosomal protein L25 into the nucleus" (1997), *EMBO J*, 16: 6237-49.
- Schlutzen, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F. und Yonath, A.**, "Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution" (2000), *Cell*, 102: 615-23.
- Schmidt, C., Lipsius, E. und Kruppa, J.**, "Nuclear and nucleolar targeting of human ribosomal protein S6" (1995), *Mol Biol Cell*, 6: 1875-85.
- Schwarzacher, H. G. und Mosgoeller, W.**, "Ribosome biogenesis in man: current views on nucleolar structures and function" (2000), *Cytogenet Cell Genet*, 91: 243-52.
- Shaulsky, G., Goldfinger, N., Ben-Ze'ev, A. und Rotter, V.**, "Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis" (1990), *Mol Cell Biol*, 10: 6565-77.
- Shaw, P. J. und Jordan, E. G.**, "The nucleolus" (1995), *Annu Rev Cell Dev Biol*, 11: 93-121.
- Silver, P. A.**, "How proteins enter the nucleus" (1991), *Cell*, 64: 489-97.
- Simons, K. T., Kooperberg, C., Huang, E. und Baker, D.**, "Assembly of protein tertiary structures from fragments with similar local sequences using simulated annealing and Bayesian scoring functions" (1997), *J Mol Biol*, 268: 209-25.
- Siomi, H., Shida, H., Maki, M. und Hatanaka, M.**, "Effects of a highly basic region of human immunodeficiency virus Tat protein on nucleolar localization" (1990), *J Virol*, 64: 1803-7.
- Smith, A., Brownawell, A. und Macara, I. G.**, "Nuclear import of Ran is mediated by the transport factor NTF2" (1998), *Curr Biol*, 8: 1403-6.
- Sorensen, P. D., Lomholt, B., Frederiksen, S. und Tommerup, N.**, "Fine mapping of human 5S rRNA genes to chromosome 1q42.11---q42.13" (1991), *Cytogenet Cell Genet*, 57: 26-9.
- Spahn, C. M. T., Jan, E., Mulder, A., Grassucci, R. A., Sarnow, P. und Frank, J.**, "Cryo-EM visualization of a viral internal ribosome entry site bound to human ribosomes: the IRES functions as an RNA-based translation factor" (2004), *Cell*, 118: 465-75.
- Srivastava, S., Verschoor, A., Radermacher, M., Grassucci, R. und Frank, J.**, "Three-dimensional reconstruction of mammalian 40 S ribosomal subunit embedded in ice" (1995), *J Mol Biol*, 245: 461-6.
- Stade, K., Ford, C. S., Guthrie, C. und Weis, K.**, "Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor" (1997), *Cell*, 90: 1041-50.
- Stage-Zimmermann, T., Schmidt, U. und Silver, P. A.**, "Factors affecting nuclear export of the 60S ribosomal subunit in vivo" (2000), *Mol Biol Cell*, 11: 3777-89.
- Steitz, J. A., Berg, C., Hendrick, J. P., La Branche-Chabot, H., Metspalu, A., Rinke, J. und Yario, T.**, "A 5S rRNA/L5 complex is a precursor to ribosome assembly in

mammalian cells" (1988), *J Cell Biol*, 106: 545-56.

Stoffler, D., Goldie, K. N., Feja, B. und Aebi, U., "Calcium-mediated structural changes of native nuclear pore complexes monitored by time-lapse atomic force microscopy" (1999), *J Mol Biol*, 287: 741-52.

Thomas, F. und Kutay, U., "Biogenesis and nuclear export of ribosomal subunits in higher eukaryotes depend on the CRM1 export pathway" (2003), *J Cell Sci*, 116: 2409-19.

Timmers, A. C., Stuger, R., Schaap, P. J., van 't Riet, J. und Raue, H. A., "Nuclear and nucleolar localization of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal proteins S22 and S25" (1999), *FEBS Lett*, 452: 335-40.

Tocilj, A., Schlunzen, F., Janell, D., Gluhmann, M., Hansen, H. A., Harms, J., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F. und Yonath, A., "The small ribosomal subunit from *Thermus thermophilus* at 4.5 Å resolution: pattern fittings and the identification of a functional site" (1999), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 14252-7.

Todorov, I. T., Noll, F. und Hadjiolov, A. A., "The sequential addition of ribosomal proteins during the formation of the small ribosomal subunit in Friend erythroleukemia cells" (1983), *Eur J Biochem*, 131: 271-5.

Tsay, Y. F., Thompson, J. R., Rotenberg, M. O., Larkin, J. C. und Woolford, J. L. J., "Ribosomal protein synthesis is not regulated at the translational level in *Saccharomyces cerevisiae*: balanced accumulation of ribosomal proteins L16 and rp59 is mediated by turnover of excess protein" (1988), *Genes Dev*, 2: 664-76.

Tschochner, H. und Hurt, E., "Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm" (2003), *Trends Cell Biol*, 13: 255-63.

Underwood, M. R. und Fried, H. M., "Characterization of nuclear localizing sequences derived from yeast ribosomal protein L29" (1990), *EMBO J*, 9: 91-9.

Valdez, B. C., Perlaky, L., Henning, D., Saijo, Y., Chan, P. K. und Busch, H., "Identification of the nuclear and nucleolar localization signals of the protein p120. Interaction with translocation protein B23" (1994), *J Biol Chem*, 269: 23776-83.

Verschoor, A., Srivastava, S., Grassucci, R. und Frank, J., "Native 3D structure of eukaryotic 80s ribosome: morphological homology with *E. coli* 70S ribosome" (1996), *J Cell Biol*, 133: 495-505.

Verschoor, A., Warner, J. R., Srivastava, S., Grassucci, R. A. und Frank, J., "Three-dimensional structure of the yeast ribosome" (1998), *Nucleic Acids Res*, 26: 655-61.

Walter, K., *Signale für den Kernimport und die Nucleus Akkumulation im ribosomalen Protein S10 aus *Saccharomyces cerevisiae**, 2000.

Walther, T. C., Pickersgill, H. S., Cordes, V. C., Goldberg, M. W., Allen, T. D., Mattaj, I. W. und Fornerod, M., "The cytoplasmic filaments of the nuclear pore complex are dispensable for selective nuclear protein import" (2002), *J Cell Biol*, 158: 63-77.

Warner, J. R., "The economics of ribosome biosynthesis in yeast" (1999), *Trends*

Biochem Sci, 24: 437-40.

Warner, J. R., "The nucleolus and ribosome formation" (1990), *Curr Opin Cell Biol*, 2: 521-7.

Weis, K., Ryder, U. und Lamond, A. I., "The conserved amino-terminal domain of hSRP1 alpha is essential for nuclear protein import" (1996), *EMBO J*, 15: 1818-25.

Wen, W., Meinkoth, J. L., Tsien, R. Y. und Taylor, S. S., "Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus" (1995), *Cell*, 82: 463-73.

Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Clemons, W. M. J., Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., Vornheim, C., Hartsch, T. und Ramakrishnan, V., "Structure of the 30S ribosomal subunit" (2000), *Nature*, 407: 327-39.

Wool, I., Chan, Y., Glück, A., *Translational control*, Plainview, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996.

Worton, R. G., Sutherland, J., Sylvester, J. E., Willard, H. F., Bodrug, S., Dube, I., Duff, C., Kean, V., Ray, P. N. und Schmickel, R. D., "Human ribosomal RNA genes: orientation of the tandem array and conservation of the 5' end" (1988), *Science*, 239: 64-8.

Xiao, C. Y., Jans, P. und Jans, D. A., "Negative charge at the protein kinase CK2 site enhances recognition of the SV40 large T-antigen NLS by importin: effect of conformation" (1998), *FEBS Lett*, 440: 297-301.

Xue, Z. und Melese, T., "Nucleolar proteins that bind NLSs: a role in nuclear import or ribosome biogenesis?" (1994), *Trends Cell Biol*, 4: 414-7.

Yonath, A., Tesche, B., Lorenz, S., Mussig, J., Erdmann, V. A. und Wittmann, H. G., "Several crystal forms of the *Bacillus stearothermophilus* 50 S ribosomal particles" (1983), *FEBS Lett*, 154: 15-20.

Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H. und Noller, H. F., "Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution" (2001), *Science*, 292: 883-96.

8 Anhang

8.1 Der genetische Code

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V	
	Ala	Arg	Asn	Asp	Cys	Gln	Glu	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val	
5`	GCA	CGA	AAC	GAC	TGC	CAA	GAA	GGA	CAC	ATA	CTA	AAA	ATG	TTC	CCA	TCA	ACA	TGG	TAC	GTA	3`
	C	C	T	T	T	G	G	C	T	C	C	G		T	C	C	C		T	C	
	G	G					G			T	G				G	G	G				G
	T	T						T			T				T	T	T				T
		AGA									TTA					AGC					
		G									G					T					

8.2 Stoppcodons

TAA (Ochre)

TAG (Amber)

TGA (Opal)

8.3 Aminosäuren im Ein- und Dreibuchstaben-Code

Aminosäure	Dreibuchstaben-Code	Einbuchstaben-Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutamat	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V