

**Essentielle, funktionelle Domänen im
ribosomalen S6-Protein der Eukarya
für den Aufbau ribosomaler 40S-Partikel**

DISSERTATION

**Zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften am Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften der Universität Hamburg**

vorgelegt von

Thomas Arno Klokow

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. BRETTING
Tag der Disputation: 02. November 2007

Hamburg, den 18. Oktober 2007




Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

Für Karin und Arno

„Nicht weil die Dinge schwierig sind, wagen wir sie nicht,
sondern weil wir sie nicht wagen, sind sie schwierig.“

lat.: *"Non quia difficilia sunt non audemus,
sed quia non audemus difficilia sunt."*

Epistulae morales ad Lucilium XVII/XVIII, CIV, 26

[Lucius Annaeus Seneca](#) (um 4 v.Chr - 65 n.Chr.)

Mein besonders herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Joachim Kruppa, zum Ersten für die Bereitstellung des interessanten Themas, zum Zweiten für die Gutachterschaft der Arbeit und zum Dritten, weil er für mich und meine Fragen immer da war. Ein herzlicher Dank gebührt aber auch seiner Frau Dr. Antonie Kruppa, die mit interessanten Fachdiskussionen und Ihrem leckeren Essen zu den verschiedenen Anlässen dazu beigetragen hat, die Zeit im Arbeitskreis unendlich kurz erscheinen zu lassen.

Ein ganz besonderen Dank haben meine Eltern, Karin und Arno Klokow, meine Schwester Astrid und meine Frau Marianne verdient, weil ohne sie diese Arbeit in der vorliegenden Form nicht entstanden wäre, sie mich auch aus den tiefsten Motivationslöchern immer wieder hervorgeholt und zum Weitermachen animiert haben.

Großen Anteil am Gelingen der vorliegenden Arbeit hat Andreas Bauche, der mir vom technischen Anleiter im Labor zu einem echten Freund geworden ist.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Martina Donath, Dr. Swarupa Kundu-Michalik, Dr. Edgar Lipsius und Matthias Klee für deren Einführung in die Molekularbiologie, die Zellkultur und den allgemeinen Laboralltag sowie ihrer permanenten Hilfsbereitschaft.

Nicht vergessen möchte ich, mich zu bedanken bei allen Freunden, die namentlich hier nicht erwähnt werden, mich aber mit Diskussionen über Sinn und Unsinn einer Doktorarbeit immerzu ins normale Leben zurückgeholt haben und dabei die Motivation lieferten, diese Arbeit zu beenden.

I. INHALT

I.	Inhalt	6
II.	Zusammenfassung	10
1.	Einleitung.....	12
1.1	Der Zellkern.....	13
1.1.1	Die Kernmembran.....	13
1.1.2	Der Kernporenkomplex und Nucleoporine.....	14
1.2	Kernlokalisations-signale.....	16
1.2.1	Importsignale	16
1.2.2	Klassische Kernlokalisations-signale.....	16
1.2.3	Nicht-klassische Kernlokalisations-signale	17
1.2.4	Kernlokalisations-signale ribosomaler Proteine	18
1.2.5	Ribosomale Proteine aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
1.2.6	Ribosomale Proteine aus <i>Homo sapiens</i>	19
1.3	Nucleare Exportsignale.....	19
1.3.1	Nucleare Shuttle-Domänen.....	19
1.3.2	M9-Domäne	19
1.3.3	KNS-Domäne.....	20
1.4	Der nucleocytoplasmatische Transport.....	20
1.4.1	Importmechanismus klassischer NLS-Proteine	21
1.4.2	RanGTP/GDP-Zyklus	23
1.4.3	Importine und Exportine	24
1.4.4	Import ribosomaler Proteine	25
1.4.5	Export ribosomaler Untereinheiten.....	27
1.5	Der Nucleolus	28
1.5.1	Die nucleolare Struktur.....	28
1.5.2	Nucleologenese	29
1.5.3	Ribosomenbiogenese	29
1.5.4	Nucleolare Proteine.....	32
1.6	Nucleoluslokalisations-signale und nucleolare Bindungssequenzen.....	33
1.7	Das ribosomale Protein S6 aus <i>Homo sapiens</i> und das ribosomale Protein S6A aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35

1.8	Die Homologiedomäne als hochkonservierter Teil des rpS6	36
1.9	Das flexible C-terminale Phosphorylierungscluster im rpS6	36
2.	Aufgabenstellung	38
3.	Material und Methoden.....	40
3.1	Materialien	40
3.1.1	Chemikalien	40
3.1.2	Enzyme	40
3.1.3	Oligonucleotide.....	40
3.1.4	Antikörper	40
3.2	Biologisches Material	41
3.2.1	<i>Escherichia coli</i>	41
3.2.2	COS-Zellen	41
3.2.3	HeLa-Zellen	42
3.3	Reagenzien.....	42
3.4	Methoden	46
3.4.1	Molekularbiologie.....	46
3.4.2	DNA-Quantifizierung	46
3.4.3	PCR.....	47
3.4.4	Reinigung von PCR-Produkten	48
3.4.5	Modifizierung von DNA.....	49
3.4.6	Isolierung von Plasmid-DNA	50
3.4.7	DNA-Ligation	52
3.4.8	Transfektion von COS-Zellen.....	58
3.4.9	Nachweis von β -Galactosidase-Fusionsproteinen	61
3.4.10	Indirekte Immunfluoreszenz von β -Galactosidase-Fusionsproteinen	62
3.4.11	Nachweis von phosphoryliertem rpS6 mit phosphopeptid-spezifischen Antikörpern	63
3.4.12	WebLogo	64
3.5	Geräte.....	65
4.	Ergebnisse	67
4.1	Kernlokalisationsignale und nucleolare Bindungssequenzen im rpS6	67
4.2	Der Expressionsvektor pASH.....	68
4.3	Konstruktion des pASH-SV40-Vektors.....	70
4.4	Konstruktion von cDNA-Fragmenten mittels PCR	72

4.5	Klonierung von hrpS6- und yrpS6A-cDNA-Fragmenten in den pASH- und pASH-SV40-Vektor.....	73
4.6	Synchronisation von COS-Zellen in der G ₀ -Phase	74
4.7	Transiente Expression von β -Galactosidase-Fusionsproteinen in COS-Zellen.. ..	74
4.8	Detektion und Dokumentation von β -Galactosidase Fusionsproteinen	75
4.8.1	Lokalisation von β -Galactosidase.....	75
4.8.2	Lokalisation von SV40- β -Galactosidase	76
4.8.3	Das Konstrukt pASH-S6A(1-236).....	77
4.8.4	Die hochkonservierte nucleolare Bindungssequenz des hrpS6 und des yrpS6A im Bereich der Homologiedomäne	78
4.9	Vergleich der Homologiedomäne von verschiedenen Hefen	82
4.10	Das C-terminale, variable S6-Phosphorylierungscluster bei Vertebraten, Invertebraten und Hefen	84
4.11	Sind die drei Kernsignale vom rpS6 essentiell für die Bildung funktioneller ribosomaler 40S Untereinheiten ?.....	87
4.12	Der Phosphorylierungsgrad der nuclearen S6-Moleküle.....	90
4.13	Immunologischer Nachweis von rpS6 im Nucleolus	92
4.14	Subnucleolare Lokalisation von dephosphorylierten ribosomalen S6-Molekülen	94
5.	Diskussion.....	97
5.1	Strukturelle Homologie und evolutionär konservierte Aminosäuresequenzen im humanen rpS6 und Hefe rpS6A.....	97
5.2	Vergleich der Aminosäurezusammensetzung von yrpS6 und hrpS6.....	98
5.3	Hydrophathisches Profil von hrpS6 und yrpS6A	99
5.4	Physikochemische Eigenschaften von hrpS6 und yrpS6A.....	100
5.5	Quantifizierung von S6-Fusionskonstrukten in Subkompartimenten des Zellkerns	101
5.6	Die nucleolare Bindungssequenz (NoBiS) in der Homologiedomäne der ribosomalen Proteine hrpS6 und yrpS6A	102
5.7	Kernlokalisationssignale im ribosomalen S6A-Protein der Hefe.....	104
5.8	Bisher identifizierte Kernsignale und nucleolare Bindungssequenzen im hrpS6 und yrpS6A	106

5.9	Bedeutung der Tertiärstruktur von rpS6 für die Biogenese ribosomaler 40S-Partikel	111
5.10	Die flexible Phosphorylierungsdomäne am S6 C-Terminus	112
5.11	Lokalisation von dephosphorylierten ribosomalen S6-Molekülen im Nucleolus	113
6.	Anhang	116
6.1	Abkürzungen	116
6.2	PCR-Primer	118
6.3	Sequenzier-Primer	118
6.4	SV40-MCS-Oligonucleotide	118
6.5	S6-Konstrukte der Arbeitsgruppe	119
6.6	Blast Suche mit BLASTP 2.2.13	121
7.	Literatur	127
	Abbildungsverzeichnis	138
	Tabellenverzeichnis	140

II. ZUSAMMENFASSUNG

Funktionelle eukaryontische Ribosomen bestehen aus 40S- und 60S-Untereinheiten. Sie katalysieren als Ribozyme Peptidbindungen. Die Synthese ihrer vier strukturgebenden rRNA-Komponenten und der 80 ribosomalen Proteine findet in unterschiedlichen Zell-Kompartimenten statt. Neusynthetisierte ribosomale Proteine müssen aus dem Cytoplasma in den Zellkern importiert werden, um im Nucleolus, dem Ort der Ribosomen-Biogenese, zu akkumulieren. Die sehr hohe Zahl an Ribosomen in eukaryontischen Zellen erfordert einen schnellen Kernimport und hochspezifische Bindungssequenzen auf allen ribosomalen Proteinen, um mit entsprechenden rRNA-Strukturen in Wechselwirkung treten zu können.

Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass in dem S6-Protein der kleinen ribosomalen Untereinheit mehrere funktionelle Domänen enthalten sind: nucleare Lokalisationssignale (NLS), nucleolare Bindungssequenzen (NoBiS) und die C-terminalen Serin-Phosphorylierungsstellen. Die vorliegende Arbeit analysiert die Rolle dieser Domänen beim Aufbau des ribosomalen 40S-Partikels.

Die drei NLS des humanen S6-Proteins sind essentiell für die Bildung aktiver 40S-Untereinheiten. Die Deletion von zwei bzw. drei S6-Kernsignalen ermöglicht zwar den passiven Eintritt von S6 in den Kern mit anschließender Bindung im Nucleolus, führt jedoch nicht zu dessen Integration in neugebildete 40S-Untereinheiten.

Eine bisher unbekannte, nucleolare Bindungssequenz wurde in der „Homologiedomäne“ des S6-Proteins identifiziert und teilweise charakterisiert. Diese zentral gelegene NoBiS1 besitzt kein NLS. Die Deletion beider nucleolaren Bindungssequenzen von S6 ergibt ein Fragment, das ein Reporterprotein in den Zellkern dirigieren kann, jedoch nicht zur Nucleolus-Akkumulation führt. Die NoBiS von S6 sind evolutionär hochkonserviert, wie Sequenzvergleiche zeigen. Das S6-Protein bindet primär im Bereich der dichten fibrillaren Komponente (DFC) des Nucleolus, wie elektronenmikroskopische Aufnahmen unter Verwendung hochspezifischer S6-Antikörper demonstriert haben, dort findet laut Literatur ebenfalls die Prozessierung der 45S rRNA-Vorläufermoleküle statt.

Im Nucleolus gebundene S6-Moleküle sind überraschenderweise in serumstimulierten HeLa-Zellen nicht an ihrem C-terminalen Serincluster phosphoryliert, obwohl S6-Kinasen im Zellkern vorhanden sind. Voraussetzungen für die Integration des S6-Proteins in neugebildete 40S-Untereinheiten sind intakte Kernlokalisationssequenzen und nucleolare Bindungssequenzen sowie ein dephosphoryliertes C-terminales Serincluster.

1. EINLEITUNG

Während Prokaryontenzellen in der Regel nur ein einziges, von der Zellmembran umschlossenes Kompartiment darstellen, sind Eukaryontenzellen sehr viel stärker kompartimentiert. Bei Eukaryonten sind die subzellulären Organellen wie Zellkern, Mitochondrien, endoplasmatisches Reticulum, Golgi-Apparat, Lysosomen, Endosomen und Peroxisomen durch Membranen begrenzt (vgl. Abb. 1.1). Membranen stellen hochorganisierte Aggregate aus Lipiden und Proteinen dar, die als Barrieren die Zusammensetzung des intrazellulären Milieus kontrollieren. Der Austausch von Makromolekülen erfolgt durch in die Membran eingebettete Pumpen und Kanäle, die den Transport spezifischer Moleküle ermöglichen. Nach Aufklärung der subzellulären Struktur und der unterschiedlichen Proteinausstattung der Organellen blieb es lange Zeit ein Rätsel, wie die Proteine, die alle gleichermaßen an den Ribosomen synthetisiert werden, selektiv in die einzelnen Organellen gelangen können.

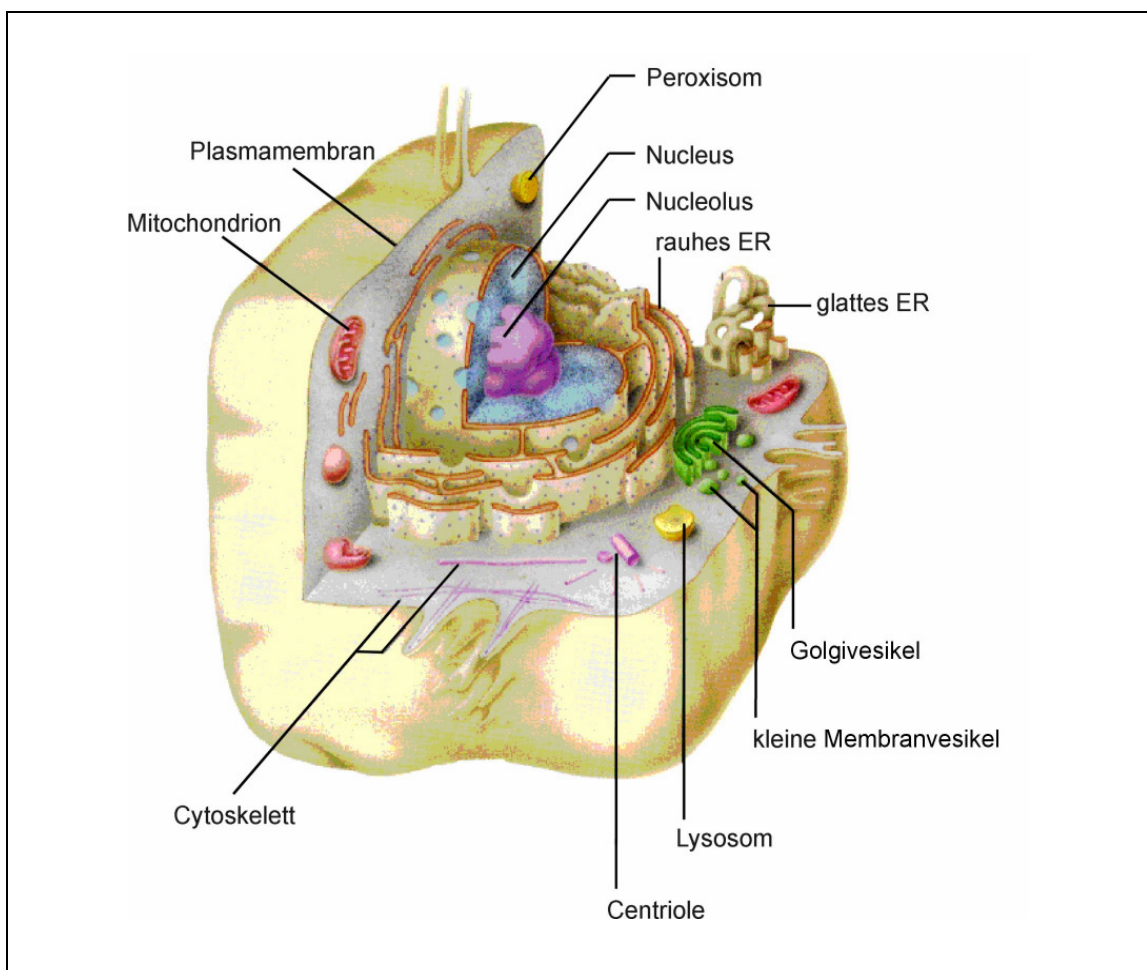


Abb. 1.1 Schematische Darstellung einer eukaryontischen Zelle.

Mit seiner erstmals im Jahre 1971 formulierten „Signalhypothese“ gab Günter Blobel den Anstoß zur Beantwortung dieser Frage. Nach der „Signalhypothese“ tragen Proteine spezifische Signalsequenzen, die für die Adressierung und den Transport zu den einzelnen Organellen verantwortlich sind. Günter Blobel ist 1999 für die von ihm entwickelte „Signalhypothese“ und dem Nachweis, dass „Proteine eingebaute Signale besitzen, die ihren Transport und die Lokalisation in der Zelle steuern“, mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet worden.

In Eukaryonten wird der Transport von Makromolekülen zwischen Cytoplasma und Zellkern durch die Kernporenkomplexe ermöglicht. Proteine, die spezifische Signalsequenzen enthalten, werden aktiv mit Hilfe von Transportmolekülen durch die Kernporen transportiert. So werden zum Beispiel ribosomale Proteine im Cytoplasma synthetisiert und in den Kern transportiert. Dort assoziieren sie in den Nucleoli mit ribosomaler RNA und werden als ribosomale Untereinheiten wieder in das Cytoplasma exportiert. Diese komplizierte Abfolge von Transportprozessen erfordert für jeden Schritt einen selektiven Transport durch die Kernmembran.

1.1 DER ZELLKERN

In Eukaryontenzellen wird die DNA im Zellkern (Nucleus) kompartimentiert. Der Zellkern wird durch eine aus zwei konzentrischen Membranen bestehende Kernhülle abgegrenzt. Diese Membranen sind mit Kernporenkomplexen durchsetzt, die einen aktiven Transport von Makromolekülen zwischen Cytoplasma und Zellkern ermöglichen.

1.1.1 DIE KERNMEMBRAN

Die Kernhülle, bestehend aus einer inneren und äußeren Kernmembran, definiert das nucleare Kompartiment. Obgleich die innere und die äußere Kernmembran ineinander übergehen, enthält jede der Membranen eine ihr eigene Proteinzusammensetzung. Die innere Kernmembran enthält spezifische integrale Membranproteine, die sowohl mit der Kernlamina als auch mit Chromatin assoziiert sein können. Die äußere Kernmembran ist der Membran des rauhen ER in biochemischer und funktioneller Hinsicht sehr ähnlich. Wie bei der Membran des rauhen ER ist auch die äußere Kernmembran mit Ribosomen, die für die Proteinsynthese verantwortlich sind, bestückt. Die Kernlamina, die sich aus den Lamin-Subtypen A und B zusammensetzt, stellt ein filamentöses

Netzwerk dar, welches die Kernhülle stabilisiert und Chromatin bindet. 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 und Foisner, 1994).

1.1.2 DER KERNPorenKOMPLEX UND NUCLEOPORINE

Der Kernporenkomplex (NPC), der die Kernhülle perforiert, verbindet die innere und äußere Kernmembran und ermöglicht den bidirektionalen Transport von Makromolekülen zwischen Cytoplasma und Nucleoplasma. Der NPC mit einer Masse von 125 MDa besitzt bei Vertebraten einen Außendurchmesser von ungefähr 120nm und eine Höhe von ungefähr 80nm (Panté und Aebi, 1996a).

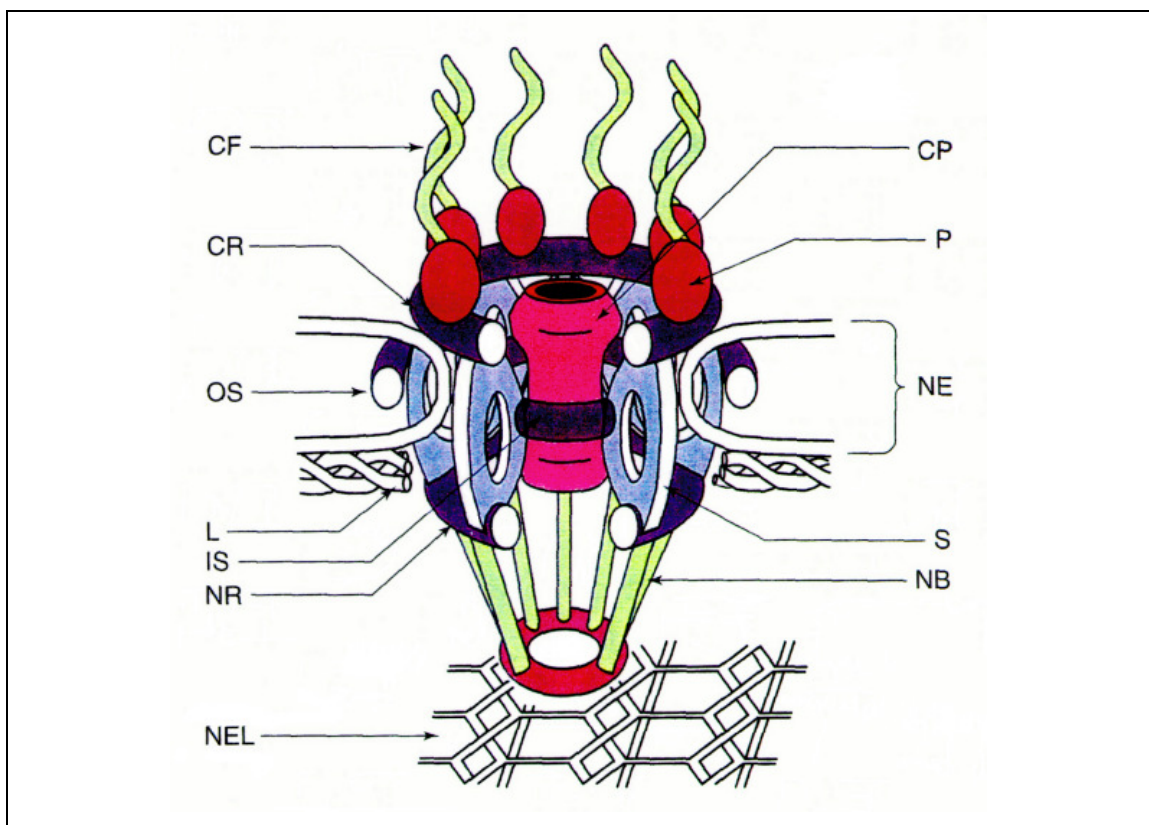


Abb. 1.2 Architektur des Kernporenkomplexes (Rout und Wentz, 1994).

CF: cytoplasmatische Filamente, P: cytoplasmatische Partikel, CR: cytoplasmatischer Ring, OS: äußerer Speichenring, IS: innerer Speichenring, NR: nucleoplasmatischer Ring, S: Speichen, CP: Transporter, NB: nucleoplasmatischer Korb (Basket), NE: Kernmembran, L: Lamina, NEL: nucleares Netzwerk.

Die Kernporendichte variiert zwischen den verschiedenen Zelltypen von 2 bis 60NPC/ μm^2 (Gerace und Burke, 1988).

Das strukturelle Grundgerüst (vgl. Abb. 1.2) eines NPC besteht aus zwei zueinander koaxial angeordneten Ringen, die radial durch acht Speichen miteinander verbunden sind. Der etwa 55MDa große zentrale Speichenkomplex des NPC setzt sich aus den drei folgenden Domänen zusammen: (1) der luminalen Speichendomäne, (2) der zentralen Speichendomäne und (3) der inneren Speichendomäne. Innerhalb dieses Speichenkomplexes verläuft ein wässriger Kanal (Transporter) mit einem Durchmesser von 9nm und einer Länge von 15nm, der die passive Diffusion von Molekülen bis zu einer Größe von 40-60kDa ermöglicht. Der cytoplasmatische Ring mit einem Molekulargewicht von etwa 32MDa ist mit acht in das Cytoplasma hineinragenden Fibrillen assoziiert. Vom nucleoplasmatischen Ring, dessen Molekulargewicht etwa 21MDa beträgt, erstrecken sich acht Fibrillen mit einer Länge von ungefähr 50nm in das Kernlumen. Auf diesen nucleoplasmatischen Strukturelementen liegt der distale Ring mit einem Durchmesser von 30-50nm und bildet eine korbähnliche Struktur, den sogenannten Basket (Panté und Aebi, 1996b).

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. Der dynamische distale Ring fungiert 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 20-30nm 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. Proteine wie NUP214, NUP180, p62 und NUP153, die diese Motive aufweisen und zur

cytoplasmatischen bzw. nucleoplasmatischen Seite des NPC exponiert sind, stellen vermutlich potentielle Bindungsstellen für lösliche Transportfaktoren dar (Rexach und Blobel, 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 und Wente, 1994).

1.2 KERNLOKALISATIONSSIGNALE

1.2.1 IMPORTSIGNALE

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

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

1.2.2 KLASSISCHE KERNLOKALISATIONSSIGNALE

1.2.2.1 MONOPARTITE KERNLOKALISATIONSSIGNALE

Das erste identifizierte klassische Kernlokalisationssignal (cNLS) des großen T-Antigens des SV40-Virus stellt sogleich den Prototyp der monopartiten Kernsignale dar (Kalderon *et al.*, 1984).

Protein	cNLS
SV40 T-Antigen	126 P KKKRK V 132

Tab. 1.1 NLS des großen SV40 T-Antigens.
Basische Aminosäuren sind fett hervorgehoben.

Nachdem weitere Kernsignale mit einer gewissen Homologie identifiziert werden konnten, postulierten Chelsky *et al.* (1989) die Minimalsequenz K-K/R-X-R/K, wobei X die Aminosäuren K, R, V, P oder A, nicht aber N einnehmen darf.

Da es jedoch keine generelle NLS-Konsensussequenz gibt, stellten Garcia-Bustos *et al.* (1991) folgende Gemeinsamkeiten zusammen:

1. Das NLS hat keine bestimmte Position im Protein und wird nach dem Transport nicht abgespalten.
2. Die NLS sind in der Regel positiv geladen und weisen eine Länge von 4-8 Aminosäuren auf.
3. In der Nähe der NLS liegen häufig helixunterbrechende Aminosäuren wie Prolin oder Glycin.
4. Proteine können mehrere NLS besitzen.

1.2.2.2 BIPARTITE KERNLOKALISATIONSSIGNALE

Einige nucleare Proteine besitzen bipartite Kernsignale (bNLS). Hierbei handelt es sich um zwei kurze basische Teilsequenzen, die durch eine variable Spacersequenz voneinander getrennt sind.

Als erstes Protein mit einem bipartiten NLS konnte Nucleoplasmin aus *Xenopus laevis* identifiziert werden. Bei diesem Kernsignal sind zwei Teilsequenzen von 2-4 basischen Aminosäuren durch 10 Aminosäuren voneinander getrennt (Dingwall *et al.*, 1989). Deletions- und Mutationsuntersuchungen ergaben, dass beide Teilkomponenten des bipartiten NLS für den Kerntransport essentiell sind. Der Spacer kann jedoch einer großen Variabilität in bezug auf Länge und Sequenz unterliegen (Dingwall und Laskey, 1991).

Protein	bNLS
Nucleoplasmin	150 KRPAATKKAGQA KKKK 170

Tab. 1.2 Bipartites NLS des nuclearen Proteins Nucleoplasmin.
Aminosäuren des bipartiten NLS sind fett hervorgehoben.

1.2.3 NICHT-KLASSISCHE KERNLOKALISATIONSSIGNALE

Neben den klassischen Kernlokalisierungssignalen existieren eine Reihe von Kernsignalen, die sich gerade durch das Fehlen basischer Aminosäure-Cluster auszeichnen.

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

Protein	NLS
Met α 2	MNKIPIKDLLNPQ

Tab. 1.3 Nicht-klassisches NLS des transkriptionalen Repressors Met α 2.

1.2.4 KERNLOKALISATIONSSIGNALE RIBOSOMALER PROTEINE

Ribosomale Proteine stellen eine überaus vielseitige Klasse von Import-Substraten (Karyophilen) dar. Sie sind in der Regel ungewöhnlich basisch und weisen im Gegensatz zu den klassischen mono- und bipartiten NLS 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 NLS auf.

1.2.5 RIBOSOMALE PROTEINE AUS SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Protein	NLS	Aminosäuresequenz	Typ
L3 ^a		1 SHR KYEAP RHGH LGFLP RKRA 21	bipartit
L25 ^b	NLS I	11 KKAVV KG 17	monopartit
	NLS II	18 TNG KKAL KVRT 28	monopartit
L28 ^c	NLS I	6 KTRKH RG 12	monopartit
	NLS II	23 KHRKH PG 29	monopartit
S17a ^d		2 GRV TK 7	monopartit
S22 ^e		20 GKRQ VLIRP 28	monopartit
S25 ^e	NLS I	11 AKAAA LAGG KKSKK TS KKSM KDRA 36	bipartit
	NLS II	87 GIIK PISK H 95	monopartit

Tab. 1.4 NLS ribosomaler Proteine aus *Saccharomyces cerevisiae*.

Basische Aminosäuren sind **fett** hervorgehoben. [(a) Moreland *et al.*, 1985; (b) Schaap *et al.*, 1991; (c) Underwood und Fried, 1990; (d) Gritz *et al.*, 1985; (e) Timmers *et al.*, 1999]

1.2.6 RIBOSOMALE PROTEINE AUS HOMO SAPIENS

Protein	NLS	Aminosäuresequenz	Typ
L7a ^a	NLS I	34 KRPK 37	monopartit
	NLS II	72 KRLK 75	monopartit
	NLS III	110 KKQRL LARAE KK AAG KGDVPTKR 132	bipartit
S6 ^b	NLS I	167 KKPR 170	monopartit
	NLS II	188 KRRR 191	monopartit
	NLS III	215 KR 216 und 230 KRRR 233	bipartit
S7 ^c	NLS	115 KRPR 118	monopartit

Tab. 1.5 NLS ribosomaler Proteine aus *Homo sapiens*.

Basische Aminosäuren sind **fett** hervorgehoben.

[(a) Russo *et al.*, 1997; (b) Schmidt *et al.*, 1995; Lipsius, 1998; (c) Annilo *et al.*, 1998.]

1.3 NUCLEARE EXPORTSIGNALLE

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

Protein	NES
HIV-Rev	73 LQLPPLERLTL 83

Tab. 1.6 NES des HIV-Rev-Proteins.

Die Aminosäure Leucin ist **fett** hervorgehoben.

1.3.1 NUCLEARE SHUTTLE-DOMÄNEN

Die beiden folgenden NLS-Sequenzen ermöglichen den bidirektionalen Transport zwischen Zellkern und Cytoplasma. Diese nuclearen Shuttle-Domänen sind dadurch charakterisiert, dass NLS und NES gemeinsam in einer Sequenz vorkommen.

1.3.2 M9-DOMÄNE

Die als M9 bezeichnete, 38 Aminosäuren umfassende Glycinreiche Domäne des hnRNP A1-Proteins fungiert gleichermaßen als Import- und Exportsignal (Michael *et al.*, 1995):

Protein	M9-Domäne
hnRNP A1	268 NQSSNF GPMKGGNF GGRSSGPY GGGG QYFAKPRN QGGY 305

Tab. 1.7 M9-Domäne des hnRNP A1-Proteins.
Die Aminosäure Glycin ist **fett** hervorgehoben.

1.3.3 K-PROTEIN NUCLEAR SHUTTLING DOMÄNE

Das Import-/Exportsignal des hnRNP K-Proteins besteht aus einer 24 Aminosäuren langen K-Protein nuclear shuttling Domäne (KNS-Domäne; Michael *et al.*, 1997):

Protein	KNS-Domäne
hnRNP K	338 GFSADETWDSAIDTWSPSEWQ MAY 361

Tab. 1.8 KNS-Domäne des hnRNP K-Proteins.

1.4 DER NUCLEOCYTOPLASMATISCHE TRANSPORT

Zwischen Kern und Cytoplasma findet ein stetiger Austausch von Makromolekülen statt. Proteine, die ihre Funktion im Kern ausüben - wie Histone, DNA- und RNA-Polymerasen, genregulierende und RNA-prozessierende Proteine - werden selektiv vom Cytoplasma, wo sie gebildet werden, in den Kern transportiert. Gleichzeitig werden tRNA und mRNA im nuclearen Kompartiment synthetisiert und selektiv ins Cytoplasma exportiert.

Der Proteinimport in die Mitochondrien oder in das rauhe Endoplasmatische Reticulum (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 und Dobberstein, 1996). Nach dem Import verbleiben die Proteine in dem jeweiligen Zellkompartiment.

Da in höheren Eukaryonten nicht-chromatingebundene nucleare Proteine nach der Mitose in den Zellkern re-importiert werden müssen oder als Shuttle-Proteine zwischen Zellkern und Cytoplasma hin- und herpendeln, werden die Kernsignale nach dem nuclearen Transport nicht entfernt.

Während Moleküle bis zu einer Ausschlußgröße von 40-60kDa passiv durch die Kernporen diffundieren können, ist der Transport von größeren Molekülen sowohl energie- als auch rezeptorabhängig (Silver, 1991). Da die Kernhülle dazu beiträgt, dass im nuclearen Kompartiment und im Cytoplasma die jeweils spezifische Zusammensetzung an Proteinen aufrechterhalten werden kann, stellt sich die Frage, wie Transport-

rezeptoren 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.

1.4.1 IMPORTMECHANISMUS KLASSISCHER NLS-PROTEINE

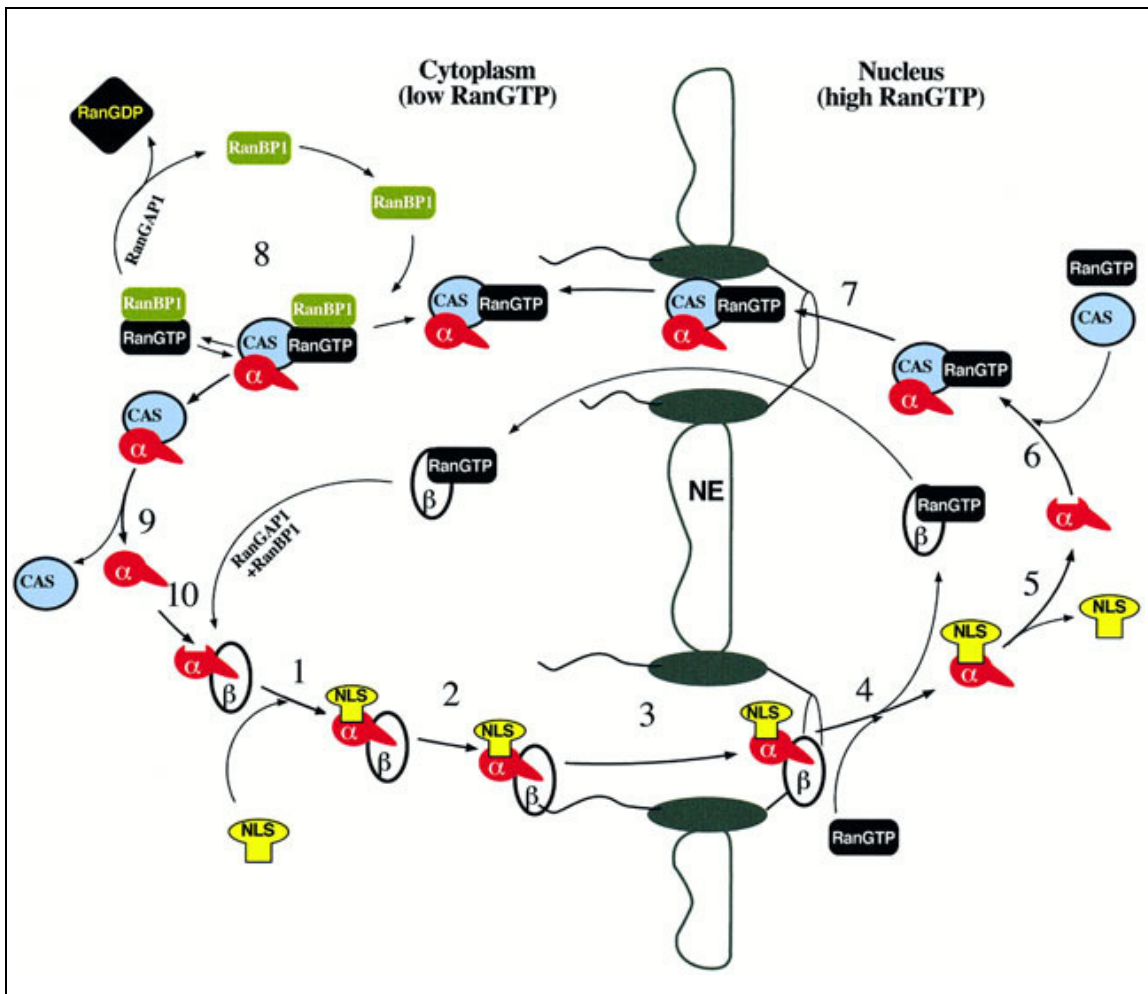


Abb. 1.3 Importmechanismus klassischer NLS-Proteine (Görlich, 1998).

Nucleare Proteine mit mono- oder bipartiten Kernsignalen werden zunächst im Cytoplasma durch das Importin α/β -Heterodimer erkannt und gebunden (Görlich *et al.*, 1995a; Imamoto *et al.*, 1995). Dabei stellt Importin α die NLS-Bindungsstelle zur Verfügung (Adam und Adam, 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; Panté und Aebi, 1996b).

Der Transport des trimeren NLS-Protein/Importin α/β -Komplexes durch die Kernpore stellt einen energieabhängigen Prozeß dar und benötigt die durch Ran (Ras-analoge GTPase) katalysierte Hydrolyse von GTP als Energie für den Import (Melchior *et al.*, 1993; Moore und Blobel, 1993). Der genaue Transportmechanismus durch den NPC ist bis heute nicht vollständig geklärt. Nach der Translokation in den Zellkern erfolgt die Dissoziation des trimeren Importkomplexes durch die Bindung von RanGTP an die Importin β -Untereinheit (Rexach und Blobel, 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 Schlüssel-Schritt im NLS-abhängigen Proteinimport dar (vgl. Abb. 1.3). Durch die geringere Affinität von RanGTP-gebundendem Importin β zu Importin α wird die Reassoziierung dieser beiden Transportfaktoren auf der nucleoplasmatischen Seite unterdrückt und 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 und Görlich, 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.

Ran kehrt in den Nucleus zurück mit Hilfe des Faktors NTF2. Das NTF2-Dimer bindet spezifisch an RanGDP und interagiert mit den repetitiven FG-Sequenzen (-GLFG-, -FXFG- oder -FG-) der Nucleopore. Der NTF2-RanGDP-Komplex wandert durch die Kernporen in das Nucleoplasma. Dort wird das GDP mit Ran-GEF durch GTP ersetzt. Die veränderte Konformation von RanGTP besitzt eine niedrigere Affinität zu NTF2, das freigesetzt wird.

1.4.2 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 und Ponstingl, 1991), wohingegen RanGTP im Cytoplasma über das RanGTPase-aktivierende Protein RanGAP (RanGAP1) in die RanGDP-Form überführt wird (Hopper *et al.*, 1990, 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 (vgl. Abb. 1.3).

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.

1.4.3 IMPORTINE UND EXPORTINE

Die Importin β -Superfamilie, bestehend aus bisher 13 isolierten Transportfaktoren mit Molekulargewichten zwischen 90 und 130kDa, definiert sich dadurch, dass alle Mitglieder an ihren N-terminalen Enden RanGTP-Bindungsmotive aufweisen und dazu in der Lage sind, 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 (vgl. Abb. 1.4).

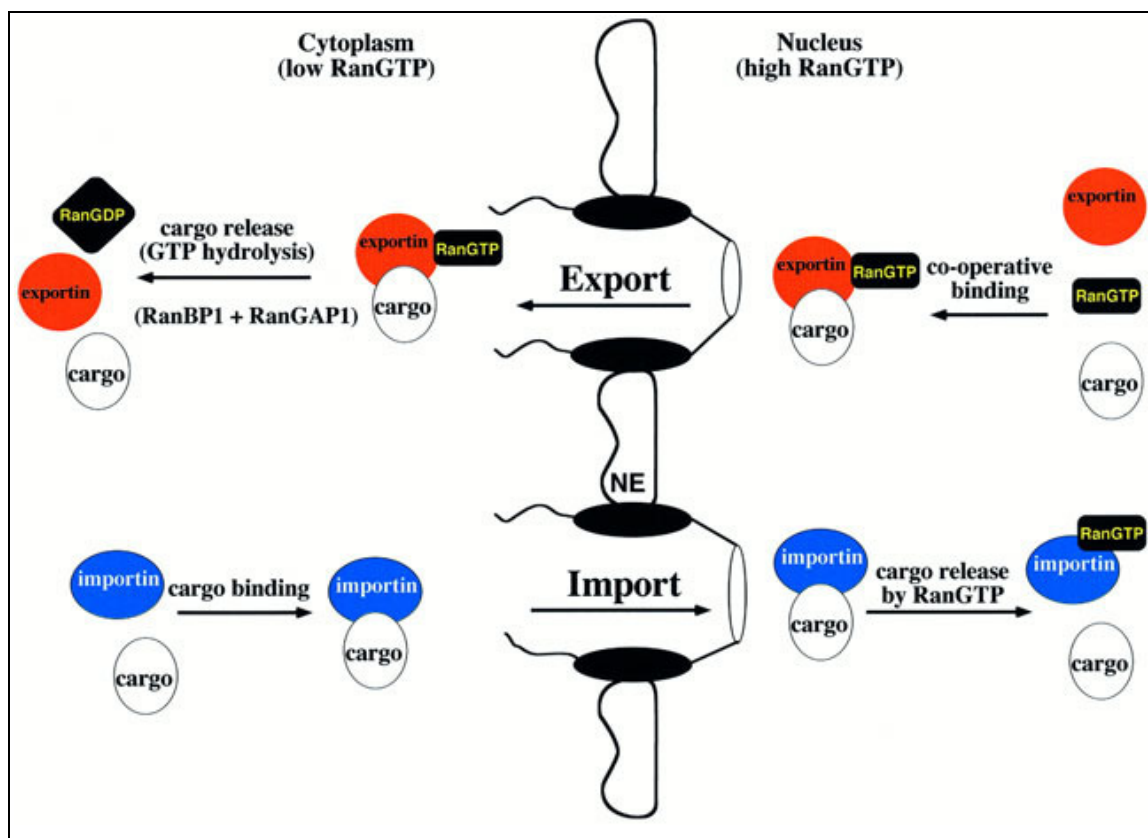


Abb. 1.4 Transport von Importinen und Exportinen (Görlich, 1998).

Der aktive Transport durch den NPC benötigt Transportfaktoren, die sich in drei Kategorien einordnen lassen: (1) Transportrezeptoren, (2) Adapter-Moleküle und (3) Bestandteile des RanGTPase-Systems. 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). Die beiden Transportfaktoren Importin β und CAS sind am Import von NLS-Proteinen beteiligt. Transportin bewirkt den Import von hnRNP-Proteinen mit Glycinreichen M9-Domänen (Pollard *et al.*, 1996), Exportin 1 den Export von Proteinen mit Leucinreichen NES (Fornerod *et al.*, 1997; Fukuda *et al.*, 1997; Stade *et al.*, 1997) und Exportin-t den Export von tRNA (Arts *et al.*, 1998). Karyopherin $\beta 3$ und $\beta 4$ haben wahrscheinlich am nuclearen Import ribosomaler Proteine Anteil (Rout *et al.*, 1997). Die Funktion der restlichen sechs Transportfaktoren ist bisher ungeklärt. Darüber hinaus konnte bis dato 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 (Izaurralde und Mattaj, 1995).

1.4.4 IMPORT RIBOSOMALER PROTEINE

Der Transport ribosomaler Proteine stellt einen überaus komplexen Prozeß dar. Ribosomale Proteine werden im Cytoplasma translatiert, in den Kern importiert – wo sie in den Nucleoli mit rRNA und anderen ribosomalen Proteinen zu den entsprechenden ribosomalen Untereinheiten assoziieren – und schließlich als ribosomale Untereinheiten wieder in das Cytoplasma exportiert. Dabei erfordert jeder Schritt einen selektiven Transport durch die Kernhülle.

Ribosomale Proteine weisen in der Regel eine hohe Anzahl basischer Aminosäuren auf und sind klein genug (< 60kDa), um den NPC durch passive Diffusion zu überwinden. Trotzdem ist die Translokation dieser Proteine durch den NPC rezeptorabhängig. Die Bindung an einen Transportrezeptor führt zu einem effektiven Transport in den Zellkern und bewahrt die ribosomalen Proteine nach ihrer Translation im Cytoplasma vor unspezifischen Interaktionen mit cytoplasmatischen Komponenten (Görlich und Jäkel, 1998).

Transportmechanismen wurden bisher lediglich in Hefe untersucht. Hier fand man zwei Importin β -ähnliche Transportrezeptoren (Yrb4p und Pse1p), die am Import des ribosomalen Proteins L25 beteiligt sind (Rout *et al.*, 1997; Schlenstedt *et al.*, 1997).

1998 konnten Görlich und Jäkel zeigen, dass Importin β , Transportin, RanBP5 (Pse1p-Homologon) und RanBP7 (Importin 7) am Kernimport der ribosomalen Proteine S7, L5 und L23a in Säugetierzellen beteiligt sind. Die Gruppe von Pieler (Claussen *et al.*, 1999) konnte zwei Jahre später nachweisen, dass die gleichen Importfaktoren bei Amphibienzellen das rpL5 von *X. laevis* in den Nucleus transportieren. Dabei zeigte sich, dass die drei untersuchten Proteine alternativ von jedem der vier Importrezeptoren in den Zellkern transportiert wurden.

Im L23a konnte eine 32 Aminosäure lange Domäne identifiziert werden, die von Importin β , Transportin, RanBP5 oder RanBP7 und zusätzlich vom Heterodimer Importin α/β erkannt wird, da die L23a Domäne eine monopartites, klassisches Kernsignal enthält. 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:

Protein	BIB-Domäne
L23a	32 VHSH KKKK IRTSPTF RRPK TLRL RRQ PKY PRKS AP RRNK LDHY 74

Tab. 1.9 BIB-Domäne des ribosomalen Proteins L23a.
 Basische Aminosäuren sind **fett** hervorgehoben.

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

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.

1.4.5 EXPORT RIBOSOMALER UNTEREINHEITEN

Bataillé *et al.* konnten 1990 durch Mikroinjektion radioaktiv markierter ribosomaler Untereinheiten in *Xenopus laevis* Oozyten den Transport durch den NPC nachweisen.

1999 entwickelten Hurt *et al.* einen *in vivo* Export-Assay im Hefe-System, mit dem der Export der großen ribosomalen 60S-Untereinheit verfolgt werden kann. Dazu wurde das ribosomale Protein L25 mit GFP fusioniert. Nach dessen Import in den Zellkern und der Akkumulation in den Nucleoli, wurde das Fusionsprotein L25-GFP in die ribosomale 60S-Untereinheit eingebaut und ins Cytoplasma exportiert. Durch die Expression des Fusionsproteins in Hefe-Mutanten mit unterschiedlichen genetischen Defekten in bezug auf die Ribosomen-Biogenese, bestimmte NPC-Proteine (Nucleoporine) und Transportfaktoren sowie solchen, die direkt den RanGTP/GDP-Zyklus betreffen, konnte gezeigt werden, dass der Export ribosomaler Untereinheiten vom RanGTP/GDP-Zyklus abhängig ist.

Moy und Silver entwickelten 1999 einen weiteren *in vivo* Assay, mit dessen Hilfe der Export der kleinen ribosomalen 40S-Untereinheit in Hefe untersucht werden kann. Nach dem Export der kleinen ribosomalen Untereinheit wird die 20S rRNA hydrolytisch gespalten, so dass die 18S rRNA und das kleine 5' ITS1-Fragment (internal transcribed spacer 1) entstehen. Die 209-210 Basen lange 5' ITS1 rRNA wird normalerweise von der cytoplasmatischen Endonuclease Xrn1 abgebaut. In Hefe-Stämmen, die in bezug auf dieses Enzym defizient sind, akkumuliert 5' ITS1 im Cytoplasma. Dieses kleine RNA-Fragment dient nun als Indikator für den Export der kleinen ribosomalen Untereinheit und kann mittels eines *in situ* Hybridisierungs-Assays mit Digoxigeninmarkierter 5' ITS1 in fixierten Zellen lokalisiert werden. Auch in diesem Fall stellte sich heraus, dass die 5' ITS1 rRNA in Hefe-Mutanten mit Mutationen der entsprechenden codierenden Gene für Ran oder entsprechender Ran-Regulatoren im Nucleoplasma akkumulierten. Nucleoplasmatische Akkumulation konnte auch in Hefe-Mutanten beobachtet werden, bei denen bestimmte Nucleoporine und Transportfaktoren inaktiviert wurden.

Obwohl die Identifizierung spezifischer Exportfaktoren in beiden Fällen ausblieb, kann davon ausgegangen werden, dass diese Versuchsansätze in naher Zukunft zum Verständnis des nuclearen Exports der ribosomalen Untereinheiten beitragen.

1.5 DER NUCLEOLUS

Die Hauptfunktion 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 mit ribosomalen Proteinen zu den entsprechenden ribosomalen Untereinheiten.

1.5.1 DIE NUCLEOLARE STRUKTUR

Der Nucleolus stellt in nicht-mitotischen Zellen einen diskreten subnuclearen Bereich dar, der sich cytologisch dadurch auszeichnet, dass er den Bereich mit der höchsten Dichte innerhalb der gesamten Zelle darstellt. Dieser subnucleare Bereich wird im Gegensatz zu den cytoplasmatischen Organellen nicht durch eine Membran kompartimentiert. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen (vgl. Abb. 1.5) lassen sich drei teilweise voneinander abgegrenzte Regionen erkennen: die granuläre Komponente (GC), die dichte fibrilläre Komponente (DFC) und das fibrilläre Zentrum (FC). Die GC mit etwa 75% stellt den Hauptbestandteil des Nucleolus dar. Die DFC mit ungefähr 17% und die FC mit lediglich 2% tragen hingegen nur unwesentlich zum nucleolaren Gesamtvolumen bei (Shaw und Jordan, 1995). Das FC ist vom DFC umgeben. Die Unterbrechungen der umgebenden DFC-Schicht werden als Interstices bezeichnet und enthalten kondensiertes Chromatin, welches mit dem Chromatin der GC und dem perinuclearen Chromatin assoziiert ist (Thiry und Goessens, 1996).

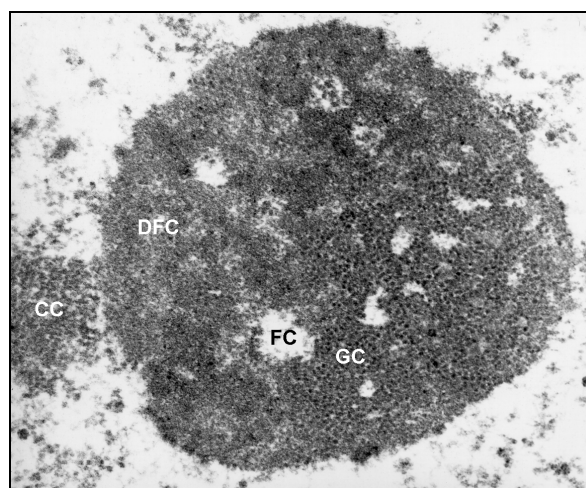


Abb. 1.5 Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Pinealocyten-Nucleolus der Ratte.
FC: fibrilläres Zentrum, DFC: dichte fibrilläre Komponente, GC: granuläre Komponente, CC: Nucleolus-assoziiertes Chromatin.

Die 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). Die Transkription der rRNA-Gene findet jedoch wahrscheinlich an der Grenze zwischen der FC und GC statt, wobei die FC als Reservoir für die inaktive Transkriptionsmaschinerie fungiert (Hozak *et al.*, 1994; Shaw und Jordan 1995).

Die nucleolaren Proteine Fibrillarin, Nucleolin und B23 stellen die Hauptbestandteile der DFC und GC dar. In der DFC erfolgt die Prozessierung der 45S Prä-rRNA. Die Reifung der Prä-Ribosomen findet hingegen in der GC statt (Thiry und Goessens, 1996).

1.5.2 NUCLEOGENESE

Der Nucleolus erfährt während des Zellzyklusses eine drastische morphologische Veränderung: Die nucleolare Struktur löst sich in der späten Prophase auf und kondensiert zu Beginn der Telophase.

Während der Mitose lösen sich zunächst die Strukturen der DFC und der FC auf und die nucleolaren Proteine (Fibrillarin, Nucleolin und B23) verteilen sich über das Cytoplasma oder sammeln sich an der Peripherie der Chromosomen (Hernandez-Verdun und Gautier, 1994). Im Gegensatz dazu assoziieren die nucleolaren Proteine der FC (RNA-Polymerase I, DNA-Topoisomerase I und der Transkriptionsfaktor UBF), die an der Transkription der rRNA-Gene beteiligt sind, mit den NORs (nucleolar organizing regions) kondensierter Chromosomen. Elektronenmikroskopisch kann die FC strukturell nicht von der NOR unterschieden werden (Scheer *et al.*, 1993).

Die postmitotische Nucleogenese unterteilt sich in zwei Schritte: (1) Zu Beginn der Telophase kommt es zur Bildung prä-nucleolarer Komponenten, PNBs (prenucleolar bodies), die sich aus Fibrillarin, B23 und Nucleolin zusammensetzen. (2) Nach der Initialisierung der rDNA-Transkription assoziieren die PNBs mit den aktiven NORs und bilden den Nucleolus (Thiry und Goessens, 1996).

1.5.3 RIBOSOMENBIOGENESE

Eukaryontische Ribosomen mit einem nominalen Sedimentationskoeffizienten von 80S besitzen ein Molekulargewicht von etwa 4.22Mda und setzen sich aus zwei Untereinheiten zusammen. Jede Untereinheit enthält eine rRNA-Hauptkomponente und

mehrere Proteine. Die große ribosomale 60S-Untereinheit mit einer Masse von 2.82Mda enthält neben der 5.8S und 5S rRNA die 28S rRNA (25S rRNA in Hefe) als rRNA-Hauptkomponente sowie 47 ribosomale Proteine (r-Proteine). Der RNA-Anteil beträgt ungefähr 65%. Die kleine ribosomale 40S-Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 1.40Mda enthält die 18S rRNA und 33 r-Proteine. Der RNA-Anteil beträgt etwa 50%. (Wool *et al.*, 1996).

Die Ribosomenbiogenese konnte bei Eukaryonten bisher nicht *in vitro* beobachtet werden. Im Gegensatz dazu assemblieren in Prokaryonten ribosomale Proteine und rRNAs *in vitro* 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 und Jordan, 1995):

- Transkription der rRNA-Gene
- Transport der 5S rRNA in den Nucleolus
- Import der snoRNAs (small nucleolar RNAs) und der assoziierten Proteine
- post-transkriptionale Prozessierung und Modifizierung der 45S Prä-rRNA
- Import ribosomaler Proteine
- Export der präribosomalen Untereinheiten 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.

Eukaryontische rRNA-Gene liegen in 100-200 Kopien vor, die tandemartig in sich wiederholenden Transkriptionseinheiten angeordnet und durch DNA-Spacersequenzen getrennt sind (Long und David, 1980). Die rRNA-Gene befinden sich auf chromosomalen Abschnitten, die als NORs bezeichnet werden und die Basis der strukturellen Organisation des Nucleolus darstellen. Die Transkription der rRNA-Gene erfolgt in den Nucleoli durch die RNA-Polymerase I unter Beteiligung mehrerer Transkriptionsfaktoren. Dabei entsteht als nucleolares Primärtranskript zunächst die 45S Prä-rRNA. Eukaryonten besitzen externe Transkriptionsspaicer (ETS), die die codierende rRNAs

flankieren und zwei interne Transkriptionsspacer (ITS) zwischen den codierenden rRNA-Sequenzen. Sowohl die ETS als auch die ITS werden während der Prozessierung endo- und exonucleolytisch entfernt (Mélèse und Xue, 1995; Shaw und Jordan, 1995). In Hefe konnten die beiden Endonucleasen Xrn1 und Rat1 identifiziert werden, die an der Prozessierung der 5.8S rRNA involviert sind (s. 1.4.5) (Henry *et al.*, 1994). Durch die Prozessierung des Prä-rRNA-Transkripts entstehen die 18S, 5.8S und die 28S (Mammalia) bzw. 25S (Hefe) rRNA.

Die Gene der 5S rRNA werden hingegen vor der Synthese der anderen ribosomalen Komponenten im Nucleoplasma durch die RNA Polymerase III transkribiert (Hadjilov, 1985). Da die einzelnen ribosomalen Komponenten während der Ribosomenbiogenese in stöchiometrischen Mengen benötigt werden, erfolgt zunächst der nucleare Export der 5S rRNA als RNP. Im Cytoplasma assoziiert die 5S rRNA zunächst mit dem Transkriptionsfaktor IIIA (TFIIIA) zum 7S RNP. Nach der Synthese der ribosomalen Proteine assoziiert die 5S rRNA schließlich mit dem ribosomalen Protein L5 zum 5S RNP und wird in den Zellkern re-importiert. Die nucleolare Akkumulation des 5S RNP initiiert die Bildung der großen ribosomalen 60S-Untereinheit (Michael und Dreyfuss, 1996; Rudt und Pieler, 1996).

An der Prozessierung und Modifizierung der Prä-rRNA sind snoRNAs beteiligt, die mit nucleolaren Proteinen assoziiert sind und RNPs bilden (Fournier und Maxwell, 1993). 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).

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 am 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 und Mélèse, 1994).

1.5.4 NUCLEOLARE PROTEINE

Nucleolare Proteine weisen charakteristische Motive in ihren Aminosäuresequenzen auf, die sich in folgende funktionelle Domänen unterteilen lassen (Mélèse und Xue, 1995):

(1) RRM-Domäne (RNA recognition motif):

Die RRM-Domäne stellt das RNA-Erkennungsmotiv dar, welches für viele nucleolare und cytoplasmatische RNA-bindende Proteine charakteristisch ist. Diese Domäne besteht aus etwa 80 Aminosäuren und enthält zwei hochkonservierte Regionen aus 6-8 Aminosäuren.

(2) GAR-Domäne (glycin-arginin-rich):

Die GAR-Domäne bindet unspezifisch einzelsträngige Nucleinsäuren. Diese Domäne, die sich durch einen hohen Anteil an Glycin und Arginin auszeichnet, wird durch Prolinreste flankiert. Die RNA-Bindungsaffinität der GAR-Domäne wird wahrscheinlich infolge posttranslatorischer Methylierungen der Argininreste reguliert (Burd und Dreyfuss, 1994).

(3) NLS-bindende Domäne:

Nucleolare Proteine, die basische NLS binden, weisen Bereiche mit sauren Aminosäuren auf. Diese NLS-bindenden Domänen beinhalten in der Regel mehrere Serinreste und werden wahrscheinlich über Phosphorylierungen durch die Casein Kinase II (CKII) reguliert.

1.5.4.1 FIBRILLARIN

Fibrillarin ist über die N-terminale GAR- und RRM-Domäne direkt oder indirekt mit snoRNPs assoziiert. Aufgrund der Beteiligung an der prä-rRNA-Prozessierung spielt Fibrillarin in verschiedenen Stadien der Ribosomenbiosynthese eine entscheidende Rolle (Shaw und Jordan, 1995).

1.5.4.2 NUCLEOLIN

Nucleolin, Hauptbestandteil des Nucleolus, besitzt vier interne RRM-Domänen und eine C-terminale GAR-Domäne. Der N-Terminus zeichnet sich durch einen hohen Anteil saurer Aminosäuren aus und fungiert als NLS-bindende Domäne. Nucleolin stellt ein nucleolares Shuttle-Protein dar, das zwischen Cytoplasma und Zellkern hin- und herpendelt und wahrscheinlich am Import ribosomaler Proteine in den Zellkern und am

Zusammenbau präribosomaler Partikel involviert ist (Schmidt-Zachmann und Nigg, 1993).

Bouvet *et al.* konnten 1998 durch *in vitro* Bindungsstudien zeigen, dass der C-Terminus von Nucleolin, der sowohl die vier RRM-Domänen als auch die GAR-Domäne beinhaltet, an der Protein-Protein-Interaktion mit ribosomalen Proteinen (L3, L4, L6, L7, L8, L10, L15, L18, L18a und S8) beteiligt ist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der saure N-Terminus mit seiner NLS-bindenden Domäne für die elektrostatische Interaktion mit den basischen NLS ribosomaler Proteine (L5, L9, L13a, L28, L37a, S3a, S9 und S11) verantwortlich ist.

1.5.4.3 B23

B23 ist dazu in der Lage, über seinen sauren N-Terminus NLS-Proteine zu binden. Als Shuttle-Protein ist B23 an Transportprozessen beteiligt (Frankenhauser *et al.*, 1991; Adachi *et al.*, 1993; Valdez *et al.*, 1994; Shaw und Jordan, 1995).

1.5.4.4 NOPP140

Das Shuttle-Protein Nopp140 (nucleolar phosphoprotein of 140kDa) pendelt auf vorgegebenen nucleoplasmatischen Routen (Tracks) zwischen dem DFC des Nucleolus und dem NPC (Meier und Blobel, 1992) und zwischen Coiled-Bodies, dem nucleolaren Speicher von snoRNPs, und dem Nucleolus (Isaac *et al.*, 1998). Nopp140 bindet in seiner phosphorylierten Form nucleare Proteine mit multiplen NLS und ist wahrscheinlich an deren nucleoplasmatischen Transport beteiligt (Meier und Blobel, 1992).

1.6 NUCLEOLUSLOKALISATIONSSIGNALE UND NUCLEOLARE BINDUNGSSEQUENZEN

Nucleolare Lokalisationssignale (NOS) 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; Dang und Lee, 1989). Diese viralen NOS-Sequenzen setzen sich aus 13-18 vorwiegend basischen Aminosäuren zusammen und enthalten ein bis zwei Glutaminreste.

Bei den viralen Proteinen HIV-Rev (Frankenhauser *et al.*, 1991) und HTLV-Rex (Adachi *et al.*, 1993) konnte gezeigt werden, dass die Nucleolus-Akkumulation durch das nucleolare Shuttle-Protein B23 vermittelt wird.

Protein	NOS
HIV-Tat	48 GRKKRR <i>QRRRAHQ</i> 61
HIV-Rev	35 <i>RQARRNRRRRWRERQR</i> 50
HTLV-Rex	2 PKTRRRP <i>RRSQRRP</i> PTP 19

Tab. 1.10 NOS der retroviralen Proteine HIV-Tat, HIV-Rev und HTLV-Rex.
Basische Aminosäuren sind **fett**, die Aminosäure Glutamin ist *kursiv* hervorgehoben.

Valdez *et al.* konnten 1994 das nucleolare Lokalisationssignal von p120 identifizieren. Diese 18 Aminosäure lange NOS setzt sich ebenso wie die viralen NOS-Sequenzen vorwiegend aus basischen Aminosäuren und Argininresten zusammen. Darüber hinaus fungiert diese Argininreiche Domäne als rRNA-Bindungsmotiv (Gustavson *et al.*, 1998).

Das nucleolare Shuttle-Protein B23, welches nucleolare Proteine vom Cytoplasma in den Nucleolus transportiert (s. 1.4.4), bindet an eine 32 Aminosäuren lange Bindungsdomäne von p120. Da diese Bindungsdomäne (Aminosäurereste 24-56) bis auf eine C-terminale Aminosäure das gesamte NOS enthält, besteht die Annahme, dass B23 direkt an der nucleolaren Lokalisation von p120 beteiligt ist (Valdez *et al.*, 1994).

Protein	NOS
P120	40 SKRLSS <i>RARKRAAKRR</i> LG 57

Tab. 1.11 NOS des nucleolaren Proteins p120.
Basische Aminosäuren sind **fett** hervorgehoben.

Nucleolare Bindungssequenzen, abgekürzt NoBiS, wurden darüber hinaus auch bei einigen ribosomalen Proteinen identifiziert. Im Unterschied zu den relativ kurzen NOS-Sequenzen der retroviralen Proteine, bestehen die NoBiS-Signale der ribosomalen Proteine aus längeren Aminosäuresequenzen, die nicht als „Targeting“ Signale fungieren, sondern die Bindung des ribosomalen Proteins im Nucleolus veranlassen. Im Gegensatz zu den klar definierten nuclearen Lokalisationssignalen, die cytoplasmatische Proteine per Definition in den Nucleus dirigieren, sind die NoBiS-Sequenzen für die nucleolare Akkumulation notwendig, aber nicht ausreichend, und benötigen zusätzlich zur Minimalsequenz eine gewisse Anzahl flankierender Aminosäuren und/oder NLS. Die nucleolare Akkumulation kommt vielmehr durch die Interaktion von ribosomalen Proteinen mit den strukturellen und/oder funktionellen Domänen nucleolarer

Makromoleküle zustande (Schmidt *et al.*, 1995; Michael und Dreyfuss, 1996; Russo *et al.*, 1997; Annilo *et al.*, 1998; Timmers *et al.*, 1999).

Eine Ausnahme stellt das ribosomale Protein L31 der Ratte dar, es besitzt eine sehr kurze NoBiS (Quaye *et al.*, 1996):

Protein	NoBiS
L31	87 RLSRKR 92

Tab. 1.12 NoBiS des ribosomalen Proteins L31 der Ratte
Basische Aminosäuren sind **fett** hervorgehoben.

1.7 DAS RIBOSOMALE PROTEIN S6 AUS *HOMO SAPIENS* UND DAS RIBOSOMALE PROTEIN S6A AUS *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Das humane ribosomale Protein S6 (hrpS6) setzt sich aus 249 Aminosäuren zusammen und weist ein Molekulargewicht von 28.7kDa auf (Heinze *et al.*, 1988).

Das S6-homologe ribosomale Protein S6A aus *Saccharomyces cerevisiae* (yrpS6A) besteht aus 236 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von etwa 27.0kDa (Leer *et al.*, 1982). Der direkte Vergleich auf DNA-Basis zeigt, dass das humane S6-Protein im Gegensatz zum S6A-Protein der Hefe drei zusätzliche Codons in den Positionen 505, 652 und 694 enthält und einen um 10 Aminosäuren verlängerten C-Terminus aufweist (s. 5.1). Die Homologie der beiden ribosomalen Proteine S6A und S6 beträgt sowohl auf DNA- als auch auf Protein-Ebene etwa 62%. Unter Berücksichtigung von insgesamt 44 konservativen Aminosäure-Transitionen beträgt die Homologie auf Protein-Ebene sogar 80% (Heinze *et al.*, 1988).

Sowohl das humane ribosomale Protein S6 als auch das ribosomale Protein S6A aus *Saccharomyces cerevisiae* stellen das jeweilige Hauptphosphorylierungsprodukt der kleinen ribosomalen 40S-Untereinheit dar (Leer *et al.*, 1982; Kruppa und Clemens, 1984). Das S6-Protein enthält sieben Serinreste im verlängerten C-Terminus, von denen fünf als potentielle Phosphorylierungsstellen fungieren. Dabei werden die Serinreste in folgender Reihenfolge sequentiell phosphoryliert: Ser-236, Ser-235, Ser-240, Ser-244 und Ser-247 (Jefferies *et al.*, 1994). Der C-Terminus im S6A-Protein weist zwei Serinreste (Ser-232 und Ser-233) auf, die als potentielle Phosphorylierungsstellen fungieren (Leer *et al.*, 1982). Eukaryontische Zellen verfügen über zwei S6-Kinase-Isoformen, die beide von einem einzigen Gen codiert werden: die nucleare S6-Kinase p85^{S6K} und die cytoplasmatische S6-Kinase p70^{S6K} (Chou und Blenis, 1995). Die

nucleare S6-Phosphorylierung ist möglicherweise an regulatorischen Prozessen der Ribosomenbiogenese involviert (Jefferies *et al.*, 1994). Über dies ist die Bedeutung der cytoplasmatischen S6-Phosphorylierung bis dato ebenfalls nicht geklärt. Da S6 einen Bestandteil der mRNA-Bindungsstelle innerhalb der kleinen ribosomalen 40S-Untereinheit darstellt (Wool *et al.*, 1996) und durch die Phosphorylierung von S6 die Affinität der Ribosomen für spezifische mRNAs erhöht wird (Thomas *et al.*, 1982; Jefferies *et al.*, 1994), besteht die Annahme, dass durch die S6-Phosphorylierung die Translation reguliert wird.

1.8 DIE HOMOLOGIEDOMÄNE ALS HOCHKONSERVIERTER TEIL DES RPS6

Vergleicht man die verschiedenen ribosomalen Proteine untereinander, so ergibt sich ein sehr differentes Bild der Homologie unter den Eukaryonten. Für viele der komplett sequenzierten ribosomalen Proteine gibt es bereits Homologievergleiche, (Wittmann-Liebold *et al.*, 1979), die dann evolutionsbiologische Rückschlüsse auf die Verwandtschaft der Organismen zulassen. Nicht ohne Grund wird die RNA der ribosomalen Proteine für phylogenetische Vergleiche und evolutionsbiologische Einordnungen herangezogen.

Die beiden in dieser Arbeit betrachteten ribosomalen Proteine hrpS6 (*Homo sapiens*) und sein Homologes des Hefepilzes *Saccharomyces cerevisiae* yrpS6A weisen interessanterweise eine auch im rpS6 anderer Organismen (z.B. *Arabidopsis thaliana*, etc.) stark konservierte Domäne im Bereich der Aminosäuren 53-159 auf. In dieser Arbeit werden Untersuchungen zur Funktion dieses evolutionär konservierten und von uns Homologiedomäne genannten Bereiches angestellt. Zu vermuten ist, dass diese Region eine wichtige Funktion bei der Ribosomenbiogenese spielt, z. B. dass dieser Sequenzbereich an die 18S rRNA bindet. Möglicherweise liegt in dieser Region auch eine nucleolare Bindungssequenz, die für die Nucleoluslokalisierung des rpS6 verantwortlich zeichnet.

1.9 DAS FLEXIBLE C-TERMINALE PHOSPHORYLIERUNGSCUSTER IM RPS6

Am N-Terminus des hrpS6 befindet sich eine Domäne, die zwischen den evolutionär auseinander liegenden Spezies eine hohe Variabilität aufweist. Besonders auffällig an dieser Domäne in den höheren Eukaryonten ist die große Zahl an phosphorylierbaren Aminosäuren, bei *Homo sapiens* z.B. fünf an der Zahl, bei der Hefe *Saccharomyces*

cerevisiae nur derer zwei. Die Phosphorylierung des hrpS6 hat nachweislich einen starken Einfluss auf das Zellwachstum (Ruvinsky und Meyuhas, 2006).

Die Serinreste von rpS6 werden von S6-Kinasen phosphoryliert. Zunächst wurde die S6K1, eine Serin/Threonin spezifische Kinase, entdeckt und ihre Bedeutung für die Zellproliferation beschrieben (Jefferies *et al.*, 1994). S6K1 besitzt zwei Isoformen $\alpha 1$ (85kDa) und $\alpha 2$ (70kDa) die durch alternatives Spleißen entstehen und die sich dadurch um 23 Aminosäuren am N-Terminus unterscheiden (Grove *et al.*, 1991). Das NLS von S6K1 $\alpha 1$, das sich in diesen 23 Aminosäuren befindet, führt zur nuclearen Lokalisation, während die kürzere Isoform im Cytoplasma anzutreffen ist.

Drosophila melanogaster exprimiert nur ein einziges S6K-Enzym (Fumagalli und Thomas, 2000), während Säugetierzellen zwei Formen der Kinase, die oben erwähnte S6K1 und S6K2 exprimieren, die von zwei verschiedenen Genen codiert werden. Bei *Drosophila melanogaster* mit einer S6-Kinase ist der Ausfall der selbigen im Embryonalstadium lethal; wenn die Tiere nicht versterben, sind sie, nicht aufgrund ihrer Zellzahl, sondern wegen der reduzierten Zellgröße, im Wachstum stark zurückgeblieben (Montagne *et al.*, 1999).

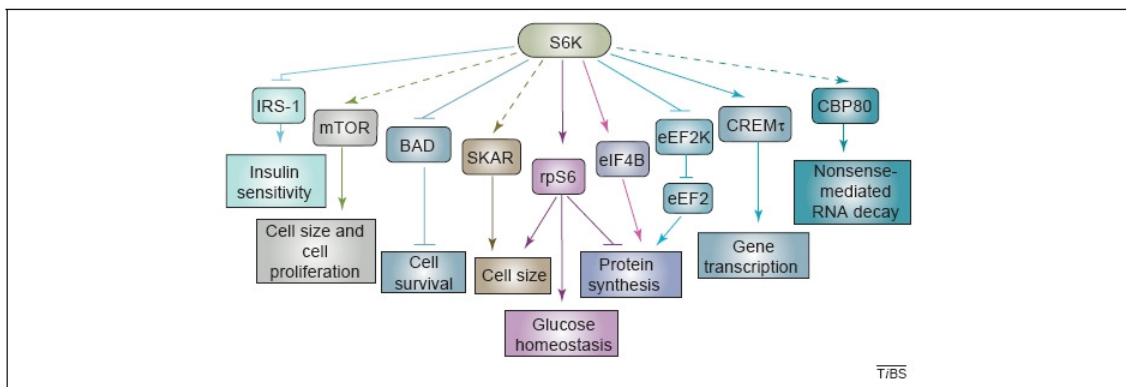


Abb. 1.6 Effektoren der S6-Kinase.

Phosphorylierung durch die S6-Kinase führt u.a. zur Aktivierung von S6, das die Proteinbiosynthese, Zellgröße und Glucosehomeostase beeinflusst.

Die zwei Isoformen von S6K2 (p54 S6K2 und p56 S6K2) befinden sich primär im Zellkern (Martin *et al.*, 2001). Für die Aktivierung von S6K2 ist mTOR notwendig. Die Deletion von S6K1 in Mäusen führt zu kleineren Tieren, in denen die Größe aller Organe reduziert ist (Shima *et al.*, 1998). Eine Deletion von S6K2 in Mäusen zeigt keinen Effekt auf die Körpergröße. Werden jedoch beide S6-Kinasen deletiert, führt dies zu Mäusen mit vermindeter Lebensfähigkeit (Pende *et al.*, 2004; Ruvinsky und Meyuhas, 2006).

2. AUFGABENSTELLUNG

Die Biogenese eukaryontischer Ribosomen stellt einen überaus komplexen Vorgang dar, der die koordinierte Synthese der vier strukturgebenden rRNAs und 80 ribosomaler Proteine verlangt. Die Synthese der einzelnen ribosomalen Komponenten findet in verschiedenen Zellkompartimenten statt. Transkription der rRNA-Gene, Prozessierung der rRNA-Primärtranskripte zu den reifen 18S-, 5.8S- und 28S-rRNAs sowie Assoziation der ribosomalen Proteine mit den prä-ribosomalen Komponenten finden im Nucleolus statt. Die Transkription der 5S-rRNA und der mRNAs erfolgen hingegen im Nucleoplasma. Ribosomale Proteine werden im Cytoplasma translatiert und müssen nach ihrer Synthese in den Zellkern transportiert werden, um dort im Nucleolus, dem Syntheseort der Ribosomen, zu akkumulieren. Sowohl der Import der ribosomalen Proteine in den Zellkern als auch die nucleolare Akkumulation werden durch spezifische Aminosäuresequenzen ermöglicht.

In Hefezellen (*S. cerevisiae*) müssen in jeder wachsenden Zelle ~200.000 Ribosomen pro Zellzyklus (< 100min) (Warner, 1999) ersetzt werden, während in einer HeLa-Zelle ~4.000.000 neue Ribosomen pro Zellzyklus (24h) neu synthetisiert werden. Die sehr hohe Zahl an Ribosomen in eukaryontischen Zellen erfordert Signale für einen gerichteten effizienten Import aller ribosomaler Proteine in den Zellkern und hochspezifische, nucleolare Bindungssequenzen zur Interaktion und Stabilisierung der nativen, dreidimensionalen rRNA-Struktur.

Beim Beginn meiner Arbeit waren jeweils drei nucleare Lokalisationssignale (NLS) (Schmidt *et al.*, 1995) und eine C-terminale, nucleolare Bindungssequenz (NoBiS) im yrpS6A (Leicher, 1994) und im hrpS6 (Kundu-Michalik, 1997) identifiziert worden. In der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung der Kernsignale, der nucleolaren Bindungssequenzen und des C-terminalen, phosphorylierbaren Serinclusters vom S6-Protein für die Bildung von ribosomalen 40S-Untereinheiten untersucht werden. Im hrpS6 und yrpS6A sollte das Vorhandensein einer zusätzlichen nucleolaren Bindungssequenz, die in der „Homologiedomäne“ vermutet wurde, überprüft werden. Durch Deletion der drei Kernimportsignale im humanen S6-Protein sollte deren Einfluss auf den Zusammenbau funktioneller 40S-Partikel analysiert werden. Ob S6 als hoch phosphoryliertes Protein in das neugebildete 40S-Partikel integriert wird, sollte in

einer isolierten, hochgereinigten Kernpräparation festgestellt werden. Schließlich sollte der primäre Bindungsort des humanen rpS6 im Nucleolus durch Verwendung hoch spezifischer S6-Antikörper mit Hilfe des Elektronenmikroskops identifiziert werden.

Für den Hauptteil der Untersuchungen sollten cDNA-Fragmente mittels Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) konstruiert werden und in den eukaryontischen Expressionsvektor pASH, einem modifizierten pRc/RSV-Vektor, kloniert werden. Der pASH-Vektor enthält die prokaryontische β -Galactosidase als Reporter-Protein und ermöglicht nach transienter Expression in COS-Zellen die intrazelluläre Lokalisation der resultierenden β -Galactosidase-Fusionsproteine mittels indirekter Immunfluoreszenz.

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 Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Difco-Laboratories (Hamburg), ICN (Darmstadt), 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

Antikörper wurden von den Firmen Boehringer (Mannheim) und Sigma (Deisenhofen) sowie Cell Signaling Technology, Inc. (Boston) bezogen.

AK DF1: gegen an KLH* gekoppeltes Oktapeptid (RRLSSLRA) des rpS6 in unserer Arbeitsgruppe hergestellt.

AK S6K1: gegen an KLH* gekoppeltes C-terminales Peptid der humanen S6-Kinase1 hergestellt.

AK 2414: gegen an KLH* gekoppeltes Peptid der letzten 10AS des rpS6 hergestellt, Affinitätsgereinigtes Serum aus Kaninchen.

AK 672-7: gegen an KLH* gekoppeltes Peptid der 11 aminoterminalen AS des rpS6 hergestellt, Affinitätsgereinigtes Serum aus Kaninchen

AK 235/236: polyklonaler Phospho-rpS6 (Ser235/236) Antikörper aus Kaninchen von Cell Signaling

AK 240/244: polyklonaler Phospho-rpS6 (Ser240/247) Antikörper aus Kaninchen von Cell Signaling

*KLH (Keyhole limpet Hämocyanin) ist ein hochmolekulares Protein, das aus der Hämolymphe der Schlüssellochschncke (Megathura crenulata; engl. Keyhole limpet), einer Meeresschncke, gewonnen wird. KLH gehört mit einer Molekülmasse von 8-32 Millionen Dalton zu den größten bekannten Proteinen. Hämocyanine sind die durch Kupferatome blau erscheinenden Sauerstoff transportierenden Proteine verschiedener Mollusken und Arthropoden. KLH wird in der Biotechnologie als Trägerprotein und wirksames Antigen bei der Immunisierung von Tieren eingesetzt. Die Immunisierung dient der Gewinnung von Antikörpern. Es ruft in Wirbeltieren eine starke Immunantwort hervor, sowohl die zelluläre als auch die humorale. In der Medizin wird KLH daher als unspezifischer Modulator (Immunstimulator) benutzt, mit dessen Hilfe die Immunkompetenz eines Körpers bestimmt werden kann.

3.2 BIOLOGISCHES MATERIAL

3.2.1 *ESCHERICHIA COLI*

Der *E. coli*-Stamm INV α F' (Invitrogen) weist folgenden Genotyp auf:

F' endA1 recA1 hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) supE44 thi-1 gyrA96 relA1 ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169

3.2.2 *COS-ZELLEN*

Bei COS-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 entstanden ist (CV1 origin SV40).

3.2.3 HELA-ZELLEN

Bei den HeLa-Zellen (American Tissue Culture Collection, ATCC) handelt es sich um eine von der Patientin Henrietta Lacks (1951) gewonnene transformierte Zelllinie. HeLa-Zellen sind menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (Gebärmutterhalskrebs) und die ersten menschlichen Zellen, aus denen eine permanente Zelllinie etabliert wurde. Die Zellen waren vom humanen Papillomvirus 18 (HPV18) befallen und sind dadurch zu Tumorzellen entartet.

3.3 REAGENZIEN

Lösungen für den routinemäßigen Gebrauch in der Molekularbiologie wurden nach dem von Sambrook *et al.* (1989) herausgegebenen Standardwerk *Molekular Cloning* angesetzt. Dabei wurden sämtliche Lösungen mit entionisiertem destilliertem Wasser aus einer Millipore Elix Anlage angesetzt. Sterile Lösungen wurden durch Autoklavieren oder bei Hitzeempfindlichkeit durch Sterilfiltrieren (Satorius Membranfilter, Porengröße 0.2µm) hergestellt.

Agarose-Gellösung

1.0-2.0% (w/v) Agarose (Seakem) wurden durch kurzes Aufkochen in 1 × TAE-Puffer gelöst und bei einer Temperatur von etwa 50°C mit 0.5µg Ethidiumbromid pro ml Agarose-Gellösung versetzt.

Ampicillin-Stocklösung

50mg/ml Ampicillin
sterilfiltrieren

BSA-Stammlösung

10mg/ml BSA

CB 1-Puffer (Competency Buffer 1)

100mM KCl
30mM Kac
60mM CaCl₂
15% (v/v) Glycerol

pH 5.8 mit HAc einstellen
sterilfiltrieren

CB 2-Puffer (Competency Buffer 2)

10 mM KCl
75 mM CaCl₂
10 mM MOPS
15 % (v/v) Glycerol,
pH 6.8
sterilfiltrieren

DEAE-Dextran-Lösung

1% (w/v) DEAE-Dextran
in PBS (pH 7.4)
sterilfiltrieren

6 × DNA-Probenpuffer

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

Dulbecco modifiziertes Minimal Essential Medium (DMEM)

Das DMEM-Trockenpulver (Seromed) wurde laut Angaben des Herstellers mit Wasser versetzt, mit 1N NaOH auf pH 7.2 eingestellt und sterilfiltriert.

DNTP-Mix

je 10mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP

Formaldehyd-Fixierlösung

4% (w/v) p-Formaldehyd
4% (w/v) Saccharose
10% (v/v) 10 × PBS

4g p-Formaldehyd wurden nach Zugabe von 2 Tropfen 1N NaOH bei 70°C unter Rühren in 60ml Wasser gelöst. Zu der Lösung wurden 10ml 10× PBS und 4g Saccharose hinzugefügt und mit Wasser auf 100ml aufgefüllt.

LB-Agar

1% (w/v) Bacto-Trypton

0.5% (w/v) Hefeextrakt

1.5% (w/v) Agar

1% (w/v) NaCl

pH 7.4 mit HCl einstellen

autoklavieren

LB-Medium

1% (w/v) Bacto-Trypton

0.5% (w/v) Hefeextrakt

1% (w/v) NaCl

pH 7.4 mit HCl einstellen und autoklavieren

PBS (phosphate buffered saline)

137mM NaCl

2.7mM KCl

8.1mM Na₂HPO₄

1.4mM KH₂PO₄

pH 7.4 mit HCl einstellen

autoklavieren

Poly-Lysin-Lösung

0.03% (w/v) Poly-Lysin

sterilfiltrieren

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

40mM Tris-Acetat

pH 8.5

Trypsin-EDTA-Lösung

0.05% (w/v) Trypsin

5mM Na₂EDTA

in PBS (pH 7.4)

sterilfiltrieren

Puffer 2 (+ BSA)

50mM NaCl

10mM Tris-HCl

10mM MgCl₂

1mM DTT

(+ 0.025% (w/v) BSA)

pH 7.9

Puffer 3 (+ BSA)

50mM Tris HCl

10mM MgCl₂

100mM NaCl

1mM DTT

(+ 0.025% (w/v) BSA)

pH 7.9

CIP-Puffer

50mM NaCl

10mM Tris-HCl

10mM MgCl₂

1mM DTT

pH 7.9

T4-DNA-Ligase-Puffer

50mM Tris-HCl

10mM MgCl₂

10mM DTT

1mM ATP
0.025% (w/v) BSA
pH 7.5

PCR-Reaktionspuffer

50mM KCl
10mM Tris-HCl
1.5mM MgCl₂
0.1 % Triton X-100
0.02% (w/v) BSA
pH 9.0

X-Gal-Reaktionslösung

5mM K₄Fe(CN)₆
5mM K₃Fe(CN)₆
2mM MgCl₂
0.04% (w/v) X-Gal
in PBS (pH 7.4)

3.4 METHODEN

3.4.1 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.

Sofern nicht näher erwähnt, wurde DNA in autoklaviertem, entionisiertem Wasser und nicht in TE-Puffer (EDTA komplexiert zweiwertige Ionen) aufgenommen, um die Aktivität von DNA-modifizierenden Enzymen in Folgereaktionen zu gewährleisten.

3.4.2 DNA-QUANTIFIZIERUNG

DNA unbekannter Konzentration wurde photometrisch oder gelelektrophoretisch quantifiziert.

3.4.2.1 QUANTIFIZIERUNG VON DNA MITTELS AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Referenz: Sambrook *et al.* (1989), Ausubel *et al.* (1995)

Durchführung:

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

3.4.2.2 QUANTIFIZIERUNG VON DNA MITTELS UV-PHOTOMETRIE

Referenz: Sambrook *et al.* (1989), Ausubel *et al.* (1995)

Durchführung:

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

doppelsträngige DNA: 50µg/ml

einzelsträngige DNA: 33µg/ml.

3.4.3 PCR

3.4.3.1 STANDARD-PCR

Referenz: Ausubel *et al.* (1995)

Lösungen und Enzyme:

10 × PCR-Puffer (MBI)

2mM dNTP-Mix (MBI)

Taq-DNA-Polymerase, 5.000U/ml (Appligene)

Durchführung:

Die PCR-Reaktionen erfolgten in einem Gesamtvolumen von 50µl. Zu 10pg Template-DNA wurde folgender Standard-PCR-Mix gegeben:

Standard-PCR-Mix:

5'-Primer (sense)	200 – 250pmol
3'-Primer (antisense)	200 – 250pmol
dNTP-Mix	0.2mM
10 × PCR-Reaktionspuffer	1 ×
Taq-DNA-Polymerase	2.5U

Die PCR-Reaktionen wurden in einem PCR-Thermocycler mit folgendem PCR-Programm durchgeführt:

PCR-Programm:

Schritt	Temperatur	Zeit	Anmerkung
1	96°C	5min	
2	93°C	1min	
3	43°C	1min	
4	72°C	3min	→ Schritt 2 / 5 Zyklen
5	93°C	1min	
6	43°C	1min	
7	72°C	3min	→ Schritt 5 / 7 Zyklen (dT = + 2°C)
8	93°C	1min	
9	57°C	1min	
10	72°C	3min	→ Schritt 8 / 23 Zyklen
11	72°C	10min	
12	4°C	∞	

3.4.4 REINIGUNG VON PCR-PRODUKTEN

Referenz: Protokoll des *QIAquick PCR Purification Kits* (QIAGEN)

Lösungen:

PB-Puffer

PE-Puffer

Durchführung:

Der PCR-Reaktionsansatz wurde mit 250µl PB-Puffer versetzt und auf eine in einem 2ml Mikrozentrifugengefäß platzierte *QIAquick spin Säule* gegeben. Nach einminütiger Zentrifugation bei 13.000rpm wurde der Durchlauf entfernt und die Membran mit 750µl PE-Puffer gewaschen. Zur vollständigen Entfernung von PE-Pufferresten (PE-Puffer enthält Ethanol) wurde nochmals 1min bei 13.000rpm zentrifugiert. Nach Überführung

der *QIAquick spin Säule* in ein neues 1.5ml Eppendorfgefäß, wurde das PCR-Produkt mit 30µl auf 50°C vorgewärmtem Wasser eluiert. Die PCR-Produkte wurden bei –20°C gelagert.

3.4.5 MODIFIZIERUNG VON DNA

3.4.5.1 RESTRIKTION VON DNA

Referenz: Sambrook *et al.* (1989), Ausubel *et al.* (1995),
Produktbeschreibung der entsprechenden Firma

Lösungen und Enzyme:

Restriktionsenzym (Firma)	Puffer (Firma)
<i>Afl</i> II (NEB)	10 × Puffer 2 + BSA (NEB)
<i>Hind</i> III (Promega)	10 × Puffer 2 (NEB)
<i>Not</i> I (NEB)	10 × Puffer 3 + BSA (NEB)
<i>Spe</i> I (NEB)	10 × Puffer 2 + BSA (NEB)

Durchführung:

Die zu restringierende DNA wurde mit 2U des entsprechenden Restriktionsenzym pro µg DNA 4h bei 37°C inkubiert. Um unspezifische DNA-Hydrolysen zu vermeiden, betrug das Volumen der eingesetzten Restriktionsendonucleasen maximal 1/10 des Gesamtvolumens.

Beim Doppelverdau mit *Afl* II und *Hind* III wurde die Reaktion in Puffer 2 (+ 100µg/ml BSA) durchgeführt. Der Doppelverdau mit *Hind* III und *Not* I erfolgte in Puffer 3 (+ 100µg/ml BSA).

3.4.5.2 5'-DEPHOSPHORYLIERUNG LINEARISierter VEKTOREN

Referenz: Sambrook *et al.* (1989), Ausubel *et al.* (1995),
Produktbeschreibung der Firma Promega

Lösungen und Enzyme:

Alkalische Phosphatase (CIP), 1.000U/ml (Promega)

10 × CIP-Puffer (Promega)

500mM EDTA (pH 8.0)

Durchführung:

Die 5'-Dephosphorylierung von linearisierter Vektor-DNA erfolgte derart, dass dem Reaktionsansatz pro pmol DNA-Enden zweimal je 1.0U Alkalische Phosphatase (CIP) hinzugefügt und für insgesamt 1h bei 37°C inkubiert wurde.

Dazu wurden 30µg linearisierte pASH- oder pASH-SV40-Vektor-DNA (entspricht 1.08pmol DNA-Enden) in einem Gesamtvolumen von 100µl mit 1.0U CIP versetzt und 30min bei 37°C inkubiert. Nach 30min wurde dem Reaktionsansatz erneut 1.0U CIP hinzugefügt. Die Inaktivierung der Alkalischen Phosphatase erfolgte für 10min bei 75°C unter Zusatz von 1µl 500mM EDTA. Das dephosphorylierte Produkt wurde gelelektrophoretisch gereinigt und bei -20°C gelagert.

3.4.5.3 HYBRIDISIERUNG VON OLIGONUCLEOTIDEN

Referenz: Ausubel *et al.* (1995)

Lösungen:

Puffer 2 (NEB)

Durchführung:

Zur Generierung doppelsträngiger DNA durch Hybridisierung komplementärer Oligonucleotide, wurden die entsprechenden DNA-Einzelstränge jeweils auf eine Konzentration von 100µM eingestellt, in einem 1.5ml Eppendorfgefäß vereinigt und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 90µl eingestellt. Nach Zugabe von 10µl Puffer 2 wurde der Reaktionsansatz in einem Heizblock auf 88°C für 10min erhitzt und langsam auf RT abgekühlt. Die so gebildete doppelsträngige DNA wurde bei -20°C gelagert.

3.4.6 ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA**3.4.6.1 MINI-PRÄPARATION VON PLASMID-DNA**

Referenz: Protokoll des *Silica Spin Kits* (Biometra)

Lösungen und Materialien:

P1-Puffer (enthält RNase A)

P2-Puffer

P3-Puffer

W1-Puffer

W2-Puffer

Silica Spin Säule

Durchführung:

3ml LB-Selektivmedium (100µg/ml Ampicillin) wurden mit der entsprechenden plasmidtragenden *E. coli*-Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 250rpm inkubiert. 2ml der ÜNK wurden in ein 2ml Eppendorfgefäß überführt, 1min bei 12.000rpm zentrifugiert und das Zellsediment in 200µl P1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200µl P2-Puffer wurde das Gefäß mehrfach invertiert. Nachdem die Suspension mit 200µl P3-Puffer versetzt und das faserige Sediment durch mehrfaches Invertieren verteilt wurde, wurde 5min bei 12.000rpm zentrifugiert und der Überstand auf eine zuvor in ein 1.5ml Eppendorfgefäß platzierte *Silica Spin Säule* gegeben. Nach einminütiger Zentrifugation bei 13.000rpm wurde der Durchfluß entfernt und die Membran nacheinander mit je 500µl W1- und W2-Puffer gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde für jeweils 1min zentrifugiert und der Durchfluß entfernt. Zur vollständigen Entfernung des W2-Puffers (W2-Puffer enthält Ethanol) wurde erneut zentrifugiert und die *Silica Spin Säule* in ein neues 1.5ml Eppendorfgefäß transferiert. Die Plasmid-DNA wurde mit 50µl auf 50°C vorgewärmtem Wasser durch Zentrifugation von der Säule eluiert und bei –20°C gelagert.

3.4.6.2 MIDI-PRÄPARATION VON PLASMID-DNA

Referenz: Protokoll des *Jet Star 2.0 Kits* (Genomed)

Lösungen und Materialien:

E1-Lösung (enthält RNAse A)

E2-Lösung

E3-Lösung

E4-Lösung

E5-Lösung

E6-Lösung

Jet Star Säule

2-Propanol

70%-iger Ethanol

Durchführung:

100ml LB-Selektivmedium (100µl/ml Ampicillin) wurden mit der entsprechenden Vorkultur (s. 3.4.7.6) angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200rpm kultiviert. Die ÜNK wurde 10min auf Eis gelagert. Danach wurde die Zellsuspension 10min bei 2.000rpm und 4°C zentrifugiert, das Zellsediment in 4ml E1-Lösung resuspendiert und in 15ml Corex-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 4ml E2-Lösung wurde das Lysat durch vorsichtiges Invertieren bis zur Homogenität gemischt und 5min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 4ml E3-Lösung hinzugefügt, das Reaktionsgefäß mehrfach invertiert und 30min bei 12.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine zuvor mit 10ml E4-Lösung equilibrierte *Jet Star Säule* gegeben und zweimal mit je 10ml E5-Lösung gewaschen. Nachdem die Plasmid-DNA mit 5ml E6-Lösung eluiert wurde, wurde das Eluat mit 3.5ml eiskaltem 2-Propanol versetzt, 30min bei RT inkubiert und 30min bei 12.000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet mit 8ml 70%-igem Ethanol gewaschen und erneut 30min bei 12.000rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde 10min an der Luft getrocknet, die Plasmid-DNA in 100µl Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert.

3.4.7 DNA-LIGATION**3.4.7.1 DNA-LIGATION VON PCR-PRODUKTEN IN DEN PASH- UND PASH-SV40-VEKTOR**

Referenz: Sambrook *et al.* (1989), Ausubel *et al.* (1995),
Produktbeschreibung der Firma NEB

Lösungen und Enzyme:

pASH- bzw. pASH-SV40-Vektor

PCR-Produkt

10 × T4-DNA-Ligase-Puffer (NEB)

T4-DNA-Ligase, 2.000.000U/ml (NEB)

Durchführung:

In einem 15µl Ligationsansatz wurden 200ng (*AflII/HindIII*)-restringierter und dephosphorylierter Vektor sowie (*AflIII/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 10µl aufgefüllt. Die DNA-Fragmente wurden 5min bei 45°C inkubiert und anschließend auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 10 × T4-DNA-Ligase-Puffer und 2.000U T4-DNA-Ligase wurde der Ligationsansatz auf ein Gesamtvolumen von 15µl gebracht. Die Ligation erfolgte bei 16°C über Nacht. Zur Bestimmung der Ligationseffizienz wurde das molare Verhältnis von Vektor zu Insert in einer Test-Ligation folgendermaßen variiert: 1:1, 1:5, 1:10, 1:25 und 1:50.

3.4.7.2 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Referenz: Sambrook *et al.* (1989), Ausubel *et al.* (1995)

Lösungen:

1 x TAE-Puffer

Agarose-Gellösung

6 x DNA-Probenpuffer

Molekulargewichtsmarker:

MWM III: λ-DNA geschnitten mit *EcoRI* und *HindIII*, 100ng/µl
(Appligene)

MWM V: pBR322-DNA geschnitten mit *HaeIII*, 100ng/µl (Appligene)

100bp-DNA-Leiter: 500ng/µl (NEB)

Durchführung:

Die Charakterisierung und Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte in einer horizontalen Elektrophoreseapparatur mit 5 × 50 × 75 mm bzw. 5 × 100 × 75 mm 1-2%-igen (w/v) Agarose-Gelen bei Spannungen zwischen 80 und 100V in 1 × TAE-Puffer. Dazu wurde die zu untersuchende DNA-Probe mit 6 × 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 der einzelnen DNA-Banden konnte durch den Vergleich mit verschiedenen DNA-Molekulargewichtsmarkern (500ng) abgeschätzt werden. Die Dokumentation der Agarose-Gele erfolgte mittels eines Geldokumentationssystems.

3.4.7.3 ISOLIERUNG VON DNA AUS AGAROSE-GELEN

Referenz: Protokoll des *QIAquick Gel Extraction Kits* (QIAGEN)

Lösungen und Materialien:

QX1-Puffer

PE-Puffer

QIAquick Säule

2-Propanol

Durchführung:

Die zu isolierende DNA-Bande wurde mit Hilfe eines UV-Transilluminators lokalisiert und mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel herausgeschnitten. Zur Bestimmung des Gewichts wurde das extrahierte Gelstück in ein 1.5ml Eppendorfgefäß bekannten Leergewichts überführt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass das Gewicht in mg etwa dem Volumen in μl entsprach. Anschließend wurde das Gelstück mit dem dreifachen Volumen QX1-Puffer versetzt und 10min bei 50°C und 500rpm inkubiert. Nachdem sich das Gelstück vollständig gelöst hatte, wurde bei DNA-Fragmenten, die kleiner als 500bp und größer als 4kb waren, die Lösung mit einem Volumen 2-Propanol versetzt. Bei DNA-Fragmenten, die nicht in diesem Bereich lagen, konnte auf die Zugabe von 2-Propanol verzichtet werden. Die Lösung wurde auf eine in einem 2ml Mikrozentrifugengefäß platzierte *QIAquick Säule* gegeben, 1min bei 13.000rpm zentrifugiert, der Durchlauf verworfen und die DNA mit 750 μl PE-Puffer gewaschen. Zur vollständigen Entfernung des PE-Puffers (PE-Puffer enthält Ethanol) wurde erneut 1min bei 13.000rpm zentrifugiert. Nach der Überführung der *QIAquick Säule* in ein neues 1.5ml Eppendorfgefäß, wurde die DNA mit 30 μl auf 50°C vorgewärmtem Wasser durch einminütige Zentrifugation bei 13.000rpm eluiert. Die DNA-Fragmente wurden bei -20°C gelagert.

3.4.7.4 HERSTELLUNG KOMPETENTER E. COLI-ZELLEN

Referenz: Ausubel *et al.* (1995)

Lösungen und Materialien:

E. coli-Zellen (INV α F')

LB-Medium

CB 1-Puffer (Competency Buffer 1)

CB 2-Puffer (Competency Buffer 2)

Durchführung:

3ml LB-Medium wurden mit dem *E. coli*-Stamm INV α F' angeimpft und über Nacht bei 37°C und 250rpm inkubiert. 100ml LB-Medium wurden mit 1ml dieser ÜNK angeimpft und bis zur logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ = 0.25 bis 0.50) bei 37°C und 250rpm 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 50ml Zentrifugationsgefäße (Falcon Tubes) überführt, 15min auf Eis inkubiert und 15min bei 2500rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Zellsediment vorsichtig in je 15ml CB 1 resuspendiert, 1h auf Eis inkubiert und 15min bei 3000rpm und 4°C zentrifugiert. Nachdem der Überstand entfernt wurde, wurden die sedimentierten Zellen vorsichtig in 2ml CB 2 resuspendiert und für weitere 15min auf Eis inkubiert. Die kompetenten Zellen wurden aliquotiert, in 1.5ml Eppendorfggefäße überführt und bei -70°C gelagert.

3.4.7.5 TRANSFORMATION KOMPETENTER *E. COLI*-ZELLEN

Referenz: Ausubel *et al.* (1995)

Lösungen und Materialien:

kompetente *E. coli*-Zellen (INV α F')

LB-Medium

LB-Agarplatten (50 μ g/ml Ampicillin)

Durchführung:

Die kompetenten *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und vorsichtig resuspendiert. Je 150 μ l kompetente Zellen wurden mit 15 μ l des entsprechenden Ligationsansatzes (entspricht 200ng Plasmid-DNA) versetzt, vorsichtig gemischt und 30min auf Eis inkubiert. Die Transformationsansätze wurden 90s bei 42°C und anschließend 5min auf Eis inkubiert. Je Transformationsansatz wurde 1ml LB-Medium hinzugefügt und 1h bei 37°C und 200rpm inkubiert. Die Zellen wurden für 1min bei 10.000rpm abzentrifugiert,

in 100µl LB-Medium resuspendiert und auf LB-Selektivagarplatten (50µg/ml Ampicillin) ausplattiert. Die Agarplatten wurden für 16 bis 20h bei 37°C inkubiert. Zur Bestimmung der Transformationskompetenz erfolgte die Transformation sowohl mit ungeschnittener als auch mit restringierter und dephosphorylierter Plasmid-DNA. Als Negativkontrolle dienten kompetente Zellen ohne Plasmid-DNA.

3.4.7.6 ÜBERNACHTVORKULTUR TRANSFORMIERTER *E. COLI*-ZELLEN

Referenz: Sambrook *et al.* (1989)

Lösungen:

LB-Medium

Ampicillin-Stocklösung (50mg/ml)

Durchführung:

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

3.4.7.7 ANSETZEN VON DAUERKULTUREN

Referenz: Sambrook *et al.* (1989)

Lösungen:

LB-Medium

Ampicillin-Stocklösung (50mg/ml)

87%-ige Glycerol-Lösung

Durchführung:

3ml LB-Selektivmedium (50µg/ml Ampicillin) wurden mit dem entsprechenden Bakterienklon angeimpft und über Nacht bei 37°C und 250rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurden 150µl der Bakterienkultur mit 850µl 87%-iger Glycerol-Lösung versetzt und bei -70°C gelagert.

3.4.7.8 DNA-SEQUENZIERUNG

Referenz: Protokoll des *BigDye Terminator Kits* (ABI)

Lösungen und Enzyme:

BigDye-Reaktionslösung (ABI)

halfTERM-Puffer (Genpak, Brighton, UK)

Durchführung:

Taq BigDye Terminator cycle sequencing Methode:

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

Die cycle sequencing Reaktion erfolgte in einem PCR-Thermocycler mit folgendem Temperaturprogramm:

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

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

Die DNA-Sequenzierung erfolgte durch Mitarbeiter des Servicelabors am Institut für Zellbiologie und klinische Neurobiologie des Universitätsklinikum Eppendorf (UKE) auf einem ABI PrismTM377 DNA-Sequencer der Firma Applied Biosystems. Die DNA-Sequenz wurde in Form eines vierfarben Elektropherogramms dokumentiert.

3.4.7.9 ZELLKULTUR

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

Nährmedien, Seren und Puffer:

Dulbecco modifiziertes Minimal Essential Medium (DMEM) (Seromed)

Fötale Kälberserum (FCS) (Seromed)

0.1.1 × 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.

3.4.7.10 MEDIUMWECHSEL VON ZELLEN

Alle Zellen wurden als Monolayerkulturen bei 37°C in einer 5%-igen CO₂-Atmosphäre in 100 × 15mm Zellkulturschalen (Nunc) kultiviert. Das Medium wurde in einem wöchentlichen Rhythmus von Montag – Mittwoch – Freitag gewechselt. Dazu wurde das alte Medium entfernt und gegen frisches DMEM (+ 10% FCS) ausgewechselt.

3.4.7.11 SUBKULTIVIERUNG VON ZELLEN

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 5ml PBS wurden die Zellen nach Zugabe von 5ml Trypsinlösung 3 bis 5min bei 37°C in einer 5%-igen CO₂-Atmosphäre inkubiert. Die von der Kulturschale abgelösten Zellen wurden zur Inhibierung des Trypsins mit 8ml DMEM (+ 10% FCS) versetzt und 5min bei 1.000rpm zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellsediment in 10ml frischem DMEM (+ 10% FCS) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in geeigneter Verdünnung passagiert.

3.4.7.12 ZELLZAHLBESTIMMUNG

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

3.4.8 TRANSFEKTION VON COS-ZELLEN

Vorbereitung von 12-Loch-Schalen

Lösungen und Materialien:

70%-iger Ethanol

12-Loch-Schalen (Costar)

Poly-Lysin-Lösung

Durchführung:

Zur Vorbereitung der 12-Loch-Schalen wurden runde Deckgläschen (400mm²) mit 70%-igem Ethanol gespült, abgeflammt und auf die Schalen verteilt. Die Deckgläschen wurden mit 500µl Poly-Lysin-Lösung benetzt und 5min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Poly-Lysin-Lösung entfernt und die Schalen über Nacht bei RT getrocknet.

3.4.8.1 EINSÄEN VON COS-ZELLEN IN DIE 12-LOCH-SCHALEN**Durchführung:**

Für das Einsäen der COS-Zellen in die 12-Loch-Schale wurden subkonfluente Zellen (75% Konfluenz) verwendet. Nach der Subkultivierung (s. 3.4.7.11) wurde das Zellsediment in 10ml PBS resuspendiert, erneut zentrifugiert, der Überstand entfernt und die sedimentierten Zellen in 10ml FCS-freiem DMEM resuspendiert (vgl. Synchronisation von COS-Zellen). Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in der entsprechenden Konzentration auf die 12-Loch-Schale verteilt.

3.4.8.2 SYNCHRONISATION VON COS-ZELLEN

Referenz: Fantès und Brooks (1993)

Zur Synchronisation wurden die COS-Zellen 24h in FCS-freiem DMEM bei 37°C in einer 5%-igen CO₂-Atmosphäre kultiviert.

3.4.8.3 DEAE-DEXTRAN-METHODE

Referenz: Cullen *et al.* (1987)

Lösungen und Medien:

TE-Puffer

PBS

1%-ige DEAE-Dextran-Lösung (Pharmacia) in PBS

serumfreies DMEM

serumhaltiges DMEM (10% FCS)

100mM Chloroquin

Durchführung:

In einer 12-Loch-Schale wurden pro Loch 2×10^4 Zellen in 1ml FCS-freiem DMEM ausgesät und 24h bei 37°C in einer 5%-igen CO₂-Atmosphäre kultiviert.

Zur Herstellung des Transfektionsansatzes wurde zunächst 1µg Plasmid-DNA in 25µl TE-Puffer aufgenommen und 10min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA-Lösung mit 15µl 1%-iger DEAE-Dextran-Lösung und 160µl PBS versetzt. Die Zellen wurden zweimal mit je 1ml PBS gewaschen, die Deckgläschen mit 200µl des jeweiligen Transfektionsansatzes überschichtet und 30min bei RT inkubiert. Danach wurde der Transfektionsansatz entfernt, die Zellen zweimal mit je 1ml PBS gewaschen und für 4h mit je 1ml Chloroquin-haltigem DMEM bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Chloroquin-haltige Medium gegen DMEM (+ 10% FCS) ausgewechselt und die Zellen für weitere 24 bis 48h kultiviert.

3.4.8.4 FUGENE-METHODE

Referenz: Protokoll des *FuGENE 6 Transfection Reagent Kits* (Boehringer)

Lösungen und Medien:

FuGENE 6 Transfection Reagent (Boehringer, Mannheim)

serumfreies DMEM

serumhaltiges DMEM (10% FCS)

Durchführung:

In einer 12-Loch-Schale wurden pro Loch 5×10^4 Zellen in 1ml FCS-haltiges DMEM ausgesät und 24h bei 37°C in einer 5%-igen CO₂-Atmosphäre kultiviert. Etwa 2h vor der Transfektion wurde das serumhaltige Medium gegen serumfreies Medium ausgewechselt.

Nach Bestimmung des optimalen Verhältnisses von FuGENE (Volumen) zu Plasmid-DNA (Masse) wurden 4µl FuGENE und 1µg Plasmid-DNA für die Herstellung der entsprechenden Transfektionsansätze verwendet.

In ein 1.5ml Eppendorfgefäß wurde serumfreies DMEM vorgelegt, so dass nach Zugabe des FuGENE-Reagenz das Gesamtvolumen 100µl betrug. Um die Absorption des FuGENE-Reagenz an der Wandung des Eppendorfgefäßes zu verhindern, wurde das Reagenz direkt in das vorgelegte Medium pipettiert. Nach einer Inkubation von 5min bei RT wurde das verdünnte FuGENE-Reagenz in ein zweites 1.5ml Eppendorfgefäß mit der entsprechenden DNA-Lösung (1µg DNA in 10µl Wasser) tropfenweise hinzugegeben. Durch Antippen wurde der Transfektionsansatz vorsichtig gemischt und 15min bei RT inkubiert. Danach wurde der Transfektionsansatz tropfenweise direkt in das FCS-haltige Medium gegeben und durch vorsichtiges Schwenken der 12-Loch-Schale gleichmäßig verteilt. Die Zellen wurden 24h bei 37°C in einer 5%-igen CO₂-Atmosphäre kultiviert.

Die transient exprimierten β-Galactosidase-Fusionsproteine wurden anschließend anhand der X-Gal-Farbreaktion oder mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen.

3.4.9 NACHWEIS VON β-GALACTOSIDASE-FUSIONSPROTEINEN

3.4.9.1 NACHWEIS ENZYMATISCH AKTIVER β-GALACTOSIDASE

Referenz: Sanes *et al.* (1986)

Lösungen:

4%-ige Formaldehydlösung

PBS

0.2% Triton X-100 in PBS

X-Gal-Reaktionslösung

Mowiol

Durchführung:

Fixierung und Permeabilisierung von COS-Zellen:

Die transfizierten Zellen wurden nach zweimaligem Waschen mit je 1ml PBS mit 0.75ml einer 4%-igen Formaldehydlösung versetzt und 10min bei RT inkubiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen zweimal mit je 1ml PBS gewaschen. Durch Zugabe von 0.75ml 0.2%-iger Triton X-100-Lösung und einer fünfminütigen Inkubation

erfolgte die Permeabilisierung der Zellen. Danach wurde erneut zweimal mit je 1ml PBS gewaschen.

Färbung:

Die fixierten und permeabilisierten Zellen wurden mit 0.75ml X-Gal-Reaktionslösung versetzt und bis zum Eintreten der Blaufärbung (in der Regel nach 10min) bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Entfernung der X-Gal-Reaktionslösung und Waschen mit 1ml PBS gestoppt.

Anfertigung von Dauerpräparaten:

Die in PBS gelagerten Deckgläschen wurden mit bidestilliertem Wasser gewaschen und mit Mowiol auf einen Objektträger fixiert. Die Präparate wurden bei 4°C gelagert.

3.4.10 INDIREKTE IMMUNFLOURESZENZ VON β -GALACTOSIDASE-FUSIONSPROTEINEN

Referenz: Kundu-Michalik (1997)

Lösungen:

PBS

4%-ige Formaldehydlösung

0.1M Glycin in PBS

0.2% Triton X-100 in PBS

5% (w/v) Milchpulver in PBS

0.5% (w/v) Milchpulver in PBS

1. Antikörper: monoklonaler β -Galactosidase-Antikörper aus der Maus (Boehringer)
10 μ g/ml in 0.5% Milchpulver
2. Antikörper: FITC-konjugierter Anti-Maus-IgG-Antikörper aus der Ziege (Sigma)
1:80-Verdünnung in 0.5% Milchpulver

ProLong Antifade Kit (MoBiTec)

Durchführung:**Fixierung und Permeabilisierung von COS-Zellen:**

Nach der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit je 1ml PBS gewaschen und nacheinander mit jeweils 0.75ml 4%-iger Formaldehydlösung für 10min, 0.75ml 0.1M Glycinlösung für 10min und 0.75ml 0.2%-iger Triton X-100-Lösung für 5min inkubiert. Nach jedem Inkubationsschritt wurde zweimal mit jeweils 1ml PBS gewaschen.

Färbung:

Zur Absättigung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen wurden die Zellen 30min mit 1ml 5%-iger Milchpulverlösung bei RT inkubiert und zweimal mit je 1ml 0.5%-iger Milchpulverlösung gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 100µl des ersten Antikörpers versetzt. Nach einer Inkubation von 1h bei RT wurde die Antikörperlösung entfernt und die Zellen dreimal mit je 1ml 0.5%-iger Milchpulverlösung für 10min gewaschen. Nach dem Waschen erfolgte eine einstündige Inkubation bei RT mit 100µl des zweiten Antikörpers. Die Zellen wurden wiederum dreimal für 10min mit je 1ml 0.5%-iger Milchpulverlösung, dann zweimal für jeweils 5min mit PBS gewaschen.

Anfertigung von Dauerpräparaten:

Nach dem Waschen wurden die Deckgläschen kurz mit bidestilliertem Wasser gewaschen und mit etwa 20µl *ProLong Antifade Kit* auf einem Objektträger fixiert. Das *ProLong Antifade Kit* reduziert das Ausbleichen des FITC-Farbstoffes.

3.4.10.1 DETEKTION VON β -GALACTOSIDASE-FUSIONSPROTEINEN

Die Detektion der S6A- β -Galactosidase-Fusionsproteine erfolgte mit Hilfe des Mikroskops Axiovert 135 (Zeiss) bei einer 630-fachen Vergrößerung (Objektiv: Plan Apochromat 63×/1.40 Oil Ph 3).

3.4.11 NACHWEIS VON PHOSPHORYLIERTEM RPS6 MIT PHOSHOPEPTID-SPEZIFISCHEN ANTIKÖRPERN

Referenz: A. Bauche (pers. Mitteilung)

Die transiente Expression von S6-Mutanten wurde in COS-Zellen durchgeführt, die einen Tag vor der Transfektion ausgesät wurden. Die Transfektion mit den verschiedenen S6-Deletionskonstrukten im pcDNA/5FRT/TO (Invitrogen) erfolgte nach der FuGENE-Methode. Die transfizierten COS-Zellen wurden auf großen Zellkulturschalen (14cm Durchmesser) bis zur Subkonfluenz (~75% Konfluenz) ca. 72 Stunden kultiviert und für eine Stunde mit frischem Medium, das 10% FCS enthielt, stimuliert, um einen hohen Phosphorylierungsgrad im S6-Protein zu erreichen. Anschließend wurden Zellextrakte hergestellt. Dabei wurden die Zellen abtrypsinisiert, zweimal mit je 30ml eiskaltem PBS gewaschen und in 1ml PBS resuspendiert und in ein Eppendorf-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 800rpm in der Eppendorfszentrifuge sedimentiert und das PBS wurde vollständig abpipettiert. Die Zellen wurden in 650µl hypotonem, eiskaltem RSB-Puffer resuspendiert und 5min im Eisbad inkubiert, damit sie schwellen. Vor der Detergenzbehandlung wurden 50µl Zellsuspension für die Präparation eines Gesamtzellextraktes (CE) entnommen. Die Zellen wurden mit 1% Triton X100 Endkonzentration aufgeschlossen und die Zellkerne wurden in einer Eppendorfszentrifuge bei 3600rpm (~ 1000g) abzentrifugiert.

Der postnucleare Überstand (PNS = postnuclear supernatant) wurde quantitativ in ein 15ml Falcon-Röhrchen überführt. Der postnucleare Überstand wurde nochmals bei 5000rpm (~ 4000g) zentrifugiert, um eventuell noch vorhandene Kernreste zu entfernen. Das Kernpellet wurde ein zweites Mal mit 270µl RSB-Puffer plus 30µl 10%igem Triton X100 extrahiert, um geringe Reste von cytosolischen Ribosomen, die hochphosphoryliertes rpS6 enthalten, vollständig zu entfernen. Die sedimentierten Kerne (ca. 30µl) wurden mit 70µl RSB-Puffer versetzt und resuspendiert. 5µl dieser Suspension wurden in Gel-Probenpuffer aufgenommen und nach Erhitzen die denaturierten Proteine auf einem 10%igem SDS-Gel getrennt. Anschließend wurden die Gele für 2h bei 130mA geblottet. Der Nachweis der S6-Mutanten erfolgte zunächst mit einem aminoterminalen und carboxyterminalen S6-Antikörper.

Der Phosphorylierungsgrad von rpS6 wurde mit phosphopetidspezifischen Antikörpern charakterisiert.

3.4.12 WEBLOGO

Referenz: Crooks et al., 2004; Schneider und Stephens (1990); <http://weblogo.berkeley.edu/>

Sequenzlogos sind die graphische Darstellung und der Vergleich von mehreren Aminosäure- oder Nucleinsäuresequenzen mittels Software. Diese wurde von Tom Schneider and Mike Stephens entwickelt. Jedes Logo besteht aus einem Block von Symbolen. Die Gesamthöhe eines Blockes zeigt die Konserviertheit einer Position in der Sequenz an, wohingegen die Höhe der einzelnen Symbole im Stapel die relative Häufigkeit jeder Amino- oder Nucleinsäure an dieser Position darstellt. Generell liefert ein Sequenzlogo eine informationsreichere und präzisere Beschreibung, zum Beispiel einer Bindungsstelle, als eine Konsensussequenz.

3.5 GERÄTE

Sterilwerkbänke:

Bioguard Hood (Baker Company)

Hera Safe (Heraeus)

Zentrifugen:

Biofuge pico (Heraeus)

Minifuge GL (Heraeus)

TJ-6 Zentrifuge (Beckmann)

J-21C Zentrifuge (Beckmann)

Eppendorfzentrifugen 5412, 5415C (Eppendorf)

Brutschrank:

HeraCell (Heraeus)

Luftschüttler:

G25 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific)

Photometer:

Ultraspec III (Pharmacia)

Powersupply:

Phero-stab. 200 (Biotec Fischer)

Agarose-Gelelektrophorese-Apparatur:

GNA-100 (Pharmacia)

UV-Transilluminator:

C61 (UV Products)

Geldokumentationssystem:

UVP Image Store 7500 (UV Products)

PCR-Thermocycler:

Personal Cycler (Biometra)

Heizblock:

Thermomixer comfort (Eppendorf)

Mikroskope:

Diavert (Leitz)

Axiovert 135 (Zeiss)

Axiovert 100 – Micro Systems LMS (Zeiss)

4. ERGEBNISSE

4.1 KERNLOKALISATIONSSIGNALE UND NUCLEOLARE

BINDUNGSSEQUENZEN IM RPS6

In der vorliegenden Arbeit sollte nach einer zweiten nucleolaren Bindungssequenz (NoBiS) im humanen ribosomalen Protein S6 (hrpS6) gesucht werden. Die Struktur eventuell gefundener NoBiS sollte mit dem ribosomalen Protein S6A („yeast ribosomal protein“, yrpS6A) aus *Saccharomyces cerevisiae* verglichen werden. Es wurden mittels PCR hrpS6- und yrpS6A-cDNA-Fragmente generiert und gerichtet in den Vektor pASH- bzw. pASH-SV40 kloniert. Diese eukaryontischen Expressionsvektoren enthalten die prokaryontische β -Galactosidase als Reporter-Protein, mit dessen Hilfe die Lokalisation der Fusionsproteine in COS- und HeLa-Zellen detektiert werden kann.

Das humane ribosomale Protein S6 (hrpS6) besitzt insgesamt drei Kernsignale: die zwei monopartiten Kernsignale NLS I und NLS II (Schmidt *et al.*, 1995) sowie das bipartite Kernsignal NLS III (Lipsius *et al.*, 2005). Darüber hinaus konnte Kundu-Michalik (1997) in der C-terminalen Hälfte von hrpS6 eine relativ große nucleolare Bindungssequenz nachweisen.

Im homologen ribosomalen Protein S6A aus *Saccharomyces cerevisiae* konnte ebenfalls das dem hrpS6 analoge bipartite Kernlokalisierungssignal NLS III identifiziert werden (Phlippen, 1994). Das NLS I konnte bis dato auf den Aminosäurenbereich 160-173 und das NLS II auf den Bereich 179-197 eingegrenzt werden (Lipsius *et al.*, 2005).

	S6 (<i>Homo sapiens</i>)	S6A (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
NLS I	167 KKPR 170 ^a	160 REVTKGKETYTKAP 173 ^b
NLS II	188 KRRR 191 ^a	179 TPQRLQRKRHRQALKVRN 197 ^b
NLS III	215 KR 216 und 230 KRRR 233 ^b	214 KR 215 und 227 RKRR 230 ^d
NoBiS1	?	74 – 135 ^f
NoBiS2	170 – 210 ^c	174 – 214 ^e

Tab. 4.1 Kernlokalisierungssignale (NLS) und nucleolare Bindungssequenzen (NoBiS) der ribosomalen Proteine hrpS6 und yrpS6A.

[(a) Schmidt *et al.*, 1995; (b) Lipsius *et al.*, 2005; (c) Kundu-Michalik, 1997; (d) Phlippen, 1994; (e) Leicher, 1994; (f) Kundu-Michalik, 2007]

Dieses Kernsignal zeigt eine für Hefe typische Sequenz (Tab. 4.1) die sich von den rein basischen NLS der Mammalia unterscheidet (Chelsky *et al.*, 1989). Die nucleolusbindende Domäne NoBiS2 im *yrsS6A* wurde auf den Aminosäurebereich 174-214 (Leicher, 1994) und im *hrpS6* auf den Aminosäurebereich 170-210 (Kundu-Michalik, 1997) eingegrenzt.

4.2 DER EXPRESSIONSVEKTOR PASH

Der von Hoth (1993) konstruierte eukaryontische Expressionsvektor pKHlacZ leitet sich vom 5.2 kb großen pRc/RSV-Vektor (Invitrogen Corp., De Schelp, Niederlande) ab und enthält das prokaryontische 3.3 kb große β -Galactosidase codierende lacZ-Gen aus dem pBluescript II KS(-)-Vektor (Stratagene, Heidelberg).

Der verwendete pASH-Vektor stellt eine die MCS (multiple cloning site) betreffende Modifikation des pKHlacZ-Vektors dar. Die veränderte MCS enthält anstelle der ursprünglichen Restriktionsschnittstellen *Not* I und *Hind* III die von Kundu-Michalik (1997) eingeführten Schnittstellen *Afl* II, *Spe* I und *Hind* III. Die singulären Restriktionsschnittstellen *Afl* II und *Hind* III ermöglichen eine gerichtete Klonierung entsprechend restringierter DNA-Fragmente. Da durch die Einführung von *Spe* I in die MCS diese Restriktionsschnittstelle insgesamt zweimal im pASH-Vektor vorkommt, kann die Vektor-Modifizierung durch die Restriktion mit *Spe* I kontrolliert werden. Das Auftreten einer 4.6 kb und 3.9 kb großen Doppelbande weist darauf hin, dass die MCS des pKHlacZ-Vektors erfolgreich gegen die MCS des pASH-Vektors ausgetauscht wurde.

Der pASH-Vektor weist folgende Charakteristika auf:

- Die LTR Enhancer-Promotor Sequenz des Rous Sarcom Virus (P_{RSV}) dient als Transkriptionsstartstelle.
- Die MCS ermöglicht die gerichtete Klonierung entsprechend restringierter DNA.
- Der universelle Translationsstart ATG ermöglicht die Expression von Fusionsproteinen ohne eigenes Startcodon.
- Mit Hilfe des am 3'-Ende der MCS lokalisierten lacZ-Gens können β -Galactosidase-Fusionsproteine exprimiert werden.
- Das Polyadenylierungssignal und die Transkription-Terminator Sequenzen des BGH-Gens (BGH pA) gewährleisten die posttranskriptionale Polyadenylierung synthetisierter mRNA.

- Der M13-Replikationsursprung (F1 ori) bietet die Möglichkeit, codierende DNA-Sequenzen durch Mutagenese zu modifizieren oder Plasmid-Einzelstränge zur DNA-Sequenzierung zu erzeugen.
- Das Neomycin-Resistenzgen steht unter der Kontrolle eines SV40-Promotors (P_{SV40} ori) und ermöglicht die stabile Kultivierung transfizierter eukaryontischer Zelllinien (COS-Zellen), die das große SV40 T-Antigen exprimieren. Das SV40-Polyadenylierungssignal (SV40 pA) vermittelt die posttranskriptionale Polyadenylierung der Neomycin-mRNA.
- Die ColE1-Sequenz fungiert als Replikationsursprung für die Vektor-Amplifikation in *E. coli*.
- Das β -Lactamase-Gen vermittelt Ampicillinresistenz und ermöglicht die Selektionierung plasmidtragender *E. coli*.

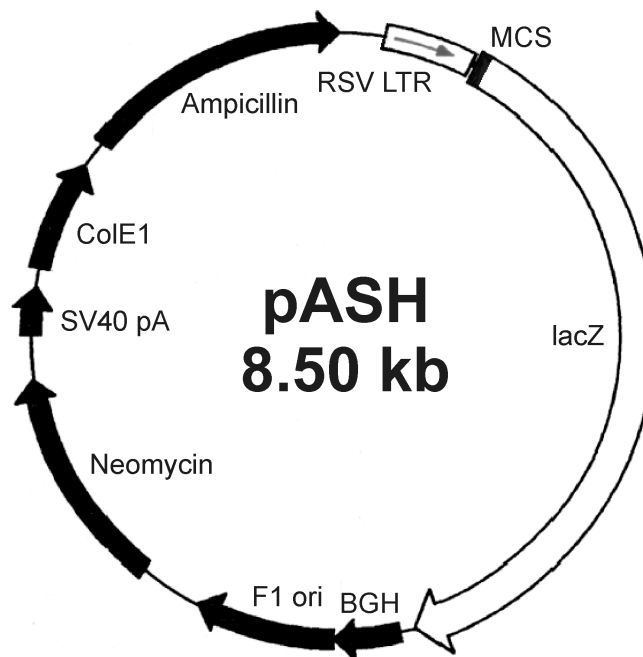


Abb. 4.1 Genkarte des pASH-Vektors. Die einzelnen Fragmente, die zur Konstruktion verwendet wurden, sind im Text beschrieben.

4.3 KONSTRUKTION DES PASH-SV40-VEKTORS

Um die nucleolare Akkumulation ribosomaler Protein-Fragmente mit deletierten NLS zu untersuchen, wurde der Vektor pASH-SV40 eingesetzt.

Der pASH-SV40-Vektor weist im Gegensatz zum pASH-Vektor am 5'-Ende der MCS das klassische Kernlokalisierungssignal (cNLS) des großen SV40 T-Antigens auf (vgl. Abb. 4.2) und ermöglicht den Import von exprimierten Proteinen ohne eigene NLS in den Zellkern (s. 1.2.1).

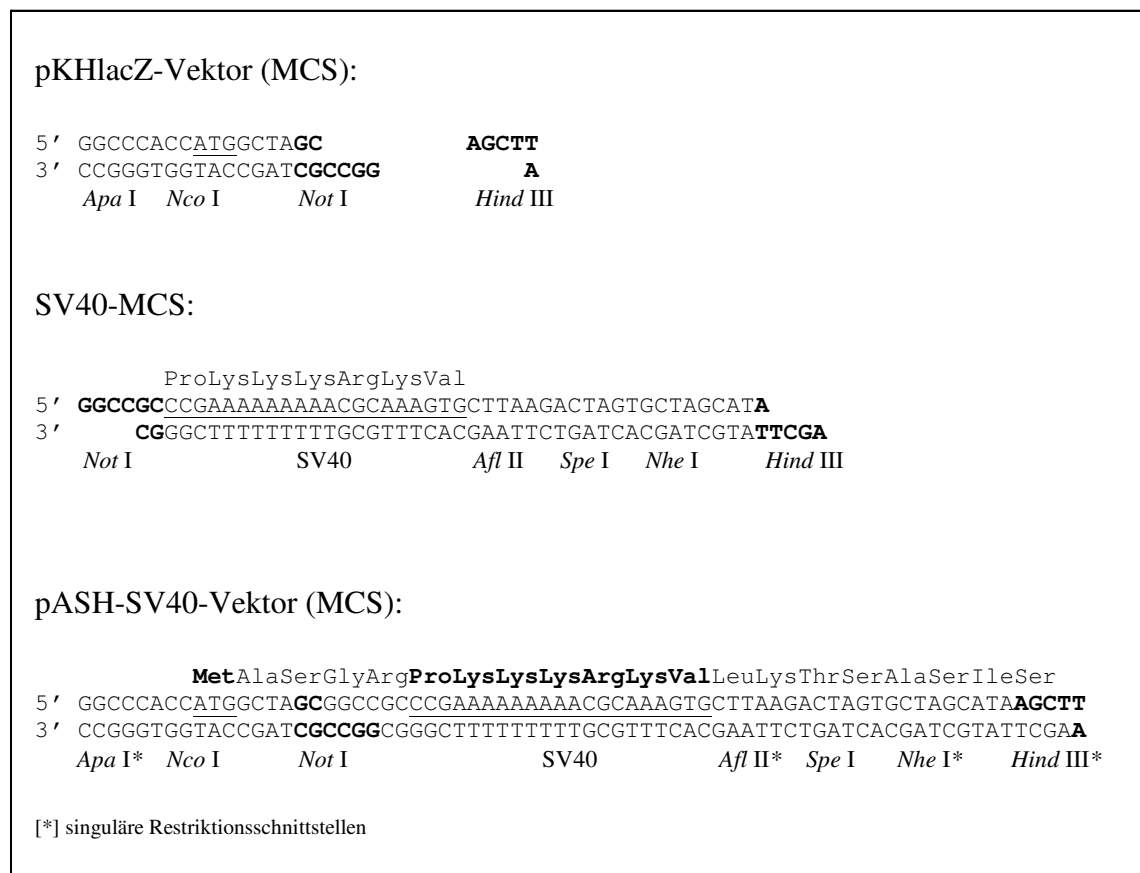


Abb. 4.2 Konstruktion des pASH-SV40-Vektors.

Der pKHIacZ-Vektor wurde mit *Not* I und *Hind* III restringiert, gelelektrophoretisch isoliert und gereinigt. Die beiden Oligonucleotide SV40.1 und SV40.2 (s. 6.4) wurden nach Hybridisierung zur Generierung der doppelsträngigen SV40-MCS in einem molaren Verhältnis von 50:1 (Insert:Vektor) in den geschnittenen pKHIacZ-Vektor ligiert (vgl. Abb. 4.2). Zur Amplifizierung des neu konstruierten pASH-SV40-Vektors erfolgte die Transformation in INV α F'-Zellen. Die transformierten Zellen wurden auf Ampicillin-haltigen Selektivagarplatten kultiviert.

Die erfolgreiche Konstruktion des pASH-SV40-Vektors wurde nach der Plasmidpräparation anhand einer geeigneten Restriktionsanalyse nachgewiesen. Dazu wurde der Vektor in Einzelreaktionen mit den Restriktionsendonucleasen *Afl* II, *Spe* I und *Hind* III geschnitten. Als Negativ- bzw. Positivkontrolle wurden die beiden Vektoren pKHlacZ bzw. pASH ebenfalls mit diesen drei Enzymen restringiert. Die geschnittenen Vektoren wurden mittels Gelelektrophorese in einem 1%-igen Agarose-Gel aufgetrennt.

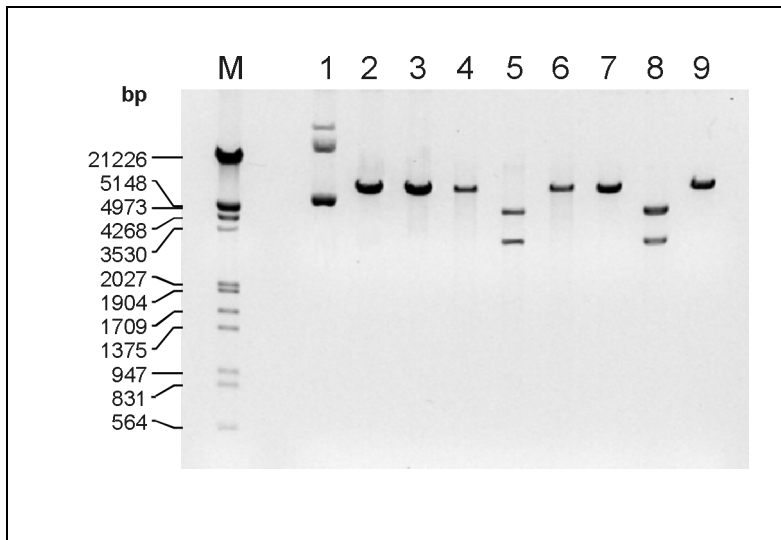


Abb. 4.3 Restriktionsmuster der Vektoren pKHlacZ, pASH und pASH-SV40.
1%-iges Agarose-Gel, Ethidiumbromidfärbung.

- Spur M: DNA-Molekulargewichtsmarker III (Appligene)
- Spur 1: *Afl* II-restringierter pKHlacZ-Vektor
- Spur 2: *Spe* I-restringierter pKHlacZ-Vektor
- Spur 3: *Hind* III-restringierter pKHlacZ-Vektor
- Spur 4: *Afl* II-restringierter pASH-Vektor
- Spur 5: *Spe* I-restringierter pASH-Vektor
- Spur 6: *Hind* III-restringierter pASH-Vektor
- Spur 7: *Afl* II-restringierter pASH-SV40-Vektor
- Spur 8: *Spe* I-restringierter pASH-SV40-Vektor
- Spur 9: *Hind* III-restringierter pASH-SV40-Vektor

Da sowohl das *Afl* II- als auch das *Spe* I-Restriktionsmuster des pASH-SV40-Vektors (Spur 7 bzw. 8) mit denen der Positivkontrolle pASH-Vektor (Spur 4 bzw. 5) nicht aber mit denen der Negativkontrolle pKHlacZ-Vektor (Spur 1 und 2) übereinstimmen (Abb. 4.3), kann davon ausgegangen werden, dass die SV40-MCS erfolgreich in den pKHlacZ-Vektor kloniert wurde.

Der Leserahmen des pASH-SV40-Vektors (vgl. Abb. 4.4) wurde durch DNA-Sequenzierung überprüft. Dabei fungierte das Oligonucleotid pASH-Fseq als Sequenzier-Primer (s. 6.3).

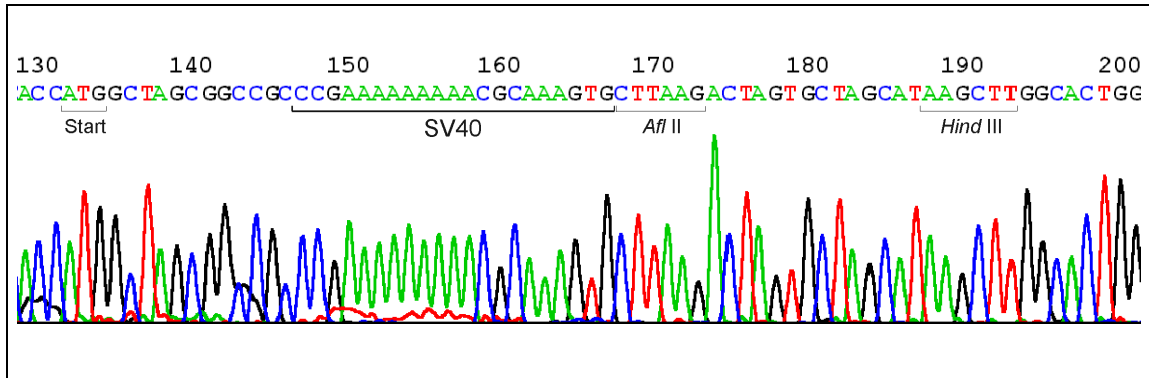


Abb. 4.4 DNA-Sequenz der MCS des pASH-SV40-Vektors.

4.4 KONSTRUKTION VON CDNA-FRAGMENTEN MITTELS PCR

Die verschiedenen DNA-Fragmente der ribosomalen Proteine hrpS6 und yrpS6A wurden mittels PCR generiert und anschließend in den pASH- bzw. pASH-SV40-Vektor kloniert. Als Template-DNA diente ein pBluescript II KS-Vektor (Stratagene, Heidelberg), der das yrpS6A-Gen – inklusive Intron – aus *Saccharomyces cerevisiae* enthält. Zur gerichteten Klonierung wiesen die verwendeten PCR-Primer an ihren 5'-Enden zusätzlich Linkersegmente mit den Restriktionsschnittstellen *Afl* II bzw. *Hind* III auf (s. 6.1.5). Um unspezifische Anlagerungen der PCR-Primer zu vermeiden, muß gewährleistet werden, dass die 12-18 Basen langen Linkersegmente keine Homologie zu der zu amplifizierenden DNA-Sequenz aufweisen.

Da das yrpS6A-Gen (Leer *et al.*, 1982), in dem die ersten beiden Aminosäuren (M und K) durch ein Intron von den restlichen Aminosäuren des yrpS6A-Proteins getrennt sind, als Template-DNA diente, wurden diese beiden Aminosäuren ebenfalls mittels PCR generiert.

Die Anlagerungstemperatur der ersten Zyklen wurde durch den hybridisierenden Teil der entsprechenden PCR-Primer nach folgender Formel ermittelt:

$$T_m = \left[\left(\sum_{G+C} \times 4 \right) + \left(\sum_{A+T} \times 2 \right) \right] - 4$$

\sum_{G+C} : Anzahl der Basen G und C

\sum_{A+T} : Anzahl der Basen A und T

Die Amplifizierung der *hrpS6*- und *yrpS6A*-cDNA-Fragmente erstreckte sich über insgesamt 35 Reaktionszyklen. Die ersten 5 Zyklen erfolgten bei einer Anlagerungstemperatur von 43°C. Da sich jedoch der Hybridisierungsbereich der Primer um die Linkersegmente verlängert, wurde die Anlagerungstemperatur in den folgenden 7 Zyklen schrittweise um 2°C bis zu einer Endtemperatur von 57°C erhöht. Die letzten 23 Zyklen erfolgten bei dieser Endtemperatur (s. 3.4.3.1).

Beim Entwurf der PCR-Primer wurde darauf geachtet, dass die Anlagerungstemperaturen der 5'- und 3'-PCR-Primer nicht mehr als 2°C voneinander abwichen. Damit konnte die PCR mit jeder Kombination von 5'- und 3'-Primer durchgeführt werden, ohne die PCR-Bedingungen verändern zu müssen.

Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt, in 1–2%-igen Agarose-Gelen, je nach aufzutrennendem Molekulargewicht, anhand ihrer Größe überprüft und mit den beiden Restriktionsendonucleasen *Afl* II und *Hind* III in einem Doppelverdau restringiert. Nach gelelektrophoretischer Isolierung und anschließender Aufreinigung wurden die geschnittenen cDNA-Fragmente des ribosomalen Proteins S6A in den Vektor pASH bzw. pASH-SV40 kloniert.

4.5 KOLONIERUNG VON HRPS6- UND YRPS6A-CDNA-FRAGMENTEN IN DEN PASH- UND PASH-SV40-VEKTOR

Der pASH- bzw. pASH-SV40-Vektor wurde mit *Afl* II und *Hind* III in einem Doppelverdau restringiert, gelelektrophoretisch isoliert und aufgereinigt. Um die Re-Ligation unvollständig geschnittener Vektoren zu vermeiden, erfolgte die 5'-Dephosphorylierung mittels alkalischer Phosphatase. Der gereinigte dephosphorylierte Vektor wurde durch gelelektrophoretische Isolierung und nachfolgender Aufreinigung erhalten.

Nach Ermittlung der optimalen Ligationsbedingungen erfolgte die Ligation der *yrpS6A*-cDNA-Fragmente in den pASH- bzw. pASH-SV40-Vektor in einem molaren Verhältnis von 10:1 (Insert:Vektor).

Nach Klonierung der *yrpS6A*-cDNA-Fragmente in die entsprechenden Vektoren erfolgte die Transformation kompetenter *INV α F'*-Zellen mit den entsprechenden Ligationsansätzen und die anschließende Kultivierung auf Ampicillin-haltigen Selektivagarplatten. Zum Nachweis einer erfolgreichen Klonierung wurden die Konstrukte nach erfolgter Plasmidpräparation in einem Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen *Afl* II und *Hind* III geschnitten und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Ein zusätzlich zum

linearisierten Vektor auftretendes DNA-Fragment der erwarteten Größe wies auf eine erfolgreiche Klonierung hin. Der Leserahmen der Konstrukte wurde mittels DNA-Sequenzierung überprüft. Bei kurzen Sequenzen erfolgte die DNA-Sequenzierung lediglich mit dem Sense-Primer pASH-Fseq. Da jedoch die effektive Leseweite auf etwa 600-800bp beschränkt war, wurde bei langen Sequenzen (>500bp) zusätzlich der Antisense-Primer pASH-Rseq, der die Sequenzierung des nicht-codierenden DNS-Stranges ermöglicht, verwendet (s. Tab. 6.3).

4.6 SYNCHRONISATION VON COS-ZELLEN IN DER G₀-PHASE

Die G₀-Phase repräsentiert innerhalb des Zellzyklus die Phase, in der keine Proliferation stattfindet. Zur Synchronisation der Zellen in der G₀-Phase wurden die COS-Zellen vor der Transfektion für 24h in FCS-freiem DMEM-Medium bei 37°C in einer 5%-igen CO₂-Atmosphäre kultiviert. In einer Reihe von Vorversuchen hat sich gezeigt, dass sowohl die Transfektionseffizienz als auch die Expressionsrate entscheidend davon abhängen, in welchem Stadium des Zell-Zyklus sich die Zellen befinden. Durch die Akkumulation der Zellen in G₀ wurden optimale Versuchsbedingungen für die folgende Transfektion geschaffen.

4.7 TRANSIENTE EXPRESSION VON β -GALACTOSIDASE-FUSIONS-PROTEINEN IN COS-ZELLEN

In G₀ arretierte COS-Zellen, die eine Subkonfluenz von 50-75% aufwiesen, wurden mit Hilfe des FuGENE 6-Transfektions-Reagenz mit den entsprechenden rekombinanten Plasmiden transfiziert. Jeder Transfektionsansatz erfolgte prinzipiell in einer Doppelbestimmung und in Gegenwart der zuvor erwähnten Kontrollplasmide. Dazu wurden die Zellen mit 1 μ g Plasmid-DNA transfiziert und 20h in FCS-haltigem DMEM-Medium bei 37°C in einer 5%-igen CO₂-Atmosphäre kultiviert. Nach Fixierung der transfizierten COS-Zellen erfolgte die intrazelluläre Lokalisation der β -Galactosidase-Fusionsproteine mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz mittels monoklonalem Anti- β -Galactosidase-Antikörper aus der Maus und einem FITC-konjugierten Anti-Maus-IgG-Antikörper aus der Ziege.

4.8 DETEKTION UND DOKUMENTATION VON β -GALACTOSIDASE-FUSIONSPROTEINEN

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

Da eine genaue Quantifizierung der durch die indirekte Immunfluoreszenz lokalisierten β -Galactosidase-Fusionsproteine nicht möglich war, repräsentieren die in dieser Arbeit dargestellten Bilder eine Auswahl aus einer Vielzahl von durchgeführten Experimenten. Dabei dienten spezifizierte Konstrukte des hrpS6 für cytoplasmatische DNA, nucleare (Nu) und nucleolare (No) Färbung als direktes Bezugssystem für die Lokalisation der transient exprimierten ribosomalen Proteine hrpS6 und yrpS6A in COS-Zellen.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der transient exprimierten β -Galactosidase-Fusionsproteine in COS-Zellen als Fluoreszenzaufnahmen bei einer 630-fachen Vergrößerung dargestellt.

4.8.1 LOKALISATION VON β -GALACTOSIDASE

Zur Untersuchung des Kerntransports und der nucleolaren Akkumulation der ribosomalen hrpS6- und yrpS6A-Proteine mit Hilfe von β -Galactosidase-Fusionsproteinen, muß zunächst sichergestellt werden, dass β -Galactosidase als Reporter-Protein ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert und nicht dazu in der Lage ist, yrpS6A-Fragmente in den Zellkern zu transportieren.

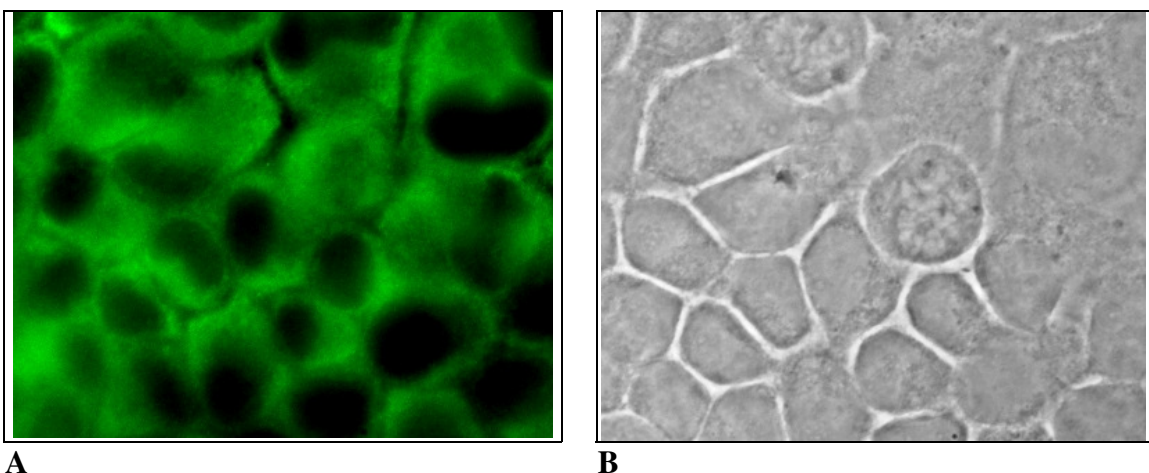


Abb. 4.5 Lokalisation von β -Galactosidase, Darstellung durch Immunfluoreszenz (A) und dieselben Zellen in der Phasenkontrastdarstellung (B).

Dazu wurden COS-Zellen mit dem pASH-Vektor transfiziert und die intrazelluläre Lokalisation der β -Galactosidase durch indirekte Immunfluoreszenz bestimmt.

Die β -Galactosidase aus dem pASH-Vektor lokalisiert eindeutig im Cytoplasma. Damit ist bewiesen, dass es sich bei diesem Reporter-Protein um ein cytoplasmatisches Protein ohne eigenes Kernlokalisierungssignal handelt.

Das Enzym β -Galactosidase ist aus vier identischen Untereinheiten, die ein MW von etwa 116kDa besitzen, aufgebaut. Dieses tetramere Molekül ist zu groß, um durch die Kernporen in das Nucleoplasma zu diffundieren, d.h. ein Nachweis von β -Galactosidase im Zellkern ist nur nach Anfügen eines funktionierenden Kernsignales möglich.

4.8.2 LOKALISATION VON SV40- β -GALACTOSIDASE

Zur Bestimmung der nucleolaren Akkumulation von hrpS6- und yrpS6A-Fragmenten mit deletierten Kernlokalisierungssignalen wurde der pASH-SV40-Vektor verwendet. In diesem Fall mußte zunächst sichergestellt werden, dass β -Galactosidase mit N-terminaler SV40-NLS im Zellkern lokalisiert und nicht dazu in der Lage ist, die Akkumulation von Fusionsproteinen in den Nucleoli zu ermöglichen. Hierzu wurden COS-Zellen mit dem pASH-SV40-Vektor transfiziert und die Lokalisation der SV40- β -Galactosidase durch indirekte Immunfluoreszenz bestimmt.

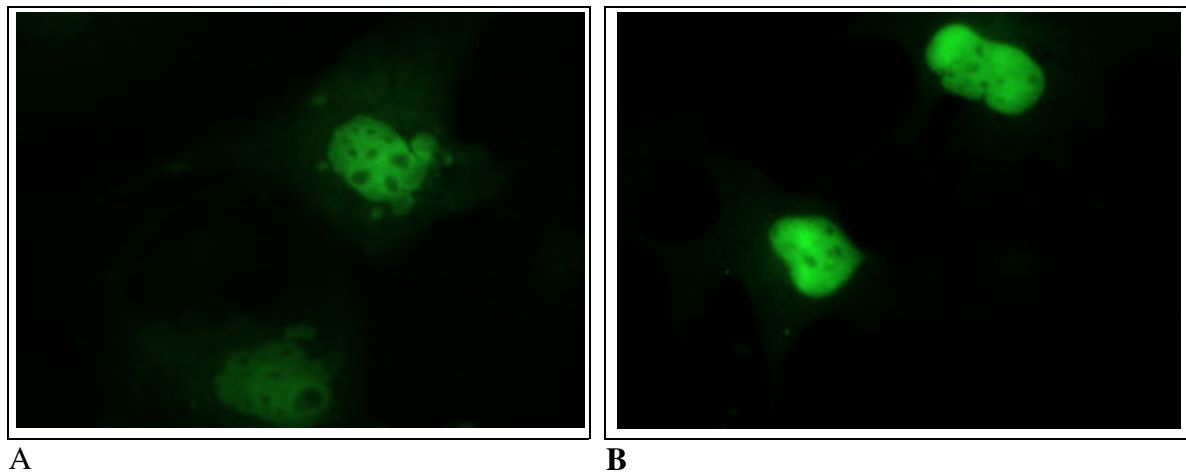


Abb. 4.6 Lokalisation von SV40- β -Galactosidase durch indirekte Immunfluoreszenz (A+B)

β -Galactosidase mit dem N-terminalen SV40-Kernlokalisierungssignal ist eindeutig im Zellkern lokalisiert und akkumuliert nicht in den Nucleoli (Abb. 4.6). Damit ist bewiesen, dass das N-terminale SV40-NLS das cytoplasmatische Reporter-Protein in den Kern dirigiert, ohne jedoch eine Akkumulation in den Nucleoli zu ermöglichen.

4.8.3 DAS KONSTRUKT PASH-S6A(1-236)

Als Kontrolle für den nuclearen und nucleolaren Import eines ribosomalen Proteins aus *Saccharomyces cerevisiae* in einem höheren eukaryontischen – heterologen – System wurde die gesamte cDNA des ribosomalen yrpS6A-Proteins in den pASH-Vektor kloniert und der Transport von β -Galactosidase als Reporter-Protein untersucht (Walter, 2000).

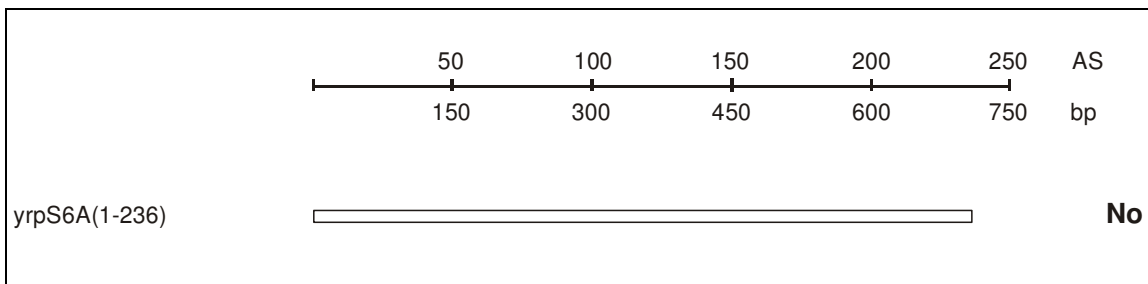


Abb. 4.7 Schematische Darstellung von yrpS6A(1-236).

Nach der Transfektion von COS-Zellen mit diesem rekombinanten Plasmid wurde das yrpS6A- β -Galactosidase-Fusionsprotein durch indirekte Immunfluoreszenz lokalisiert.

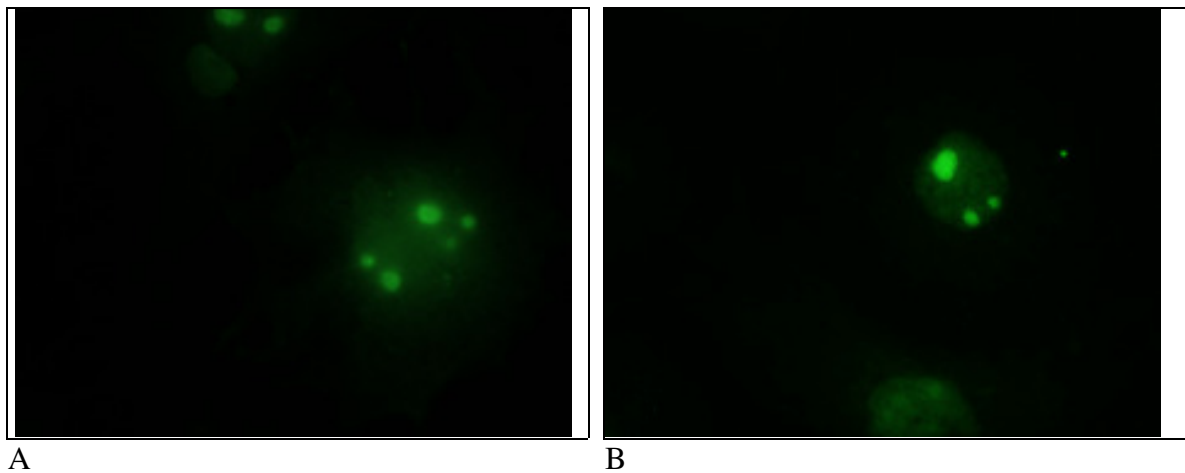


Abb. 4.8 Lokalisation des yrpS6A(1-236)- β -Galactosidase-Fusionsproteins durch indirekte Immunfluoreszenz (A+B).

Das ribosomale Protein yrpS6A akkumuliert eindeutig in den Nucleoli (Abb. 4.8). Die transiente Expression des yrpS6A- β -Galactosidase-Proteins zeigt somit eindeutig, dass yrpS6A dazu in der Lage ist, das Reporter-Protein in einem heterologen System in den Zellkern zu transportieren und die Akkumulation in den Nucleoli zu ermöglichen.

4.8.4 DIE HOCHKONSERVIERTE NUCLEOLARE BINDUNGSSEQUENZ DES HRPS6 UND DES YRPS6A IM BEREICH DER HOMOLOGIEDOMÄNE

Der Aminosäure-Vergleich homologer hrpS6- bzw. yrpS6A-Proteine weist im Bereich zwischen den Aminosäuren 53-159 eine hoch-konservierte Region auf: die Homologiedomäne. Diese findet sich in hoher Übereinstimmung auch in vielen anderen eukaryontischen Organismen. Ein Sequenzvergleich mehrerer eukaryontischer Organismen auf Aminosäurebasis findet sich im nächsten Kapitel.

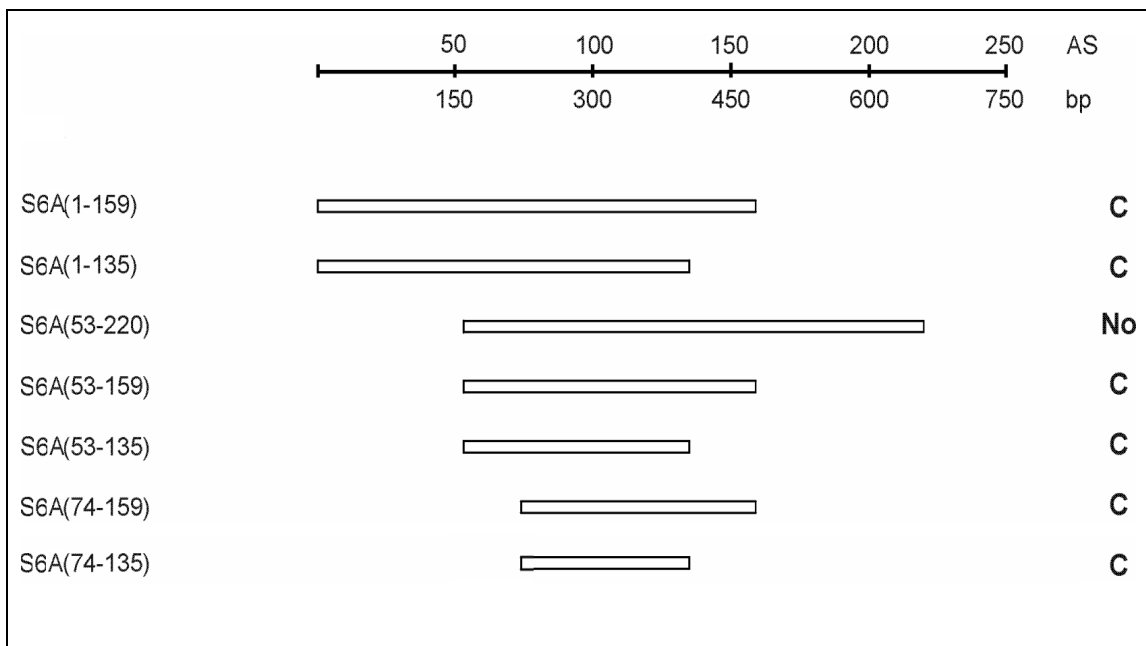


Abb. 4.9 Schematische Darstellung der bisher untersuchten Fragmente der Homologiedomäne aus yrpS6A

Zur Überprüfung, inwieweit dieser homologe Bereich an der nuclearen und/oder nucleolaren Lokalisation der ribosomalen Proteine hrpS6 und yrpS6A beteiligt ist, wurden cDNA-Fragmente, die die Homologiedomäne des ribosomalen Proteins beinhalten, mittels PCR konstruiert. Folgende Konstrukte pASH-S6(53-159), pASH-SV40-S6(53-159), pASH-S6A(74-135), pASH-SV40-S6A(74-135) wurden untersucht. Nach Klonierung in den pASH-Vektor wurden COS-Zellen mit den rekombinanten Plasmiden transfiziert und die β -Galactosidase-Fusionsproteine immunologisch detektiert. Nur das β -Galactosidase-Fusionsprotein S6A(53-220), welches sowohl NLS I als auch NLS II enthält, zeigt eine nucleoplasmatische Färbung und zusätzlich eine eindeutige nucleolare Akkumulation.

Sowohl die Fragmente yrpS6A(1-159) und yrpS6A(53-159), die die gesamte Homologiedomäne des ribosomalen Proteins yrpS6A aufweisen, als auch die Fragmente

yrpS6A(1-135), yrpS6A(53-135), yrpS6A(74-135) und yrpS6A(74-159), die lediglich den N- bzw. C-terminalen Teil der Homologiedomäne beinhalten, lokalisieren nur im Cytoplasma (Klokow und Walter, 2000).

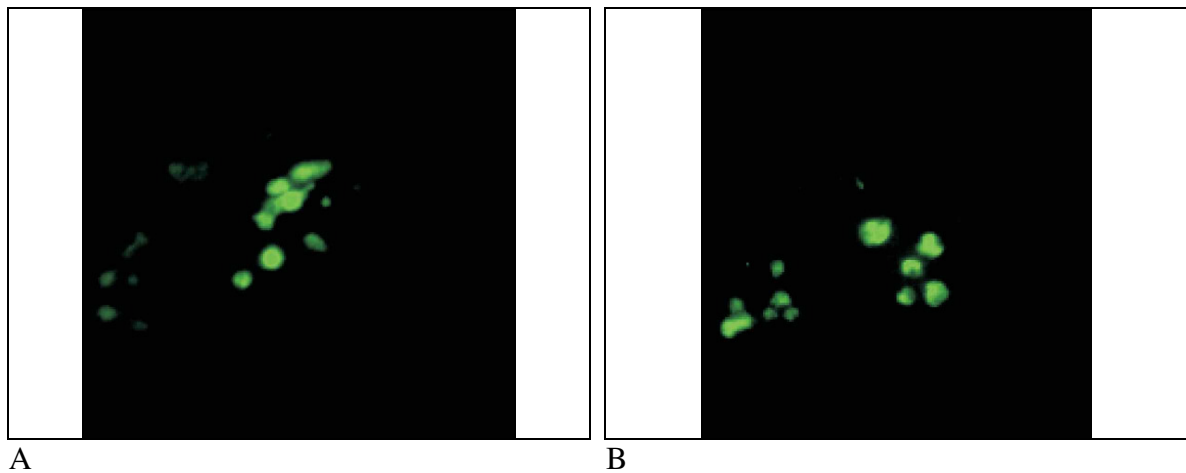


Abb. 4.10 Lokalisation des β -Galactosidase-Fusionsproteins SV40-S6A(74-135) (A, B).

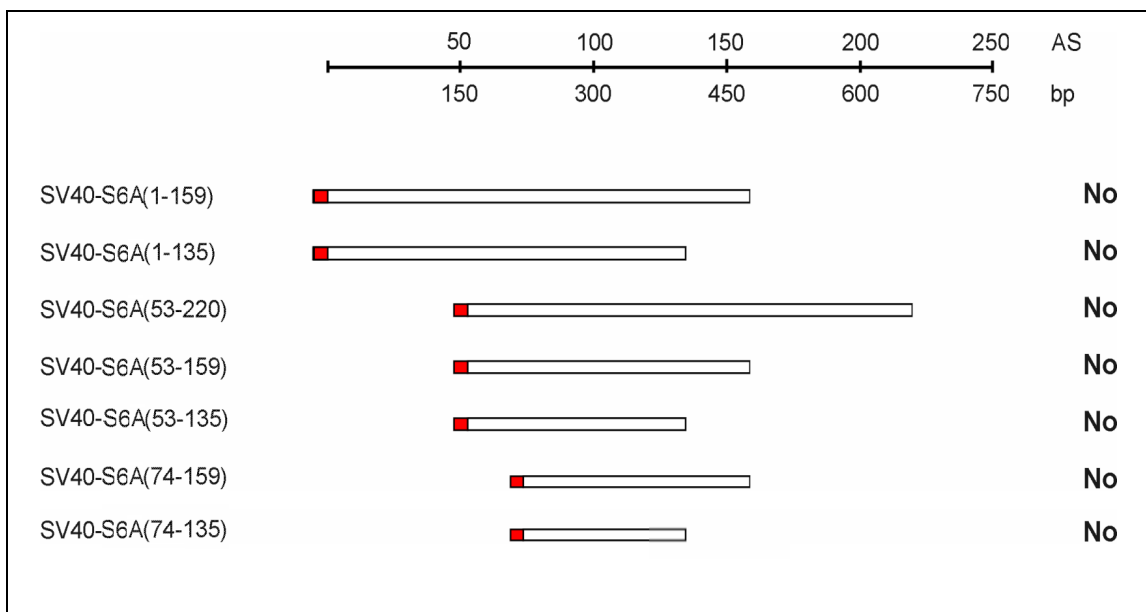


Abb. 4.11 Schematische Darstellung der Fragmente der Homologiedomäne: SV40-S6A(1-159), SV40-S6A(1-135), SV40-S6A(53-220), SV40-S6A(53-159), SV40-S6A(53-135) und SV40-S6A(74-159), SV40-S6A(74-135).

Dieses Ergebnis zeigt eindeutig, dass die Homologiedomäne kein Kernlokalisierungssignal enthält und somit nicht an der nuclearen Lokalisation des yrpS6A-Proteins involviert ist. Da die hrpS6- und yrpS6A-Fragmente der Homologiedomäne keine eigenen NLS aufweisen, wurden die Fragmente in den pASH-SV40-Vektor kloniert.

Nach der Transfektion von COS-Zellen wurden die Fusionsproteine mit dem N-terminalen SV40-NLS durch indirekte Immunfluoreszenz detektiert.

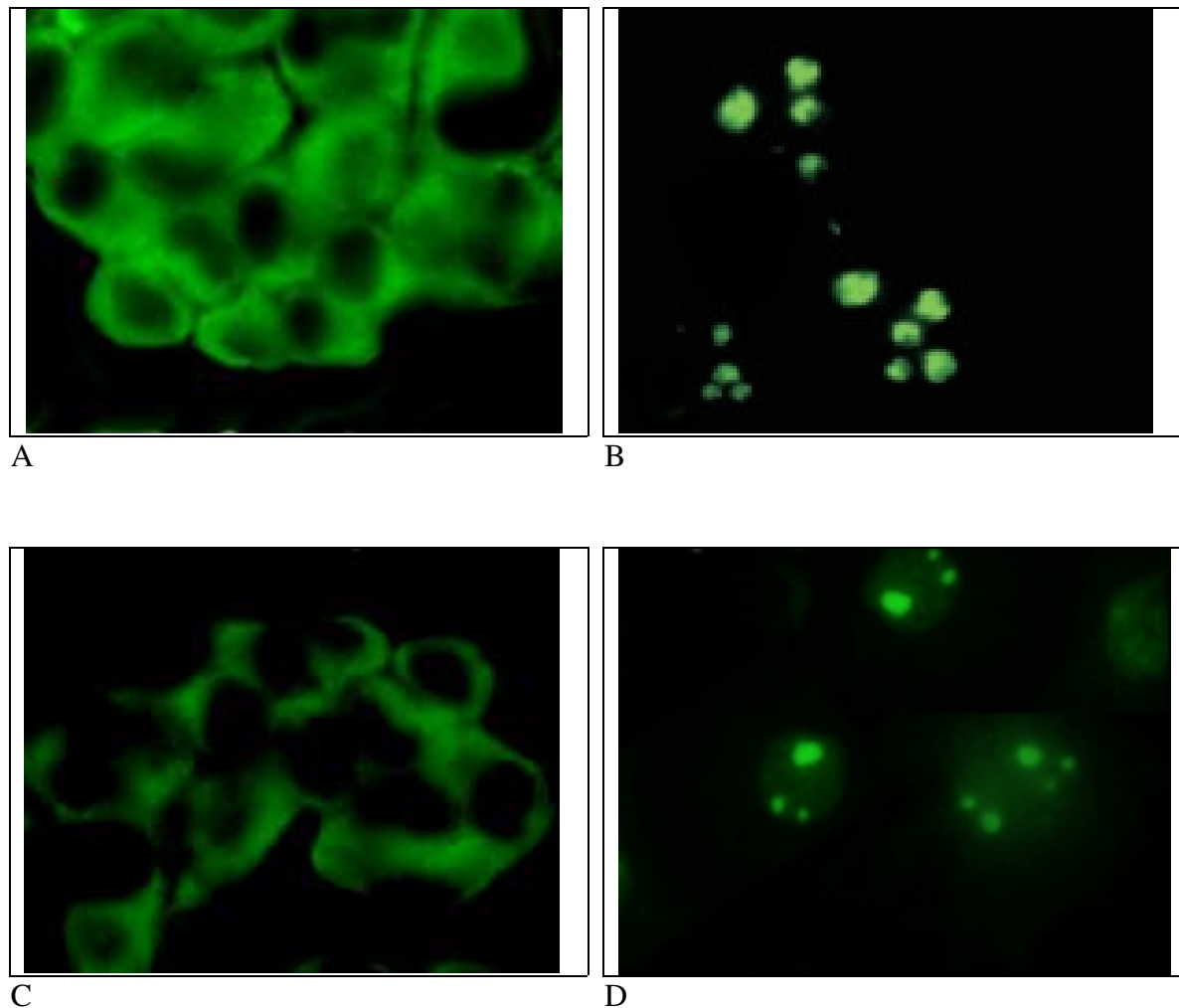


Abb. 4.12 Intrazelluläre Lokalisation der β -Galactosidase-Fusionsproteine pASH-S6A(1-159) und pASH-SV40-S6A(1-159) (A, B), pASH-S6A(53-159) und pASH-SV40-S6A(53-159) (C, D).

Das N-terminale SV40-Kernlokalisierungssignal führt nun dazu, dass die pASH-SV40-Konstrukte, die die Homologiedomäne des ribosomalen Proteins yrpS6 ganz oder nur teilweise enthalten, in den Nucleoli akkumulieren (Abb. 4.10, Abb. 4.12). Neben der intensiven Nucleolusfärbung ist eine zusätzliche schwache Hintergrundfärbung des Zellkerns zu erkennen (Abb. 4.12). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass der Bereich zwischen den Aminosäuren 74-135 für die nucleolare Akkumulation des ribosomalen yrpS6A-Proteins verantwortlich ist.

Ob dieses Ergebnis auch für die humanen Varianten dieser Konstrukte gilt, konnte anhand der nachfolgenden Konstrukte (Abb. 4.13) überprüft werden.

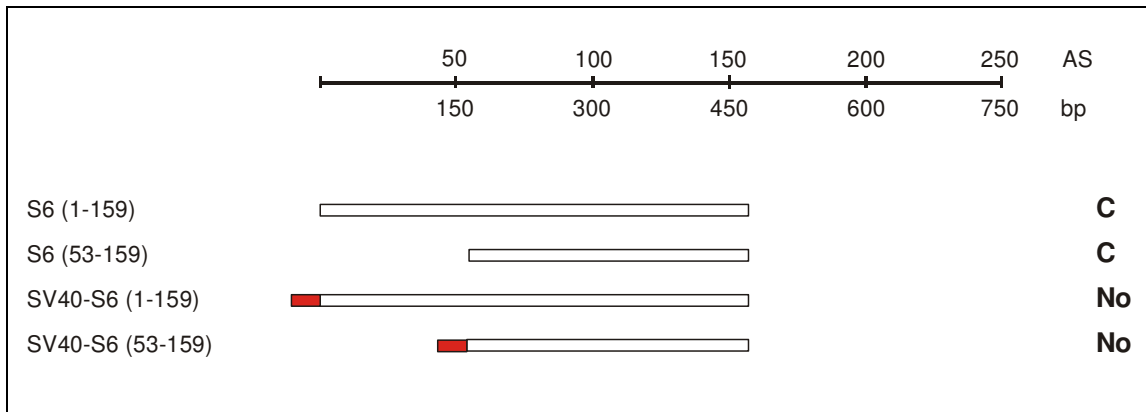


Abb. 4.13 Schematische Darstellung der Fragmente der Homologiedomäne S6(1-159), S6(53-159), pASH-SV40-S6(1-159), pASH-SV40-S6(53-159)

Die Fragmente hrpS6(1-159) und hrpS6(53-159) lokalisieren eindeutig im Cytoplasma (hier nicht gezeigt) (Klokow und Walter, 2000). Dieses zeigt, dass auch die humane Variante der Homologiedomäne kein Kernlokalisierungssignal enthält und somit nicht eine nucleare Lokalisation des hS6-Proteins herbeiführen kann (Abb. 4.13).

Da auch die humanen S6-Fragmente der Homologiedomäne keine eigenen NLS aufweisen, wurden die Fragmente wiederum in den pASH-SV40-Vektor kloniert. Die mit der SV40 Sequenz zur Kernlokalisation befähigten Konstrukte wandern wie erwartet in die Nucleoli (hier nicht gezeigt).

Als Kontrollkonstrukte wurden mittels des Excise-Kits (Stratagene) die beiden Deletionskonstrukte hrpS6(d53-159)(d170-210) und SV40-hrpS6(d53-159)(d170-210), denen NoBiS1 und NoBiS2 fehlt, hergestellt (Abb. 4.14).

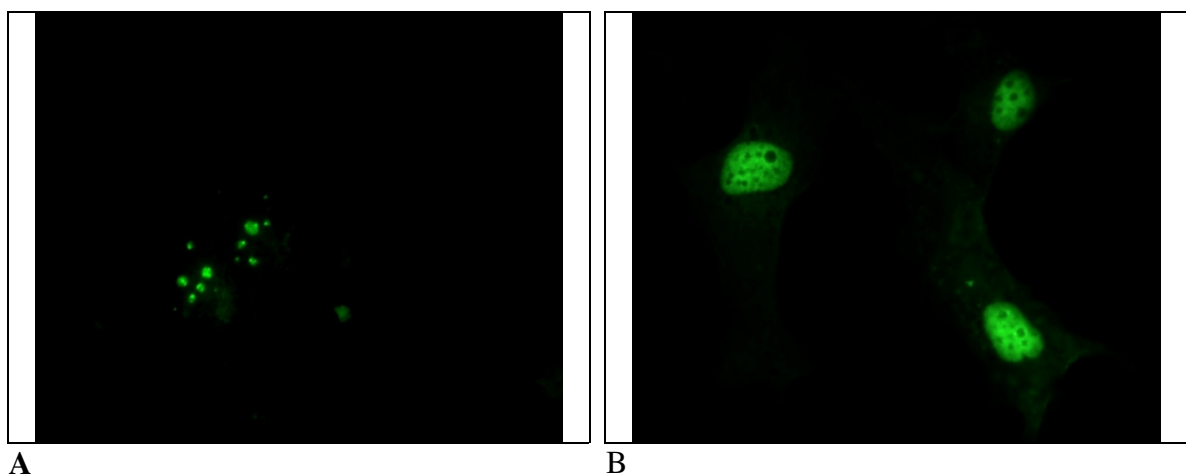


Abb. 4.14 Lokalisation der β -Galactosidase-Fusionsproteine SV40-hrpS6(d53-159)(d170-210) (A), hrpS6(d53-159)(d170-210) (B).

Die Deletion der beiden nucleolaren Bindungssequenzen führt zu einem S6-Fragment, dessen Fusionsprotein aufgrund des NLS I vom hrpS6 in den Kern importiert wird jedoch nicht im Nucleolus akkumuliert (Abb. 4.14B). Das entsprechende Konstrukt mit der SV40-NLS wandert überraschenderweise in den Nucleolus (Abb. 4.14A). Allerdings enthält dieses S6-Fragment noch mit der Sequenz `-APKIQRL-` ein wichtiges Element des humanen NoBiS2 (Kundu-Michalik *et al.*, 2007), das aufgrund der Tetramerisierung von β -Galactosidase vierfach vorliegt.

4.9 VERGLEICH DER HOMOLOGIEDOMÄNE VON VERSCHIEDENEN HEFEN

Die Homologiedomäne zeigt sich, evolutionsbiologisch betrachtet, selbst zwischen entwicklungsgeschichtlich extrem auseinanderliegenden Organismen wie der Bierhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) und dem Menschen (*Homo sapiens*) sehr stark konserviert. Bei der beispielhaften Betrachtung der in diesem AS Bereich liegenden Homologiedomäne verschiedener Hefen in der folgenden Abb. 4.15 findet sich eine hohe Übereinstimmung im aminoterminalen Bereich. Diese hohe Übereinstimmung der Sequenzen lassen die Vermutung zu, dass insbesondere im vorderen Sequenzbereich ein für die Funktion der Ribosomen wichtiger, wenn nicht gar essentieller Funktionsbereich liegt.

<i>S. cerevisiae</i>	74 KLLLTKNVSCYRPRRDGERKRKSVRGAIVGPD LAVLALVIVKKE QELEGLTDTTVPKRLGP 135
<i>D. hansenii</i>	74 KLLLAKGHSCYRPRRTGERKRKSVRGCIVAQDLAVLALS VVKQGD SDIEGLTDTTTPKRLGP 135
<i>C. glabrata</i>	74 KLLLAKGHSCYRPRRS GERKRKSVRGAIVGPD LAVLSLVIVKKE QELEGVTDATVPKRLGP 135
<i>K. marxianus</i>	74 KLLMAKGTSCYRPRRNGERKRKSVRGAIVGPD LAVLALVIVKKG QEIEGVTNETVPKRLGP 135
<i>A. gossypii</i>	74 RLLLSKDSSCYRSRRAGERKRKSVRGCIVSSDLSVLSV VIVKQGD ADIEGLTTETVPRRLGP 135
<i>K. lactis</i>	74 KLLMAKGTSCYRPRRNGERKRKSVRGAIVGPD LAVLALIITKKG QEIEGITNESVPKRLGP 135
<i>Y. lipolytica</i>	74 RLLLSKDSSCYRSRRAGERKRKSVRGCIVSSDLSVLSV VIVKQGD ADIEGLTTETVPRRLGP 135
<i>S. pombeB</i>	74 RLLLRAGHPCYRPRRDGERKRKSVRGCIVGQDLAVLALAI VVKQGE QDIPGLTDVTVPKRLGP 135
<i>S. pombeA</i>	74 RLLLRAGHPCYRPRRDGERKRKSVRGCIVGQDLAVLALAI I KQGE QDIPGLTDVTVPKRLGP 135

Consensus

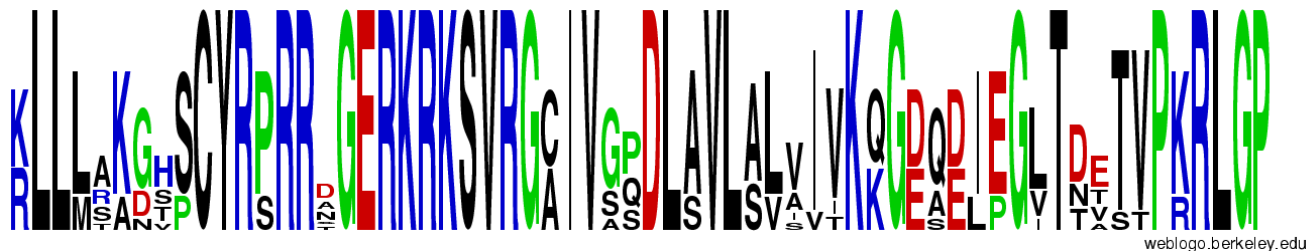


Abb. 4.15 Homologiedomäne im aminoterminalen Sequenzbereich von rpS6 verschiedener Hefen.

Für das Weblogo wurde das kleinste Fragment S6A(74-135) aus Abb. 4.11 zugrunde gelegt. Die Größe der Buchstaben gibt die Häufigkeit der AS in der Sequenz an. Kleine Buchstaben symbolisieren dabei geringes, große Buchstaben häufiges Vorhandensein in den verglichenen Sequenzen (Schneider and Stephens, 1990).

Zum Vergleich ist die zweite nucleolare Bindungssequenz der identischen Auswahl von Hefen dargestellt. (Abb. 4.16) Auch hier ergibt die Consensus-Sequenz eine hohe Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen im aminoterminalen Bereich der Domäne.

<i>S. cerevisiae</i>	172 APKIQRLVTPQRLQQRKRHQQRALKVRNAQAQREA 204
<i>D. hansenii</i>	172 PKIQRLVTPQTLQQRKALKAKQVKV-NAQQQRDA 204
<i>C. glabrata</i>	172 APKIQRLVTPQRLQQRKRYQRNLKVRNAQAQREA 204
<i>K. marxianus</i>	172 APKIQRLVTPQRLQQRKRQKALKIKNAQAQREA 204
<i>A. gossypii</i>	172 APKIQRLVTPQRLQQRKRHQQRALKVRNAQAQREA 204
<i>K. lactis</i>	172 APKIQRLVTPQRLQQRKRQKSLKIKNAQAQREA 204
<i>Y. lipolytica</i>	172 APKIQRLITPRLAHKAQLREKKVKAIQASKDA 204
<i>S. pombeB</i>	172 APKIQRLVTPRTLQHKRHRFALKRR-QAEKNR 204
<i>S. pombeA</i>	172 APKIQRLVTPRTLQHKRHRFALKRR-QAEKNR 204

Consensus



Abb. 4.16 NoBiS 2 im carboxyterminalen Sequenzbereich von rpS6 verschiedener Hefen.

Für das Weblogo wurde das Fragment S6A(172-204) zugrunde gelegt.

4.10 DAS C-TERMINALE, VARIABLE S6-PHOSPHORYLIERUNGSCLUSTER BEI VERTEBRATEN, INVERTEBRATEN UND HEFEN

Anders als bei der Homologiedomäne findet sich in dem C-terminalen Bereich des rpS6 ab der Aminosäure 170 nur wenig Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Organismen. Selbst die Anzahl an Aminosäuren im N-Terminus des rpS6 variiert stark und die Anzahl an phosphorylierbaren Serinresten ist sehr unterschiedlich (Tab. 4.2). Das S6-Protein ist das einzige basische ribosomale Protein der 40S-Untereinheit, das phosphoryliert werden kann (Gressner und Wool, 1974). Die Phosphorylierungsstellen befinden sich beim rpS6 am C-Terminus. Auf fünf Serinreste, von Vertebraten, die als Cluster vorliegen (beim hrpS6 sind es Ser235, Ser236, Ser240, Ser244 und Ser247) können Kinasen Phosphatgruppen übertragen. Die Phosphatübertragung geschieht sukzessive, wobei zuerst Ser236 phosphoryliert wird und anschließend Ser235. Dieses Cluster von phosphorylierbaren Serinresten ist, wie Tab. 4.2A zeigt, bei Vertebraten evolutionär hochkonserviert und variiert bei Invertebraten (Tab. 4.2B), während bei Hefen, mit Ausnahme von *Y. lipolytica*, nur zwei phosphorylierbare Serinreste im

C-terminalem Cluster auftreten (Tab. 4.2C). Die S6-Phosphorylierung erfolgt nach zahlreichen physiologischen, pathologischen und pharmakologischen Stimuli, z.B. nach Zugabe von Serum, Wachstumsfaktoren, Mitogenen und Hormonen (Kruppa and Clemens, 1984). Der schnelle Anstieg der S6-Phosphorylierung ist von einem Anstieg der Translationsaktivität in den Zielgeweben begleitet. Umgekehrt führt ein Serumentzug, Hitzeschock und ein hyperosmolares Medium zu einer raschen S6-Dephosphorylierung und gleichzeitigen starken Abnahme der Proteinbiosynthese, in dem der Initiationsschritt der Translation inhibiert wird und die mRNA-Menge in Polysomen stark reduziert wird (Kruppa and Martini, 1978; Kruppa and Clemens, 1984). Als Erklärung der gestiegenen Translationsaktivität wurde postuliert, dass die S6-Phosphorylierung zu einer bevorzugten Translation von mRNAs führt, die am 5'-Ende eine Oligopyrimidin-Sequenz enthalten (Jefferies *et al.*, 1994). Viele mRNAs, die wiederum an der Translation beteiligt sind, besitzen eine solche Sequenz. Eine gesteigerte Synthese der an der Translation beteiligten Faktoren ermöglicht es der Zelle schneller in die Wachstumsphase eintreten zu können.

A: Vertebraten

Spezies	Phosphorylierungsstellen	UniProtKB/ Swiss-Prot entry
<i>Homo sapiens</i>	KRRRLSSLRASTSK ESS QK	P62753
<i>Bos taurus</i>	KRRRLSSLRASTSK ESS QK	Q5E995
<i>Rattus norvegicus</i>	KRRRLSSLRASTSK ESS QK	P62755
<i>Mus musculus</i>	KRRRLSSLRASTSK ESS QK	P62754
<i>Gallus gallus</i>	KRRRLSSLRASTSK ESS QK	P47838
<i>Xenopus laevis</i>	KRRRLSSLRASTSK ESS QK	P39017
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	KRRRLSSLRASTSK ESS QK	Q9YGF2
<i>Ictalurus punctatus</i>	KRRRLSSLRAS QSK ESSQK	Q90YR8
<i>Takifugu rubripes</i>	KRRRLSSLRASTSK ESS QK	Q9YGF2

B: Invertebraten

Spezies	Phosphorylierungsstellen	UniProtKB/ Swiss-Prot entry
<i>Apis mellifera</i>	KRRRSASMRDSKSSSQSAP TTQ K	XP_001120419
<i>Drosophila melanogaster</i>	KRRRSAS IRE SKSSVSD DK K	P29327
<i>Manduca sexta</i>	KRRRSASMRDSKSSNQSAP Q K	Q94624
<i>Spodoptera frugiperda</i>	KRRRSASMRDSKSSDKSAP Q K	Q96V32
<i>Anopheles gambiae</i>	K RK PEPAA Q Q KG EASA AK KE KK Q Q PK KK	Q7RTL5
<i>Caenorhabditis elegans</i>	RRRS SASH HSESEV KK TS KK	Q9NEN6
<i>Aplysia californica</i>	R KR SNSRS KG DSIRE ST SK K	Q9BMX5

C: Hefen

Spezies	Phosphorylierungsstellen	UniProtKB/ Swiss-Prot entry
<i>Ashbya gossypii</i>	RKRRASSLKA	Q74ZK3
<i>Debaryomyces hansenii</i>	KKRRASSLKA	Q6BXH8
<i>Candida glabrata</i>	RKRRASSLKA	Q6FJH3
<i>Kluyveromyces lactis</i>	RKRRASSLKA	Q6CM04
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	RKRRASSLKA	P41798
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	RKRRASSLKA	P02365
<i>Schizosaccharomyces pombe A</i>	KARRASSLKK	P05752
<i>Schizosaccharomyces pombe B</i>	KARRASSMKK	Q9C0Z7
<i>Yarrowia lipolytica</i>	KKRRASSLRTQSVQA	Q6C169

Tab. 4.2 Phosphorylierungsstellen am C-terminus von rpS6.

Dargestellt sind die jeweiligen Phosphorylierungscluster. Basische Aminosäuren sind mit blauer und saure mit roter Farbe gekennzeichnet. Serinreste, deren Phosphorylierung in der Literatur nachgewiesen worden ist sind grün gekennzeichnet.

Die zeitliche Korrelation der S6-Phosphorylierung mit der gesteigerten Initiation der Proteinbiosynthese hat zu der Annahme geführt, dass Ribosomen mit hochphosphoryliertem rpS6 einen selektiven Vorteil besitzen, Polysomen zu bilden. Ob dieser beobachteten Korrelation zwischen S6-Phosphorylierung und Translationsaktivität ein kausaler Zusammenhang zugrunde liegt, war in der Literatur lange umstritten. Schließlich konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die S6-Phosphorylierung nicht nur an der Zellproliferation beteiligt ist, sondern zusätzlich andere Zellfunktionen reguliert.

Der erste Versuch die physiologische Rolle der S6-Phosphorylierung durch genetische Manipulation zu ergründen, wurde in Hefe unternommen (Johnson und Warner, 1987), da die Hefen ebenfalls auf verschiedene physiologische Situationen reagieren, sie besitzen jedoch nur zwei Phosphorylierungsstellen (Tab. 4.2C). Die Substitution der beiden Serinreste durch Alanin in *S. cerevisiae* hatte keine Auswirkung auf das Wachstum der Hefe unter verschiedenen Ernährungsbedingungen. Hefen unterscheidet sich von den höheren Eukaryonten nicht nur durch die Anzahl der phosphorylierbaren Serinreste, sondern auch durch die beteiligten Kinasen, da sie keine homologen Enzyme zu S6K1 und S6K2 besitzen. Konsequenterweise hat die Schlussfolgerung von der Hefemutation kaum Relevanz für die höheren Eukaryonten. Die Entwicklung von Mäusen, in denen alle fünf phosphorylierbare Serinreste im rpS6 durch Alanin ersetzt worden waren, hat gezeigt, dass die S6-Phosphorylierung die Zellgröße, die Zellproliferation und die Glucose-Homeostase beeinflusst (Abb. 1.6; Ruvinsky *et al.*, 2005). In jüngster Zeit konnte die Gruppe von Volarevic (Sulic *et al.*, 2005)

experimentell nachweisen, dass die Inaktivierung eines ribosomalen S6 Gens in T-Lymphozyten zur Aktivierung eines p53 abhängigen Checkpoints führt, der imstande ist, Veränderungen in der Genauigkeit der Translationsmaschinerie festzustellen und eine frühzeitige Zellteilung verhindern kann.

4.11 SIND DIE DREI KERNSIGNALE VOM RPS6 ESSENTIELL FÜR DIE BILDUNG FUNKTIONELLER RIBOSOMALER 40S UNTEREINHEITEN ?

Um diese Frage beantworten zu können, wurden zunächst folgende S6-Deletionsmutanten konstruiert, wobei auf im Arbeitskreis bereits vorhandene S6-GFP Fusionskonstrukte zurückgegriffen wurde:

S6 NLS Δ 1,2, enthält nur das bipartite NLS3;

S6 NLS Δ 2,3, enthält nur das ineffiziente NLS1;

S6 NLS Δ 1,2,3, enthält keines der drei authentischen S6 Kernsignale.

Als Positivkontrolle wurde nicht modifiziertes rpS6 benutzt.

Die genannten Konstrukte wurden in COS-Zellen transient exprimiert und folgende Zellextrakte wurden präpariert:

CE: Zellextrakt. Dieser Extrakt wurde durch Lyse von ganzen Zellen hergestellt, so dass er sämtliche Proteine des Cytoplasmas als auch des Zellkerns enthält.

PNS: Postnuclearer Überstand. Dieser Extrakt enthält nur Proteine des Cytoplasmas, da die Kerne durch Zentrifugation quantitativ abgetrennt wurden.

NE: Nuclearer Extrakt. Dieser Extrakt enthält nur Proteine des Zellkerns. Die Zellkerne wurden zweimal mit Detergenz gewaschen, um cytoplasmatische Membranreste, die Ribosomen enthalten könnten, zu entfernen. Vor der Präparation der Extrakte wurde die Zellzahl der verschiedenen Kulturen genau bestimmt, damit vergleichbare Proteinmengen der verschiedenen Proben auf die SDS-Gele geladen werden konnten. Die auf das Gel aufgetragenen Proben aller Deletionsmutanten stammen von äquivalenten Zellzahlen, so dass ihre Proteinmuster direkt vergleichbar sind.

Der Westernblot des C-terminalen Antikörpers ist im Teil A (Abb. 4.17) dargestellt. Die einzige detektierbare S6-Bande in allen vier Proben wandert mit dem gleichen Molekulargewicht im SDS-Gel, da es sich hierbei um das endogene rpS6 der COS-

Zellen handelt. Die endogene S6-Menge in den Deletionsmutanten (Spuren 1-3) ist etwas schwächer als die entsprechende Bande der S6-Kontrolle (Spur 4).

Im CE-Teil der Abbildung 4.17A (Spuren 5-8) treten zusätzliche schneller wandernde S6-Banden auf, die von den entsprechenden S6-Deletionsmutanten stammen. Nur in der Kontrolle (Spur 8) wandert die S6 Kontrolle auf der gleichen Höhe wie in der PNS-Fraktion. Diese schneller wandernden mutierten S6-Proteine stammen offenbar aus dem Zellkern, wie ein Vergleich mit dem NE-Extrakt (Abb. 4.17A, Spuren 9-11) zeigt. In den mutierten S6-Proteinen sind 2 bzw. 3 NLSs deletiert, d.h. sie sind um acht bzw. 12 basische Aminosäuren kürzer, deswegen wandern sie etwas schneller im SDS-Gel als die Kontrolle. Da jedoch keine dieser Mutanten im PNS nachzuweisen ist, bedeutet dies, dass die verkürzten Proteine im Nucleolus nicht in die 40S-Untereinheiten integriert wurden, obwohl sie quantitativ in den Zellkern transportiert worden sind. Die geringfügig schwächeren S6-Banden im PNS-Teil scheinen offenbar durch Inhibierung der Ribosomenbiogenese durch die S6-Deletionsmutanten zustande gekommen sein.

Die in den NE-Proben auftretenden Doppelbanden in den Spuren 9-11 der Deletionsmutanten (Abb. 4.17A) entstehen durch die gleichzeitige Präsenz von endogenem rpS6 der COS-Zellen und exogenem, transient exprimiertem, humanem rpS6 mit deletierten Kernsignalen. Die verkürzten rpS6-Moleküle sind eindeutig in höherer Konzentration im Zellkern als die S6-Kontrolle. Es ist anzunehmen, dass sich die mutierten S6-Moleküle im Nucleolus befinden, da die nucleolare Bindungssequenz in der Homologiedomäne intakt geblieben ist.

Der S6-Antikörper, der gegen ein Peptid bestehend aus den ersten elf Aminosäuren von rpS6 hergestellt wurde, wurde benutzt, um die Beladung der einzelnen Gelspuren aber auch der verschiedenen Gele zu kontrollieren (Abb. 4.17B).

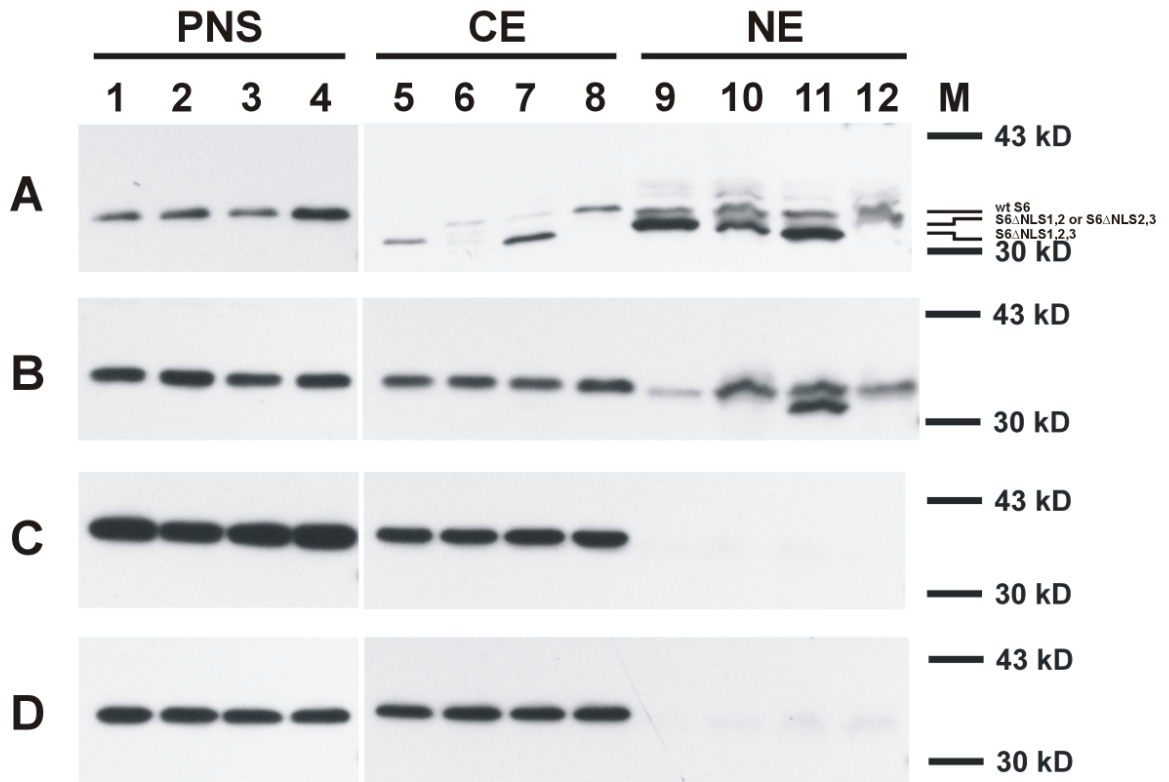


Abb. 4.17 Blockierung der Integration von S6-Deletionsmutanten in 40S-Partikel und Inhibierung der S6-Phosphorylierung im Zellkern.

S6-Deletionsmutanten, denen zwei bzw. drei Kernsignale fehlten, wurden in COS-Zellen transient exprimiert. Folgende Zellextrakte wurden präpariert: PNS – postnuclearer Überstang; CE – Gesamtzellextrakt; NE – nuclearer Extrakt. Die Verteilung der S6-Proteine wurde nach Auftrennung im SDS-Gel durch Western Blotting bestimmt. A: AK gegen den S6-C-Terminus; B: AK gegen den S6-N-Terminus; C: AK gegen die phosphorylierten Ser235/Ser236-Reste; D: AK gegen die phosphorylierten Ser240/Ser244-Reste. Spuren 1, 5, 9: S6 Δ 1,2; Spuren 2, 6, 10: S6 Δ 2,3; Spuren 3, 7, 11: S6 Δ 1,2,3; Spuren 4, 8, 12: Wildtyp S6 als Kontrolle.

Der Westernblot der PNS- und CE-Proben zeigt eindeutig, dass die Beladung aller Spuren identisch ist, da der aminoterminalen Antikörper die gleichen rpS6-Mengen erkennt (Abb. 4.17B). In den NE-Proben treten Unterschiede im Ausmaß der Erkennung des aminoterminalen Antikörpers auf. Von den mutierten rpS6 zeigt nur Spur 11, die die Dreifach-Mutation enthält, eine Doppelbande im Bereich von rpS6, die darauf hinweist, dass in dieser Probe sowohl authentische S6-Moleküle, als auch mutierte Moleküle mit vollständigem Aminoterminus vorhanden sind. In den Spuren 9 und 10 (Abb 4.17B) kann der gegen den Aminoterminus gerichtete Antikörper keine verkürzten, humanen S6-Moleküle erkennen, da diesen S6-Proteinen die drei N-terminalen Aminosäuren fehlen. Alle drei Spuren weisen eine S6-Bande auf, die auf der Höhe der S6-Kontrolle (Spur 12) im Gel wandert und vom endogenen rpS6 der COS-Zellen herrührt.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die S6-Moleküle mit den zweifach NLS-Deletionen mit Hilfe des verbliebenen Kernsignals in den Kern importiert werden, um anschließend höchst wahrscheinlich aufgrund ihrer nucleolaren Bindungsdomäne im Nucleolus zu akkumulieren. Überraschenderweise gelangt auch die Dreifach-Mutante in den Zellkern, obwohl diese mutierten S6-Moleküle kein funktionelles Kernsignal besitzen. Schmidt *et al.* haben bereits 1995 gezeigt, dass Fusionsproteine bestehend aus der S6-Dreifach-Mutante und β -Galactosidase nicht in den Zellkern aktiv importiert werden und auch aufgrund der Größe nicht passiv in den Nucleus diffundieren können. Man muss daher annehmen, dass die S6-Moleküle ohne die drei klassischen Kernsignale aufgrund ihres geringen Molekulargewichts durch passive Diffusion in das Nucleoplasma gelangen und anschließend mit Hilfe der nucleolaren Bindungsdomäne entweder an die nucleolare rRNA oder an nucleolare Proteine assoziieren. Ohne eine Interaktion mit einem Makromolekül im Kern bzw. im Nucleolus könnte S6 Δ NLS1-3 sich nicht in der Kernfraktion anreichern und somit im NE-Extrakt detektierbar sein.

4.12 DER PHOSPHORYLIERUNGSGRAD DER NUCLEAREN S6-MOLEKÜLE

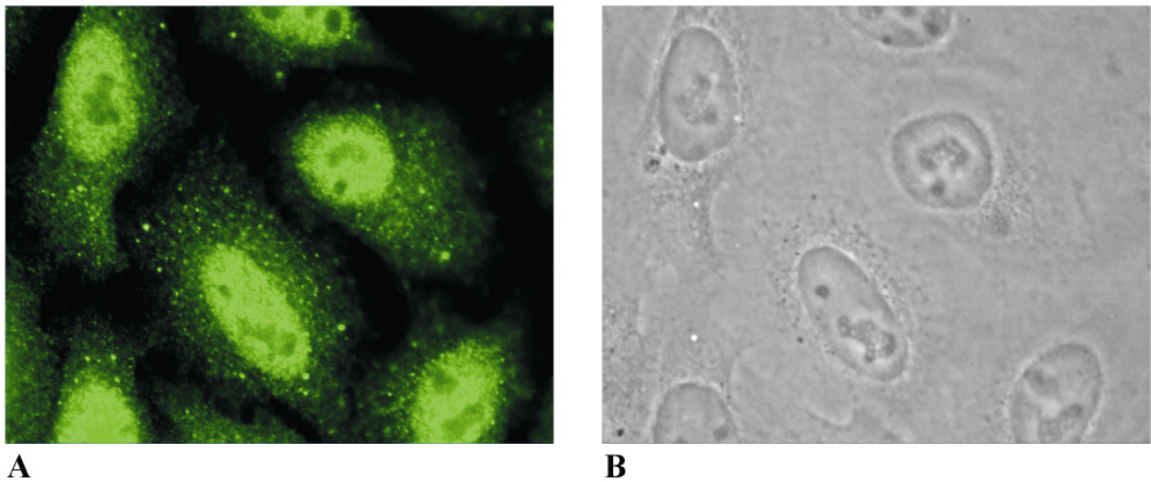


Abb. 4.18 Intrazelluläre Lokalisation der S6Kinase1 Isoenzyme.

HeLa-Zellen wurden kultiviert und die intrazelluläre Verteilung der S6K1 wurde immunzytologisch bestimmt. A: Immunzytologie, B: Phasenkontrast.

Wie in der Einleitung bereits dargestellt, besitzt das humane rpS6 ein C-terminales Serincluster von 7 Serinresten, von denen fünf sukzessive von S6-Kinasen phosphoryliert werden. Während das Enzym S6K1 mit einem Molekulargewicht von

70kDa als cytoplasmatische Kinase vorliegt, befindet sich das 85kDa schwere Kinsemolekül im Nucleoplasma (Abb. 4.19).

Die beiden S6K2-Isoenzyme befinden sich ebenfalls im Nucleoplasma (s. Einleitung). Die Kenntnis der S6-Kinase-Verteilung lässt vermuten, dass S6-Moleküle bereits im Zellkern phosphoryliert werden können. Diese theoretische Vorhersage wurde mit Hilfe phosphopetidspezifischer Antikörper gegen definierte Peptide des S6-Serinclusters experimentell analysiert (Abb. 4.17C und D). Die verwendeten gekauften Antikörper sind gegen phosphorylierte S6-Peptide in Kaninchen induziert worden und anschließend unter Verwendung entsprechender Phosphopeptid-Affinitätsäulen chromatographisch aufgereinigt worden, so dass der erste Antikörper rpS6 mit den Phosphorylierungsstellen Ser235/Ser236 bzw. der zweite Antikörper Ser240/Ser244 in hochphosphorylierten S6-Molekülen erkennt.

Der Ser235/236 spezifische Antikörper erkennt in allen Spuren der PNS-Proben sowie der CE-Proben phosphoryliertes rpS6. Da die COS-Zellen vor der Extraktion nochmals eine Stunde mit frischem Serum (FCS) stimuliert wurden, sollten die cytoplasmatischen Ribosomen hochphosphoryliert vorliegen. Diese Vermutung wird durch den Westernblot mit dem zweiten Antikörper bestätigt (Abb. 4.17D). Man erkennt, dass das S6-Signal ebenfalls in allen PNS- und CE-Proben deutlich sichtbar ist, wenn auch bedeutend schwächer als im Teil C mit dem Ser235/236 spezifischen Antikörper. Überraschenderweise zeigen sämtliche NE-Proben mit beiden phosphospezifischen Antikörpern keine Signale. Diese Ergebnisse lassen nur den Schluss zu, dass die im Zellkern vorhandenen S6-Moleküle dephosphoryliert vorliegen, dies gilt sowohl für freie, nicht in 40S-Untereinheiten integrierte S6-Moleküle auf dem Weg zum Nucleolus und für S6-Moleküle im Nucleolus als auch für fertig gestellte 40S-Untereinheiten auf dem Wege durch das Nucleoplasma zum Kernporenkomplex. Es ist erstaunlich, dass die S6-Kinasen, die im Nucleoplasma vorhanden sind, nicht in der Lage sind, die exogenen als auch die endogenen S6-Moleküle zu phosphorylieren.

Es gibt theoretisch mehrere Gründe, technische sowie physiologische, warum im Westernblot keine Signale von phosphoryliertem S6 detektiert wurden. Die nucleolare Konzentration von S6 liegt unter der Nachweisgrenze; dies ist durch die aminoterminalen und C-terminalen Antikörper widerlegt (Abb. 4.17A und B). Die S6-Kinasen können kein freies S6 phosphorylieren; dieses Argument wurde durch *in vitro* S6-Phosphorylierung beider S6-Kinasen widerlegt (Ruvinsky und Meyuh, 2006). Also sollten sowohl die nucleare S6K1 als auch beide S6K2-Isoenzyme in der

Lage sein, freie S6-Moleküle, wie sie nach dem Kernimport durch Dissoziation des Importkomplexes im Nucleoplasma entstehen, zu erkennen und den Phosphatgruppen-Transfer zu katalysieren. Auch bereits integriertes S6 in 40S-Partikeln sollte nach Verlassen des Nucleolus während der Passage zum NPC von den nuclearen S6-Kinasen als Substrat erkannt werden. Obwohl aufgrund der dargestellten Argumente eine nucleare S6-Phosphorylierung theoretisch unausweichlich erscheint, findet sie *in vivo* nicht statt. Tatsächlich wird das S6-Molekül im dephosphorylierten Zustand im Nucleolus gebunden, um mit dem rRNA-Vorläufermolekül zu assoziieren (s. Abb. 4.20). Offenbar ist der dephosphorylierte Zustand des rpS6 essentiell für die korrekte Integration in das neu entstehende 40S-Partikel. Die S6-Phosphorylierung wird anscheinend verhindert, denn fünf Phosphatgruppen mit ihren zehn negativen Ladungen scheinen die biologisch funktionelle Faltung der S6-Moleküle zu stören, so dass die Wechselwirkung mit dem rRNA-Vorläufermolekül nicht zustande kommen kann.

Eine Blockierung der S6-Phosphorylierung im Zellkern ist auch wünschenswert, um eventuelle vorzeitige Assoziationen von mRNAs an die neu entstandenen, hochphosphorylierten 40S-Partikel zu vermeiden. Man kann sich vorstellen, dass die fertig gestellte 40S-Untereinheit von Exportfaktoren bzw. Assemblyfaktoren geschützt ist, so dass die nuclearen S6-Kinasen keinen Zugang zu ihren Substraten, den C-terminalen Serinresten besitzen. Auch im freien S6 scheint das Serincluster sehr wahrscheinlich durch Assoziationsfaktoren vor den S6-Kinasen geschützt zu sein.

Der immunologische Nachweis mit Antikörpern gegen dephosphoryliertes und phosphoryliertes S6 zeigt ebenfalls, dass das S6-Protein trotz Serumstimulation im Nucleolus keine Phosphatgruppen trägt, wie im folgenden Kapitel gezeigt wird.

4.13 IMMUNOLOGISCHER NACHWEIS VON RPS6 IM NUCLEOLUS

Die S6K1 wird nach Mitogen-Stimulierung durch Phosphorylierung an mehreren Serin- und Threoninresten aktiviert, wobei die Phosphorylierung am Threoninrest 389 mit der *in vivo* Kinaseaktivität korreliert. Die S6K1 ist sowohl unter Serumentzug als auch unter Serumstimulation nur im Zellkern aktiv (Ruvinsky und Meyuhas, 2006).

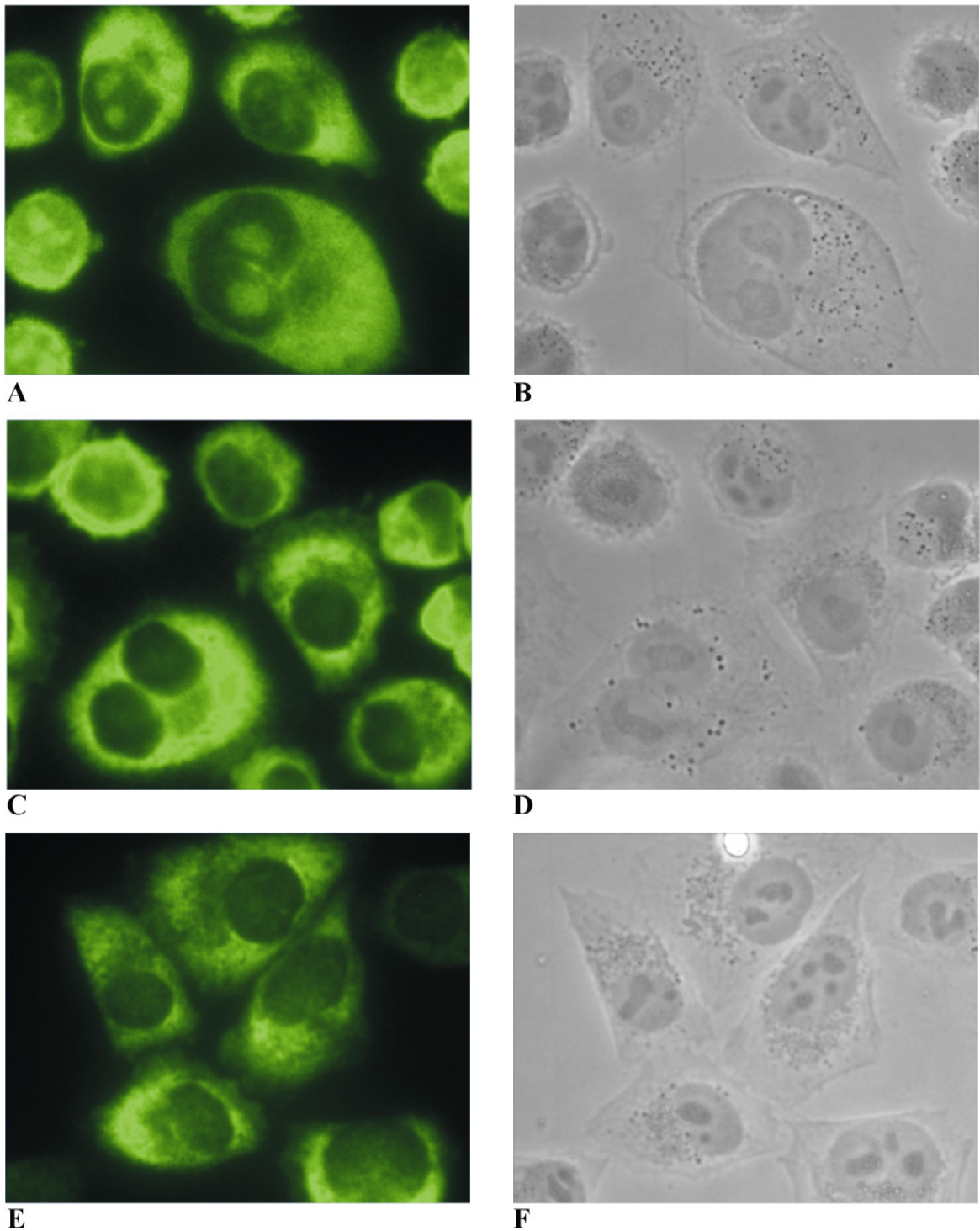


Abb. 4.19 Intrazelluläre Verteilung von phosphorylierten S6-Molekülen.

HeLa-Zellen wurden zunächst für 24h ohne FCS kultiviert und anschließend eine Stunde lang mit 20%igem FCS stimuliert. S6-Proteine wurden mit 3 verschiedenen polyclonalen Antikörpern nachgewiesen. A, B: AK gegen S6; B, D: AK spezifisch für an Ser235 und/oder Ser236 phosphoryliertes S6; E, F: AK spezifisch für an Ser240 und/oder Ser244 phosphoryliertes S6. A, C, E: Immunzytologie; B, D, E: Phasenkontrast.

Das Verhältnis von cytoplasmatischer zur nuclearen Form der S6K1 lässt sich durch Westernblot feststellen; es beträgt etwa 85:15, d.h. S6K1 befindet sich hauptsächlich

unter normalen Bedingungen im Cytoplasma. Nach Serumstimulation wird jedoch fast ausschließlich das nucleare S6K α 1 Isoenzym am Threoninrest 389 phosphoryliert (Livingstone, pers. Mitteilung). Aufgrund dieser Aktivitätsverteilung würde man vermuten, dass das rpS6 im Zellkern phosphoryliert wird. Dies konnte jedoch experimentell nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.19C und Abb. 4.19E)

Kultiviert man HeLa-Zellen für 24 Stunden ohne Serum und stimuliert die Zellen anschließend mit 20%igem FCS, erhält man die in Abb. 4.19 gezeigte intrazelluläre S6-Verteilung. Auffällig ist, dass der polyklonale S6 Antikörper als einziger das S6-Protein sowohl im Cytoplasma als auch im Nucleolus eindeutig erkennt, während das Nucleoplasma offenbar frei von S6-Proteinen erscheint. Dagegen wird durch beide phosphospezifische Antikörper ausschließlich das Cytoplasma stark angefärbt, während eine distinkte Färbung des Nucleolus und des Nucleoplasmas nicht zu erkennen ist.

Diese zytologischen Daten unterstützen die Ergebnisse der Westernblots (Abb. 4.17). Offenbar sind die S6-Moleküle im Zellkern für die beiden S6-Kinasen nicht zugänglich. Da die Zytologie mit allen S6-Antikörpern keine Färbung im Nucleoplasma zeigen, muss man annehmen, dass dort nur eine geringe Anzahl von Ribosomen vorhanden ist, die unterhalb der Nachweisgrenze der Fluoreszenzmikroskopie liegt.

4.14 SUBNUCLEOLARE LOKALISATION VON DEPHOSPHORYLIERTEN RIBOSOMALEN S6-MOLEKÜLEN

Mit Hilfe des Elektronenmikroskops sollte es möglich sein, den primären Bindungspartner des S6-Proteins im Zellkern bzw. Nucleolus nachzuweisen. Deshalb wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen unter Verwendung unseres spezifischen S6-Antikörpers DF1 angefertigt. Diese EM-Aufnahmen verdanke ich Herrn K. Koberna von der tschechischen Akademie der Wissenschaften in Prag.

Abb 4.20 zeigt Kryoschnitte von HeLa-Zellen, die mit dem DF1-Antikörper markiert wurden. Man erkennt, dass die durch Goldpartikel markierten S6-Antikörper (Pfeile) präferentiell um das fibrillare Zentrum (F) des Nucleolus in der dichten fibrillären Komponente (DFC) und in der granulären Komponente (GC) in Form von Clustern mehrerer Goldpartikel angeordnet sind. Einige wenige Stellen des Chromatins weisen meistens einzelne Goldpartikel auf. Im Nucleoplasma scheint die S6-Verteilung, wie die Goldmarkierung zeigt, sehr zufällig zu sein.

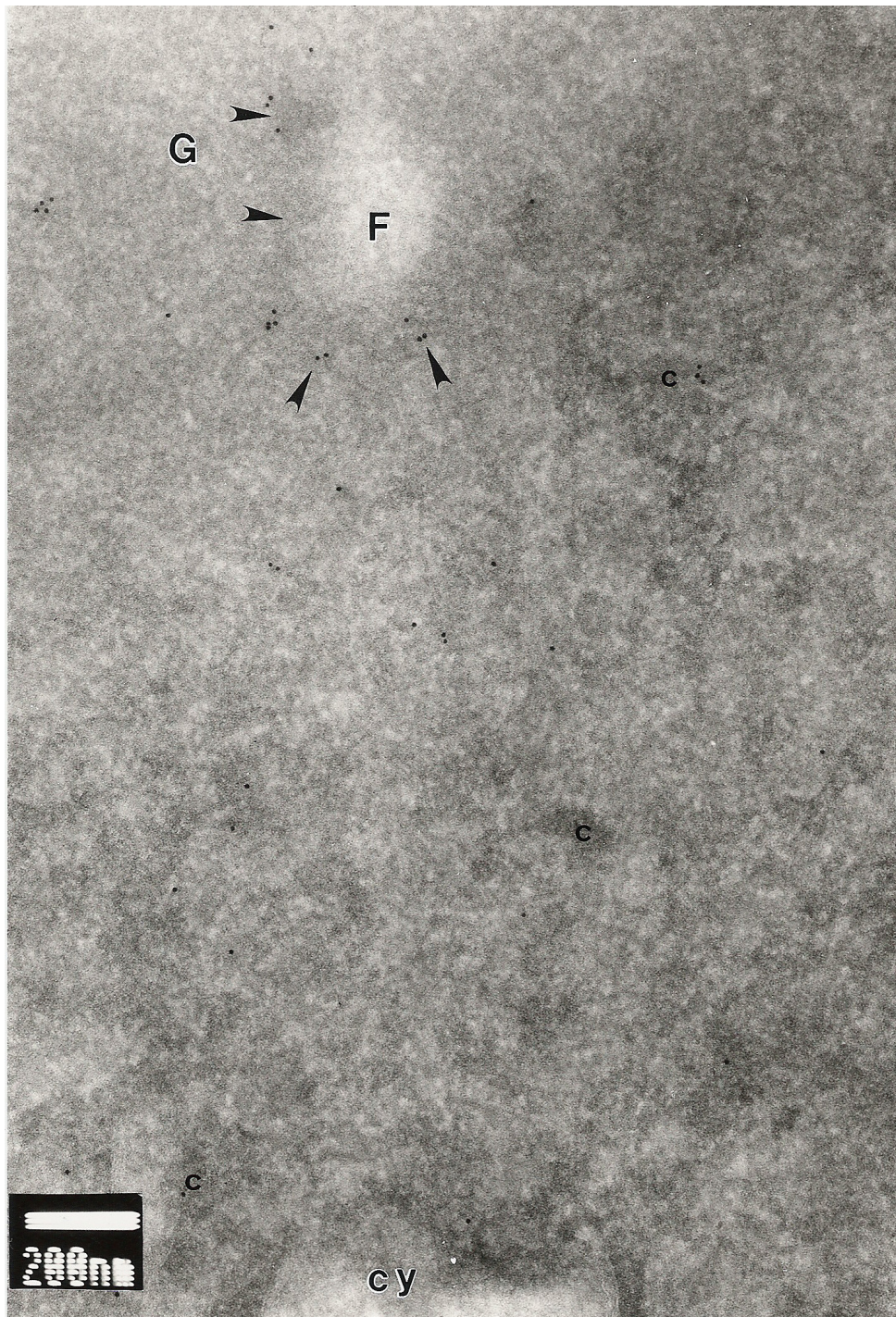


Abb. 4.20 Verteilung der S6-Proteine im Zellkern.

In Kryoschnitten von HeLa-Zellen wurde die Verteilung von S6-Proteinen durch Goldpartikel markierte S6-Antikörper analysiert. Die elektronenmikroskopische Aufnahme wurde von K.Koberna angefertigt.

In Abb. 4.21 konnte ein mit Gold markiertes S6-Cluster in einer Gruppe von Interchromatin-Granula (IG) eindeutig identifiziert werden, während an Perichromatin-Granula (Pfeile mit weißer Umrandung) keine Goldmarkierung zu finden ist. Auch in dieser Abbildung treten verstreut Goldmarkierungen am Chromatin auf.

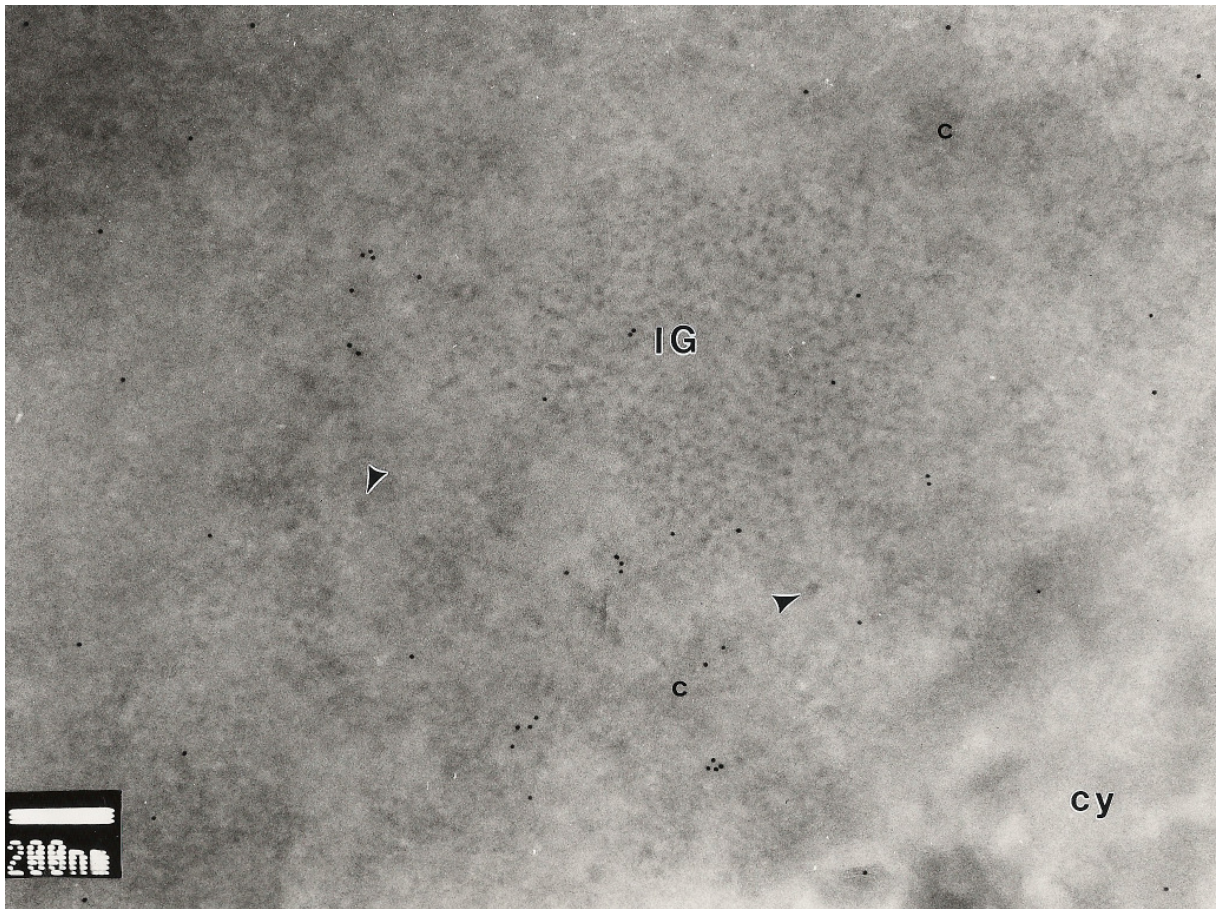


Abb. 4.21 Verteilung der S6-Proteine im Zellkern.

In Kryoschnitten von HeLa-Zellen wurde die Verteilung von S6-Proteinen durch mit Goldpartikeln markierte S6-Antikörper analysiert.

Die Menge an markiertem rpS6 im Zellkern ist in beiden elektronenmikroskopischen Aufnahmen sehr gering; sie liegt wahrscheinlich unterhalb der Nachweisgrenze der Fluoreszenzmikroskopie. Die EM-Aufnahmen zeigen auf jeden Fall, dass die Anzahl der Ribosomen weit geringer ist, als die von Cook's Gruppe (Iborra *et al.*, 2001) postulierten 10% der cytoplasmatischen Ribosomenmenge, die pro HeLa-Zelle etwa 4 Millionen beträgt.

5. DISKUSSION

5.1 STRUKTURELLE HOMOLOGIE UND EVOLUTIONÄR KONSERVIERTE AMINOSÄURESEQUENZEN IM HUMANEN RPS6 UND HEFE RPS6A

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das humane ribosomale Protein S6 und das homologe S6A-Protein aus *Saccharomyces cerevisiae* über sehr interessante funktionelle Domänen verfügen. Eine homologe Domäne im Bereich der Aminosäuren 54-154 und ein flexibles Serincluster in der C-terminalen Region, das bei den evolutionär älteren Organismen um etwa 10 Aminosäuren verkürzt ist.

Die Homologie der beiden ribosomalen Proteine hrpS6 und yrpS6A beträgt sowohl auf DNA- als auch auf Protein-Ebene etwa 62%. Obwohl die Proteinsequenzen des S6-Proteins konserviert sind, hat sich jedoch die Exon-Intronstruktur im Laufe der Evolution stark verändert, wie die Abb. 5.1 zeigt.

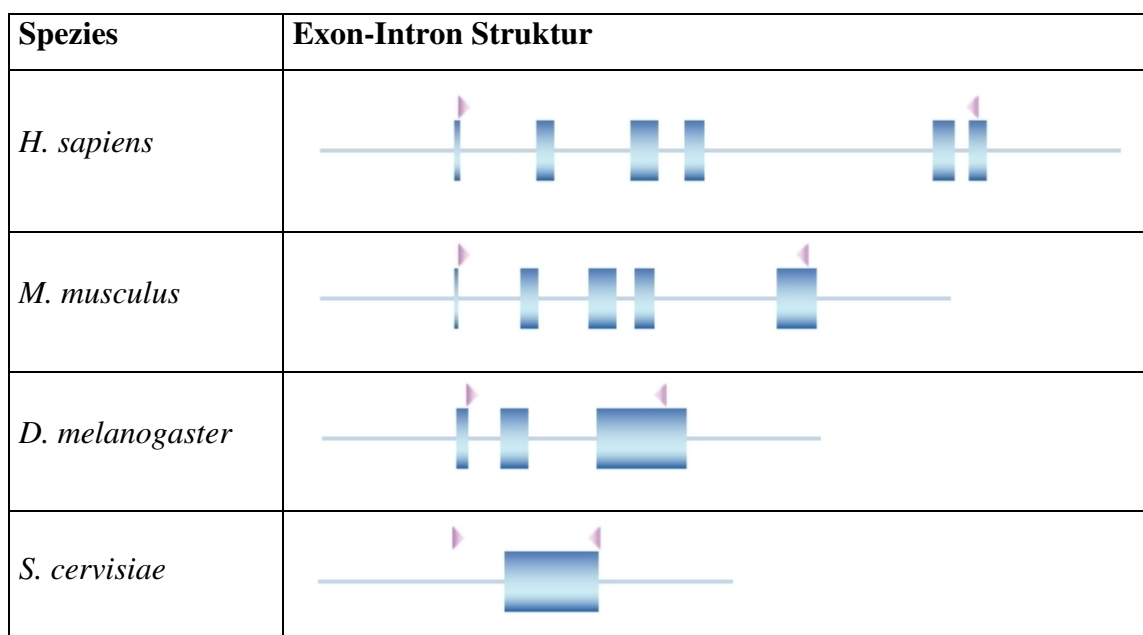


Abb. 5.1 Exon-Intron Struktur des ribosomalen S6-Gens verschiedenes Spezies.
Auswahl, der in der RPDB dargestellten Übersicht (<http://ribosome.miyazaki-med.ac.jp/>).

Unter Berücksichtigung konservativer Aminosäure-Transitionen beträgt die Homologie auf Protein-Ebene sogar 80% (Heinze *et al.*, 1988). Da aufgrund dieser Homologie ähnliche Aminosäuresequenzen für das nucleare und nucleolare Lokalisationsverhalten verantwortlich sein dürften, werden im Folgenden die Aminosäurezusammensetzung, die hydrophilen und hydrophoben Eigenschaften und die physikochemischen Eigenschaften beider Proteine im Vergleich betrachtet.

5.2 VERGLEICH DER AMINOSÄUREZUSAMMENSETZUNG VON YRPS6 UND HRPS6

Aminosäure	yrpS6A		hrpS6	
	Anzahl	Prozent [%]	Anzahl	Prozent [%]
A	18	7.6	16	6.4
C	1	0.4	3	1.2
D	12	5.1	9	3.6
E	17	7.2	17	6.8
F	9	3.8	4	1.6
G	17	7.2	15	6.0
H	2	0.8	3	1.2
I	12	5.1	10	4.2
K	28	11.9	34	13.7
L	20	8.5	22	8.8
M	2	0.8	4	1.6
N	7	3.0	7	2.8
P	9	3.8	10	4.0
Q	12	5.1	11	4.4
R	28	11.9	33	13.3
S	9	3.8	15	6.0
T	10	4.2	13	5.2
V	18	7.6	17	6.8
W	0	0.0	1	0.4
Y	5	2.1	5	2.0
KR	56	23.7	67	26.9
ED	29	12.3	26	10.4
KRED	85	36.0	93	37.3
KR-ED	27	11.4	41	16.5
LVIFM	61	25.8	57	22.9

Tab. 5.1 Aminosäurezusammensetzung der ribosomalen Proteine S6 und S6A.

Zeichenerklärung: KR: Aminosäuren mit positiver Ladung; ED: Aminosäuren mit negativer Ladung; KRED: Gesamtladung; KR-ED: Nettoladung; LVIFM: hydrophobe Aminosäuren

Die Analyse der Aminosäurezusammensetzung der beiden homologen ribosomalen Proteine S6 und S6A erfolgte mit dem Programm SAPS (Statistical Analysis of Protein Sequences) (Brendel *et al.*, 1992).

Sowohl das humane ribosomale Protein S6 (hrpS6) als auch das ribosomale Protein S6A aus *Saccharomyces cerevisiae* (yrpS6A) weisen mit 23.7% bzw. 26.9% einen hohen Anteil an basischen Aminosäuren auf. Darüber hinaus tragen bei beiden ribosomalen Proteinen mehr als 35% der Aminosäuren zur Protein-Gesamtladung bei. Der etwas höhere Anteil an negativ geladenen Aminosäuren im S6A-Protein bedingt jedoch auch eine etwas geringere Protein-Nettoladung. Auffallend ist der relativ hohe Anteil an hydrophoben Aminosäuren im S6A-Protein, der durch insgesamt neun aromatische Phenylalaninreste zustande kommt (vgl. Tab. 5.1).

5.3 HYDROPATHISCHES PROFIL VON HRPS6 UND YRPS6A

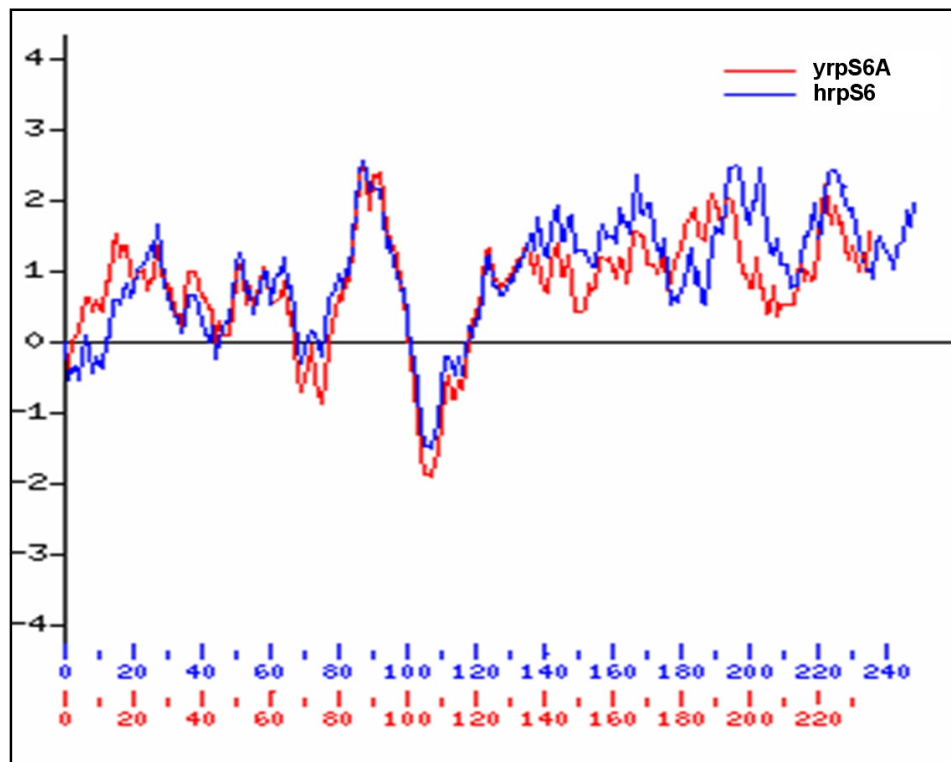


Abb. 5.2 Hydrophathisches Profil des ribosomalen S6- und S6A-Proteins nach Kyte-Doolittle.

Das hydrophathische Profil des humanen ribosomalen Proteins S6 und des ribosomalen Proteins S6A aus *Saccharomyces cerevisiae* nach Kyte-Doolittle (1982) in Abbildung 5.2 zeigt die hydrophilen (positive Werte) und hydrophoben (negative Werte) Bereiche beider Proteine im Vergleich.

Die beiden Proteine weisen aufgrund ihrer Homologie ähnliche hydrophile und hydrophobe Bereiche in ihrer Aminosäuresequenz auf. Der N-Terminus zwischen den Aminosäuren 1-65 ist in beiden Fällen hydrophil. Danach folgt ein kurzer Bereich zwischen den Aminosäuren 65-80, der schwache hydrophobe Eigenschaften aufweist. Zwischen den Aminosäuren 80-100 und 100-115 folgen zwei Domänen mit stark hydrophilen und hydrophoben Eigenschaften. Die zweite Hälfte der Proteinsequenzen bis zum C-Terminus ist in beiden Fällen sehr hydrophil.

Das hydropathische Profil zeigt jedoch, dass das yrpS6A-Protein bis auf wenige Ausnahmen (Aminosäure 1-50 und 175-195) insgesamt eine größere Hydrophobizität aufweist als das hrpS6-Protein.

5.4 PHYSIKOCHEMISCHE EIGENSCHAFTEN VON HRPS6 UND YRPS6A

Die physikochemischen Eigenschaften der ribosomalen Proteine S6 und S6A wurden mit dem Programm GeneDoc ermittelt und sind in Abbildung 5.3 dargestellt.

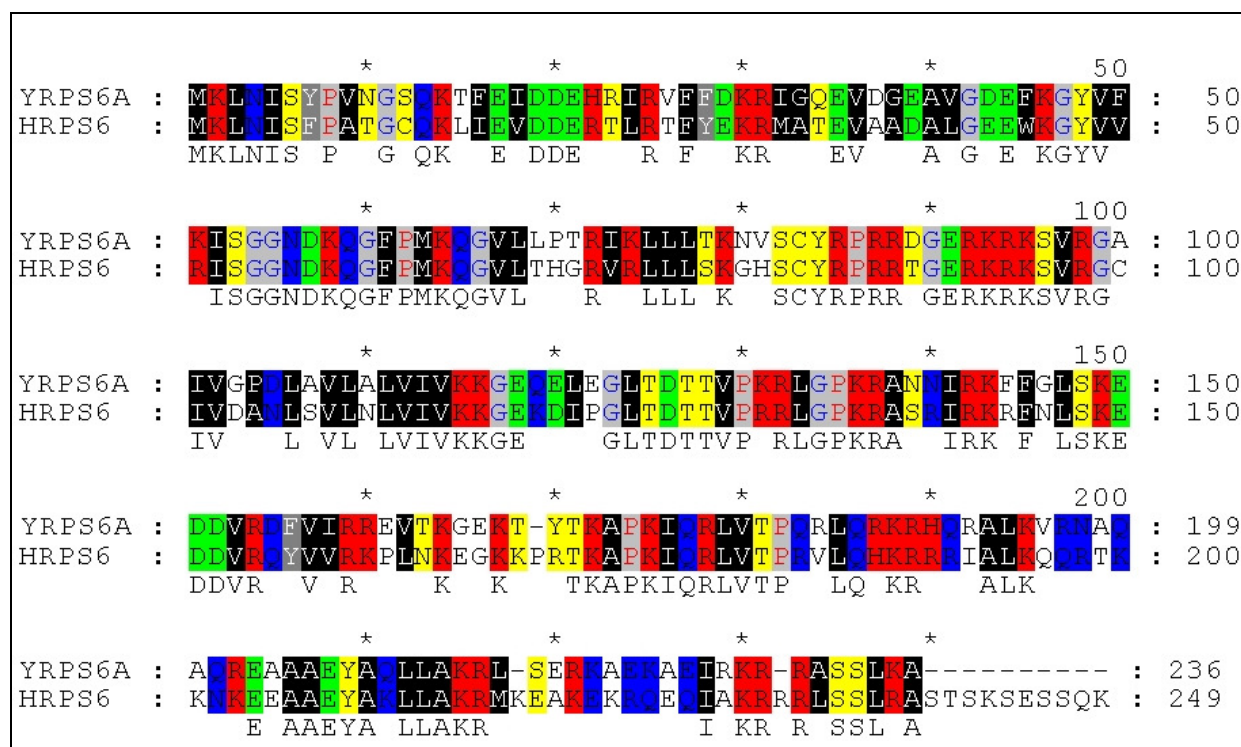


Abb. 5.3 Physikochemischer Aminosäure-Vergleich der ribosomalen Proteine S6 und S6A.

Ein Strich (-) repräsentiert innerhalb der S6A-Aminosäuresequenz fehlende Aminosäuren (vgl. Heinze *et al.*, 1988).

Zur Verdeutlichung der polaren und hydrophoben Eigenschaften wurde die von Taylor (1986) vorgenommene Klassifizierung der Aminosäuren leicht modifiziert. Der

zugehörige Farbcode ist in Tabelle 5.2 dokumentiert. Die Aminosäuren in der dritten Reihe eines jeden Blocks repräsentieren die Konsensus-Sequenzen.

	ACDEFGHIKLMNPQRSTVWY	Hintergrund	Text
Positiv	H K R	Rot	schwarz
Negativ	DE	Grün	schwarz
Amphoter	DE H N QR	Blau	schwarz
Polar	CDE H K N QRST Y	Gelb	schwarz
hydrophob	A FG I LM P VW	Schwarz	Weiß
aromatisch	F H WY	Dunkelgrau	Weiß
Prolin	P	Hellgrau	Rot
Glycin	G	Hellgrau	Blau

Tab. 5.2 Aminosäure-Klassifizierung

5.5 QUANTIFIZIERUNG VON S6-FUSIONSKONSTRUKTEN IN SUBKOMPARTIMENTEN DES ZELLKERNS

Nach der transienten Expression von hrpS6- bzw. yrpS6A- β -Galactosidase-Fusionsproteinen in COS-Zellen konnten insgesamt vier verschiedene Lokalisationszustände durch Immunfluoreszenz im Zellkern unterschieden werden:

- (1) Lokalisation im Zellkern
- (2) Lokalisation im Zellkern mit deutlichem Ausschluß der Nucleoli
- (3) Lokalisation im Zellkern mit deutlicher Anreicherung in den Nucleoli
- (4) Akkumulation in den Nucleoli

In den durchgeführten Experimenten traten diese vier Lokalisationszustände jedoch nicht ausschließlich sondern in Kombination auf. Dabei konnten die Kombinationen (1/2), (1/3) und (1/2/3) beobachtet werden.

Durch die Arretierung der Zellen vor der Transfektion in der G₀-Phase konnte die Abhängigkeit der kombinierten Lokalisationszustände vom Zellzyklus ausgeschlossen werden. Darüber hinaus war die Lokalisation der Fusionsproteine nicht von der Expressionszeit abhängig, da selbst nach Überprüfung der Expressionskinetik die erwähnten kombinierten Lokalisationszustände auftraten.

Eine genaue Quantifizierung der Verteilung der S6-Fusionsproteine im Nucleoplasma und/oder im Nucleolus war ohne weiteres nicht möglich. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse sind eine Zusammenfassung einer Vielzahl von durchgeführten Experimenten und stellen die präferentielle Lokalisation des entsprechenden S6-Fusionskonstruktes dar (Tab. 6.5).

5.6 DIE NUCLEOLARE BINDUNGSSEQUENZ (NOBIS) IN DER HOMOLOGIEDOMÄNE DER RIBOSOMALEN PROTEINE HRPS6 UND YRPS6A

Ribosomale Proteine werden nach ihrer Synthese im Cytoplasma mit Hilfe von Transportfaktoren in den Zellkern transportiert. Dort akkumulieren die Proteine im Nucleolus und assoziieren mit rRNA und anderen ribosomalen Proteinen zu den Vorstufen ribosomaler Untereinheiten. Das humane ribosomale Protein S6 gehört zu den ersten Proteinen, das sich während der Ribosomenbiogenese bereits an die 45S-Prä-rRNA anlagert (Todorov *et al.*, 1983; Tschochner and Hurt, 2003; Ferreira-Cerca *et al.*, 2005).

Da die Nucleoli im Gegensatz zum Zellkern von keiner Membran umgeben sind, kann davon ausgegangen werden, dass die Nucleolus-Akkumulation eher durch funktionelle Domänen als durch lineare Aminosäuresequenzen hervorgerufen wird. Befindet sich das Protein erst einmal im Zellkern, so kann es über seine funktionellen Domänen mit Molekülen der Nucleoli wie RNA und anderen nucleolaren Proteinen interagieren und dadurch in den Nucleoli akkumulieren. Die Nucleolus-Akkumulation wird durch RNA-Protein- und/oder Protein-Protein-Wechselwirkungen hervorgerufen. Das basische SV40-Kernsignal könnte somit die nucleolare Affinität der S6A-Fragmente durch zusätzliche elektrostatische Wechselwirkungen mit acider Nucleolus-assoziiierter RNA erhöhen.

Das hrpS6-homologe ribosomale Protein yrpS6A aus *Saccharomyces cerevisiae* lokalisiert aufgrund seiner C-terminalen Kernlokalisierungssignale im Zellkern. Die von Leicher (1994) identifizierte nucleolusbindende Domäne zwischen den Aminosäuren 174-214 befähigt das yrpS6A-Protein dazu, in den Nucleoli zu akkumulieren. Innerhalb dieser Domäne befindet sich das NLS II der Hefe.

Die S6-Homologiedomäne zwischen den Aminosäuren 53-159 stellt eine in vielen eukaryontischen ribosomalen Proteinen auftretende, hoch konservierte Aminosäure-

sequenz dar. Das Ausgangsfragment der Homologiedomäne S6A(1-159) wurde C-terminal verkürzt, so dass das Fragment S6A(1-135) erhalten wurde. Beide Fragmente weisen zwischen den Aminosäuren 100-115 einen stark hydrophoben Bereich auf (vgl. Abb. 5.2). Da die Fragmente der Homologiedomäne keine eigenen Kernsignale besitzen, wurden sie N-terminal mit dem NLS des großen SV40 T-Antigens fusioniert. Bei beiden Fragmenten konnte eine sehr intensive Nucleolus-Akkumulation beobachtet werden (Abb. 4.10, Abb. 4.12). Im Zellkern waren die S6-Fusionsproteine nur schwach detektierbar.

Zur weiteren Eingrenzung der NoBiS wurde der N-Terminus deletiert. Dazu wurde das Fragment S6A(53-159) konstruiert, das lediglich die Homologiedomäne besitzt. Dieses Fragment weist zwischen den Aminosäuren 65-80 einen schwach und zwischen den Aminosäuren 100-115 einen stark hydrophoben Bereich auf (vgl. Abb. 5.2) und bindet im Nucleolus. Bei der folgenden Fragmentierung der Homologiedomäne wurde darauf geachtet, dass die resultierenden Fragmente N- und C-terminal flankierende hydrophile Bereiche aufweisen, da hydrophile Bereiche in der Regel an Wechselwirkungen mit nucleolaren Komponenten beteiligt sind. Dazu wurde das Fragment S6A(53-159) sowohl C- als auch N-terminal verkürzt, so dass die Fragmente S6A(53-135) und S6A(74-159) entstanden sind. Auch diese Fragmente lokalisierten eindeutig in den Nucleoli und wiesen lediglich eine geringfügige Färbung im Zellkern auf (Abb. 4.11). Diese Ergebnisse weisen eindeutig darauf hin, dass neben dem von Leicher (1994) identifizierten NoBiS noch eine weitere nucleolare Bindungssequenz zwischen den Aminosäuren 74-135 im ribosomalen Protein S6A existiert. Eine zweite NoBiS konnte während meiner experimentellen Untersuchungen im S6A-homologen humanen ribosomalen Protein S6 zunächst nicht identifiziert werden (Kundu-Michalik, 1997). Erst nach Abschluss meiner experimentellen Tätigkeit wurde die zweite NoBiS im zentralen Sequenzbereich vom humanen rpS6 gefunden (Kundu-Michalik *et al.*, 2007). Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse in bezug auf das Vorhandensein einer weiteren nucleolusbindenden Domäne im yrpS6A müssen noch genauer verifiziert werden. Das N-terminale SV40-NLS wurde eingesetzt, um das cytoplasmatische Reporter-Protein β -Galactosidase in den Zellkern zu dirigieren ohne eine nucleolare Akkumulation zu bewirken, jedoch konnte bei keinem der untersuchten S6A-Fragmente eine Lokalisation im Zellkern beobachtet werden. In bezug auf den Umstand, dass keines der S6A-Fragmente mit SV40-NLS als Negativkontrolle fungierte, steht somit der Beweis aus, dass das SV40-NLS nicht dazu in der Lage ist, S6A-Fragmente *per se* in

die Nucleoli zu dirigieren. Zukünftige Projekte könnten die Ermittlung der NoBiS-Minimalsequenz durch N- und C-terminale Verkürzung des Fragments S6A(74-135) zum Thema haben. Dabei sollte das Lokalisationsverhalten der Fusionskonstrukte mit SV40-NLS und zusätzlich mit einem nativen S6A-NLS untersucht werden.

Der Bereich zwischen den Aminosäuren 74-135 weist in seinem N-Terminus (74-80) und C-Terminus (100-115) zwei recht hydrophobe Bereiche auf, die wahrscheinlich nicht an der nucleolaren Akkumulation beteiligt sind. Darüber hinaus befinden sich in diesem Fragment zwei Bereiche (80-100 und 115-135) mit stark hydrophilen Eigenschaften (vgl. Abb. 5.2). Der N-terminale hydrophile Bereich weist eine relativ hohe Anzahl basischer Aminosäuren auf (vgl. Abb. 5.3), der sowohl dem NOS von p120 (Valdez *et al.*, 1994) als auch dem NoBiS vom ribosomalen Protein L31 aus der Ratte ähnelt (Quaye *et al.*, 1996).

Protein	Peptidsequenz
p120 NOS	40 SKRLSSRA KKRAAK RR LG 57
L31 NoBiS	87 RLSRKR 91
S6A NoBiS	85 RPRRDGE RRKRSV RGA 100

Tab. 5.3 Peptidsequenzen p120 NOS, L31 NoBiS, S6A NoBiS

Das 1996 von Quaye *et al.* definierte nucleolare Lokalisationssignal im ribosomalen Protein L31 der Ratte beinhaltet die Aminosäuresequenz RLSRKR. Dabei wurde aufgrund von Substitutionsversuchen innerhalb dieser kurzen Sequenz die NoBiS-Minimalsequenz RXXR ermittelt. Innerhalb des variablen Bereichs X ist in der Regel eine der beiden Aminosäuren basisch (Arginin oder Leucin) oder hydrophob. Da dieses Sequenzmotiv in eukaryontischen ribosomalen Proteine recht häufig vorkommt, postulierten Quaye *et al.*, dass diese Sequenz in ribosomalen Proteinen allgemein als NoBiS fungiert. Spätere Publikationen haben jedoch gezeigt, dass diese Annahme zu naiv war.

5.7 KERNLOKALISATIONSSIGNALE IM RIBOSOMALEN S6A-PROTEIN DER HEFE

Im Zuge der Identifizierung der zweiten nucleolaren Bindungssequenz wurde das Fragment S6A(1-173) untersucht. Dieses Fragment lokalisierte mit geringer Effektivität im Zellkern und wies darüber hinaus eine nicht unerhebliche cytoplasmatische

Lokalisation auf. Durch die genauere Charakterisierung der Lokalisation mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie konnte jedoch ausgeschlossen werden, dass es sich bei der schwachen Zellkernfärbung um ein überlagertes cytoplasmatisches Signal handelte. Aufgrund dieses Befundes konnte davon ausgegangen werden, dass sich zwischen den Aminosäuren 159-173 ein drittes NLS befindet.

Das S6A-homologe NLS I des humanen ribosomalen Proteins S6 wurde von Schmidt *et al.* (1995) als schwaches Kernsignal beschrieben. Die NLS I-Sequenz besteht aus einem Cluster von vier Aminosäuren (KKPR). Im Gegensatz dazu weist das

Protein		NLS
L3		1 SHRKYEAPRHGHLGFLPRKRA 21
L25	NLS I	11 KKAVVKG 17
	NLS II	18 TNG KKALKVRT 28
L28	NLS I	6 KTRKHRG 12
	NLS II	23 KHRKHPG 29
S17a		2 GRVRTK 7
S22		20 GKRQVLIRP 28
S25	NLS I	11 AKAAAALAGGKKS KKKTS KKSMKDRA 36
	NLS II	87 GIIPISKH 95
S6A	NLS I	159 RREVT KGEKTYTKAP 173

Tab. 5.4 Nucleare Lokalisations Sequenzen verschiedener Proteine

ribosomale Protein S6A in diesem Bereich neben polaren Aminosäuren lediglich einen basischen Lysin-Rest auf (vgl. Abb. 5.3). Da jedoch ribosomale Proteine aus *Saccharomyces cerevisiae* in der Regel überaus komplexe Kernsignale mit einer hohen Anzahl an basischen und hydrophoben Aminosäuren aufweisen, könnte es sich bei diesem Signal um ein Hefe-spezifisches NLS handeln (Moreland *et al.*, 1985; Schaap *et al.*, 1991; Underwood und Fried, 1990; Gritz *et al.*, 1985; Timmers *et al.*, 1999).

Sollte es sich hierbei tatsächlich um das NLS I des ribosomalen Proteins S6A handeln, so stellt sich zwangsläufig die Frage, warum das gleiche Fragment mit N-terminaler SV40-NLS in der Lage ist, in den Nucleoli zu akkumulieren. Diese scheinbare Divergenz kann jedoch durch die Beobachtung von Russo *et al.* (1997) erklärt werden. Russo *et al.* konnten zeigen, dass die nucleolusbindende Domäne des humanen ribosomalen Proteins L7a zusätzlich zum NLS II das SV40-Kernlokalisierungssignal für

die nucleolare Akkumulation benötigt. Die Nucleolus-Akkumulation konnte selbst dann noch beobachtet werden, wenn die nucleolusbindende Domäne des L7a-Proteins ein mutiertes, nicht-funktionelles SV40-NLS oder lediglich einen Rest von 17 positiv geladenen Aminosäuren aufwies. Durch Entfernung der positiv geladenen Sequenzen konnte die nucleolare Akkumulation unterdrückt werden (Russo *et al.* 1997).

Die nucleolare Akkumulation der nucleolusbindenden Domäne des Fragments S6A(1-173) und der S6A-Fragmente der Homologiedomäne wird demnach erst in Verbindung mit dem basischen SV40-NLS ermöglicht.

Zur Eingrenzung des noch nicht exakt charakterisierten NLS II wurden die Fragmente S6A(174-204), S6A(174-200), S6A(174-195) und S6A(174-190) auf ihr nucleares Lokalisationsverhalten hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass alle Fragmente bis auf das Fragment S6A(174-190) im Zellkern lokalisierten. Aufgrund dieser Ergebnisse kann der C-Terminus des zweiten Kernsignals auf einen Bereich zwischen den Aminosäuren 190-195 eingegrenzt werden.

5.8 BISHER IDENTIFIZIERTE KERNSIGNALE UND NUCLEOLARE BINDUNGSSEQUENZEN IM HRPS6 UND YRPS6A

Im folgenden werden die bisher identifizierten Kernlokalisierungssignale und nucleolusbindenden Domänen der beiden homologen ribosomalen Proteine S6 aus *Homo sapiens* und S6A aus *Saccharomyces cerevisiae* in Abbildung 5.4 und 5.5 graphisch dargestellt.

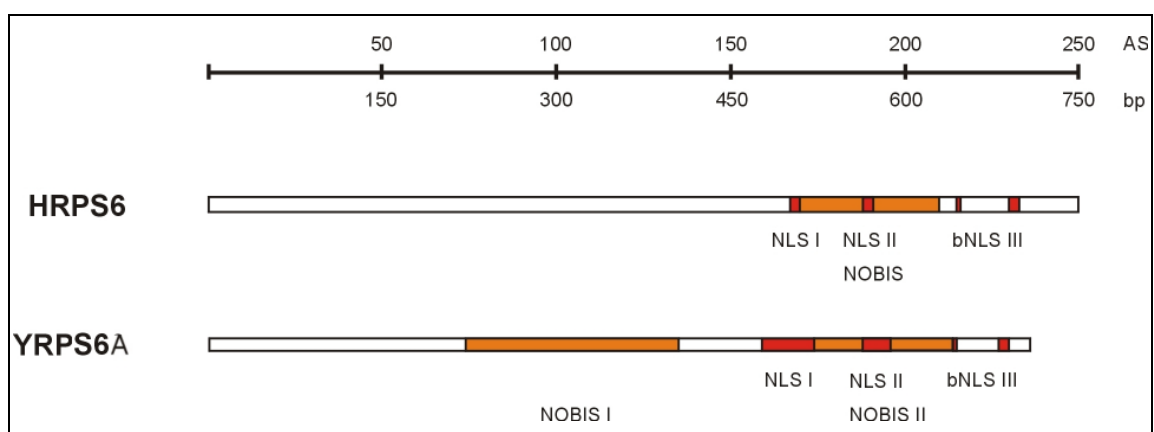


Abb. 5.4 Schematische Darstellung bisher identifizierter Kernlokalisierungssignale (NLS) und nucleolusbindender Domänen (NoBiS) in S6 und S6A.

NLS sind durch rote, NoBiS durch orange Blöcke dargestellt.

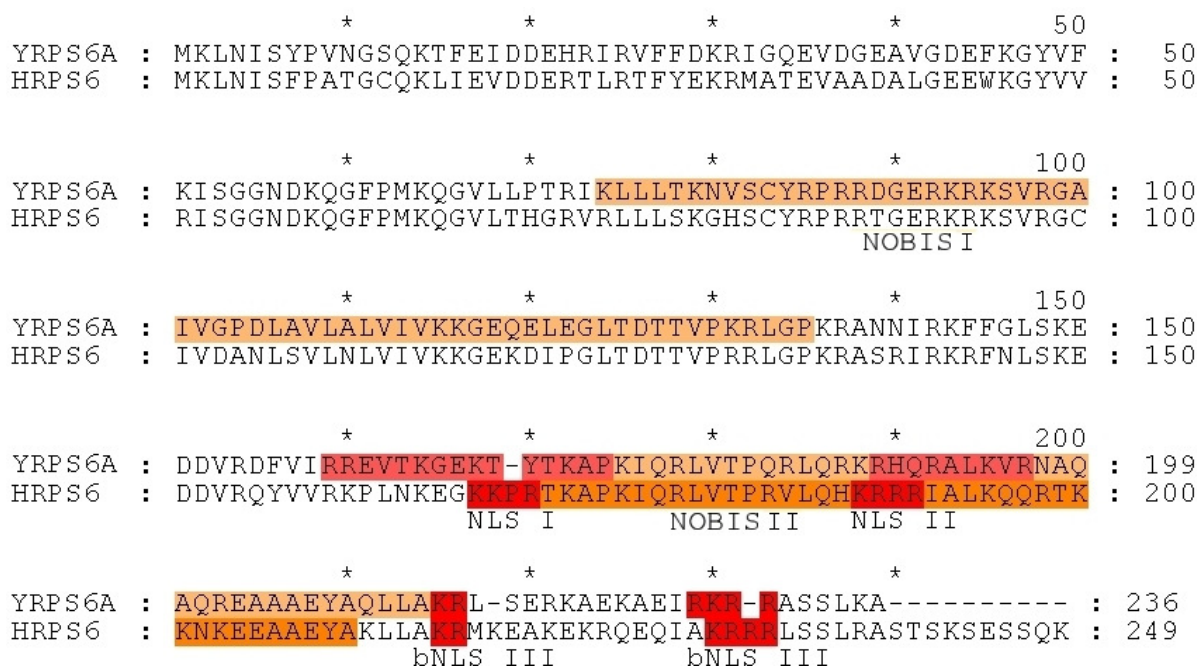


Abb. 5.5 Aminosäuresequenzen bisher identifizierter Kernlokalisationsignale (NLS) und nucleolusbindender Domänen (NoBiS) in S6A und S6.

Die charakterisierten NLS bzw. NoBiS sind rot bzw. orange unterlegt. Die noch nicht eindeutig charakterisierten NLS bzw. NoBiS weisen den entsprechend helleren Farbcode auf.

Die Übereinstimmungen in den Aminosäuresequenzen von verschiedenen Organismen lassen sich mittels der WebLogos (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>, Schneider und Stephens, 1990) sehr deutlich darstellen, wie hier anhand der rpS6 NoBiS1 und NoBiS2 verschiedener Organismen aufgezeigt ist (Kundu-Michalik *et al.*, 2007)

A. Vertebrate

UniProt/Swiss-Prot	Spezies
P62753	<i>Homo sapiens</i>
Q5E995	<i>Bos taurus</i>
P62755	<i>Rattus norvegicus</i>
P62754	<i>Mus musculus</i>
P47838	<i>Gallus gallus</i>
P39017	<i>Xenopus laevis</i>
Q9YGF2	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
Q90YR8	<i>Ictalurus punctatus</i>
Q9YGF2	<i>Takifugu rubripes</i>

B. Invertebrate

XP_001120419	<i>Apis mellifera</i>
P29327	<i>Drosophila melanogaster</i>
Q94624	<i>Manduca sexta</i>
Q96V32	<i>Spodoptera frugiperda</i>
Q7RTL5	<i>Anopheles gambiae</i>
Q9U762	<i>Aedes albopictus</i>
Q9U761	<i>Aedes aegypti</i>
Q9NEN6	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Q9BMX5	<i>Aplasia californica</i>

C. Fungi

P02365	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
P05752	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
RPGD* (http://ribosome.miyazaki-med.ac.jp/)	<i>Magnaporthe grisea</i>
RPGD* (http://ribosome.miyazaki-med.ac.jp/)	<i>Fusarium graminearum</i>
RPGD* (http://ribosome.miyazaki-med.ac.jp/)	<i>Stagonospora nodorum</i>
RPGD* (http://ribosome.miyazaki-med.ac.jp/)	<i>Yarrowia lipolytica</i>
RPGD* (http://ribosome.miyazaki-med.ac.jp/)	<i>Ustilago maydis</i>
RPGD* (http://ribosome.miyazaki-med.ac.jp/)	<i>Rhizopus oryzae</i>

Es wurden für die Weblogos die in der Tabelle genannten Proteindatenbankeinträge respektive Daten aus der Ribosomalen Protein Gen Datenbank (*RPGD) genutzt: Die aus der Kombination der Sequenzen erzeugten WebLogos der NoBiS1 und NoBiS2 stellen sich wie folgt dar:

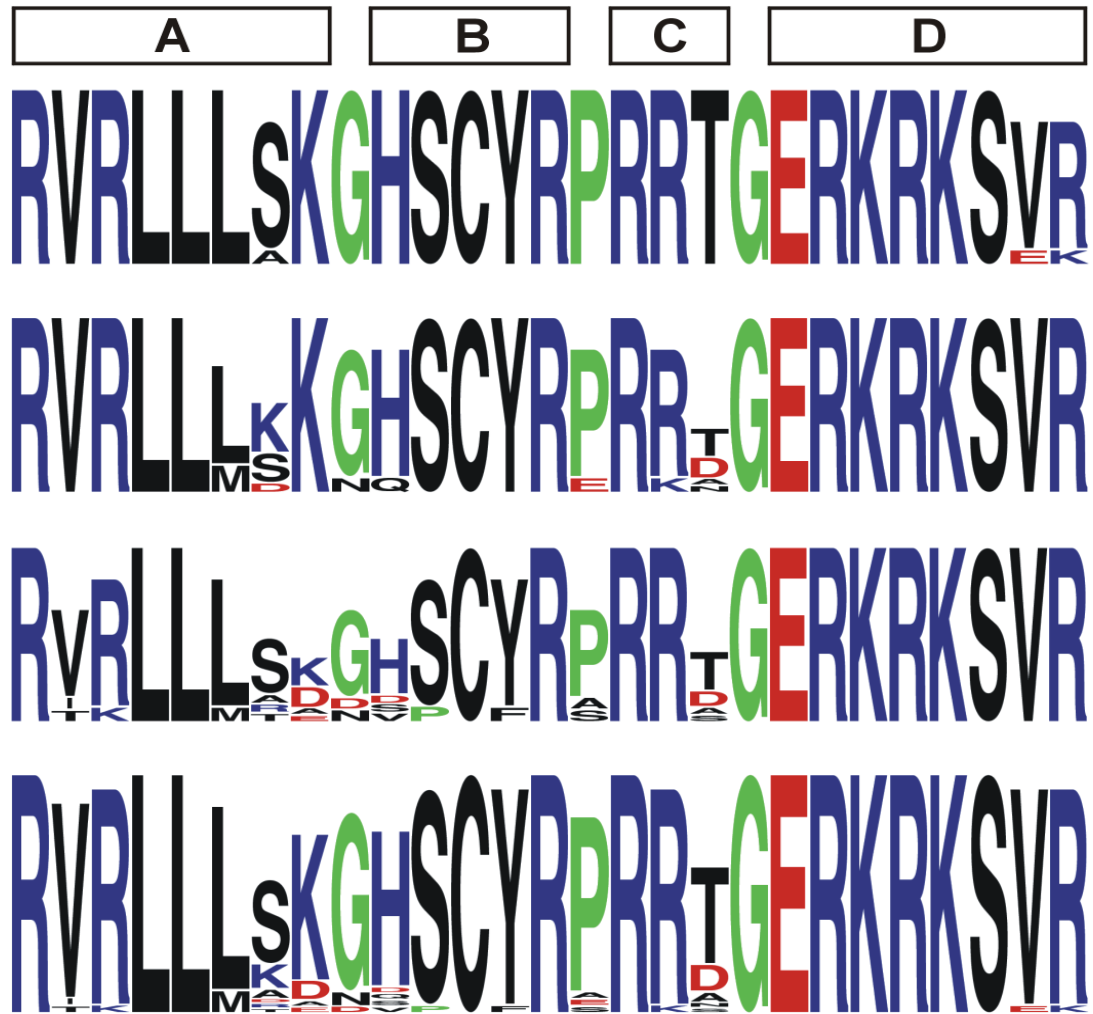


Abb. 5.6 S6 NoBiS1 in der “Homologiedomäne” gelegen

Die im Anhang tabellarisch aufgeführten Sequenzen wurden verbunden und das Sequenzlogo mittels WebLogo daraus erzeugt.

Zeile 1: WebLogo1 der Vertebraten;

Zeile 2: WebLogo1 der Invertebraten,

Zeile 3: WebLogo1 der Fungi,

Zeile 4: WebLogo1 aus der Kombination von Vertebraten, Invertebraten und Fungi.

H, K, R: basische AS (blau); D, E: saure AS (rot); G, P: α -Helixbrecher Glycin und Prolin (grün).

Die vier Unterteilungen A-D wurden aufgrund der dort vorhandenen α -Helixbrecher AS Glycin und Prolin festgelegt.

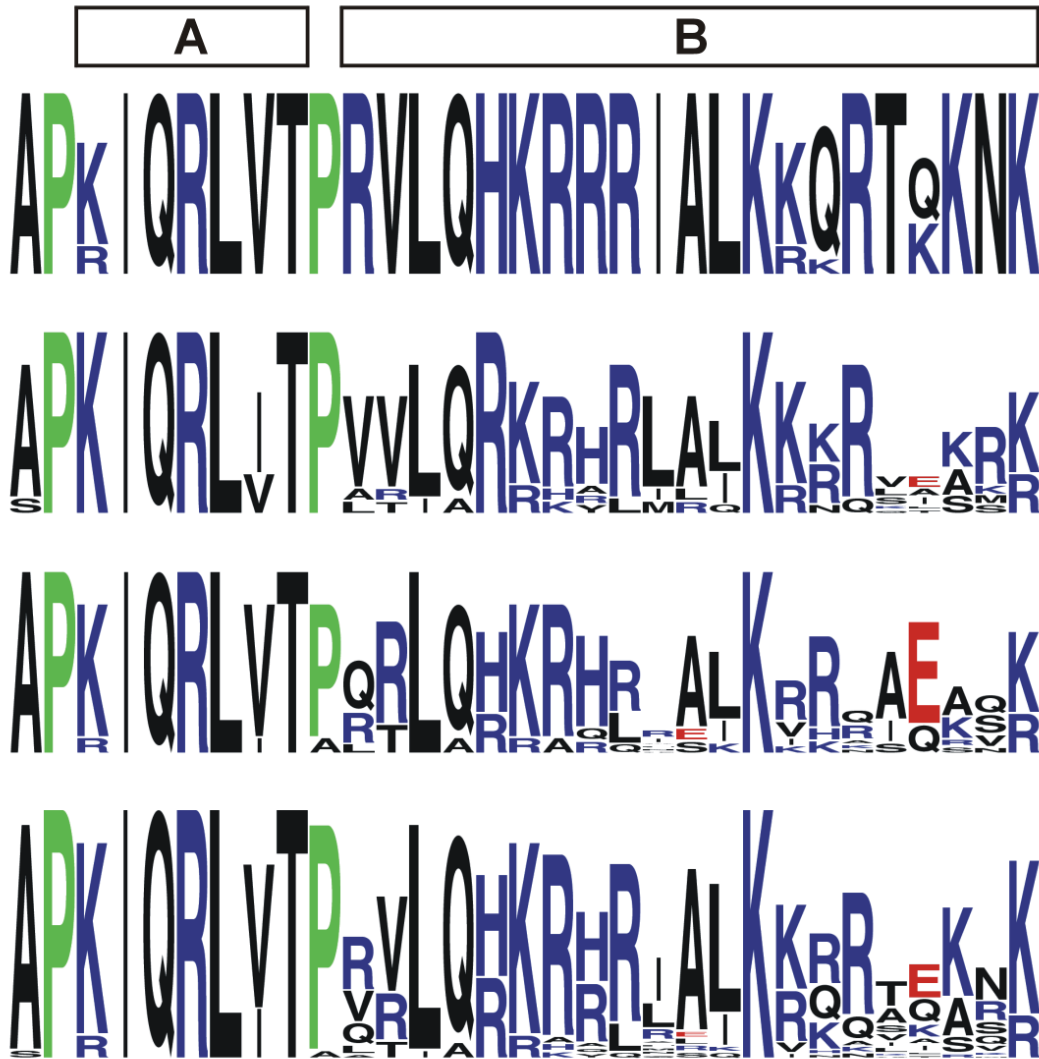


Abb. 5.7 S6 NoBiS2 um das NLSII gelegen

Die im Anhang tabellarisch aufgeführten Sequenzen wurden verbunden und das Sequenzlogo mittels WebLogo daraus erzeugt.

Zeile 1: WebLogo2 von Vertebraten,

Zeile 2: WebLogo2 von Invertebraten,

Zeile 3: WebLogo von Fungi,

Zeile 4: WebLog2 aus der Kombination von Vertebraten, Invertebraten und Fungi.

H, K, R: basische AS (blau); D, E: saure AS (rot); G, P: α -Helixbrecher Glycin und Prolin (grün).

Die Subunterteilung A, B wurde aufgrund der dort vorhandenen α -Helixbrecher AS Prolin festgelegt.

Die von mir zuerst nachgewiesene nucleolare Bindungssequenz (NoBiS1) in der Homologiedomäne konnte in der Zwischenzeit weiter eingegrenzt werden (Abb. 5.6). Sowohl das humane S6 als auch das Hefe S6A besitzen zwei nucleolare Bindungssequenzen: NoBiS1 und NoBiS2, die sich in einem wichtigen Aspekt unterscheiden. NoBiS1 liegt in einem Bereich des rpS6, dem NLS völlig fehlen,

wohingegen die Funktion der NoBiS2 als nucleolare Bindungssequenz abhängig ist vom Vorhandensein der NLSII.

Das Vorhandensein dieser NLS innerhalb der NoBiS2 sichert den schnellen Transport des stark basischen rpS6 vom Cytoplasma in den Kern und verhindert damit die nichtgewollte Bindung von rpS6 an mRNAs, welche den Translationsprozess beeinflussen würde (Wool und Stöffler, 1976). Die NoBiS sind essentiell für den Zusammenbau der ribosomalen Untereinheiten im Nucleolus und beeinflussen somit die Wachstumsrate der Zellen positiv.

5.9 BEDEUTUNG DER TERTIÄRSTRUKTUR VON RPS6 FÜR DIE BIOGENESE RIBOSOMALER 40S-PARTIKEL

Die interessante Konsequenz des Wanderungsverhaltens von S6 Δ NLS1-3 ist (Abb. 4.17), dass ribosomale Proteine auch ohne funktionelles Kernsignal in den Zellkern gelangen können und mit Hilfe ihrer nucleolaren Bindungssequenzen sogar im Nucleolus akkumulieren können. Dies ist nicht verwunderlich, da das Molekulargewicht von rpS6 etwa 30kDa beträgt, während die Ausschlussgröße des NPC für die freie Diffusion in den Zellkern bei ~60kDa liegt. Die nucleolare Akkumulation befähigt jedoch die mutierten S6-Moleküle nicht, in funktionelle Untereinheiten zu integrieren (Abb. 4.17).

Der fehlende Einbau hängt sehr wahrscheinlich mit der schwierigen Aufgabe des S6-Proteins bei der Biogenese der 40S-Untereinheit zusammen, denn das rpS6 bindet sehr frühzeitig an einer definierten 18S rRNA-Sequenz des 45S rRNA-Vorläufermoleküls (Ferreira-Cerca et al., 2005;). Nicht optimal gefaltete S6-Moleküle der Deletionsmutanten können entweder nicht an die rRNA binden oder wenn sie binden können, gelingt es diesen Molekülen nicht, die weitere Faltung und Prozessierung des rRNA-Vorläufers zu katalysieren, damit ein funktionelles 40S-Partikel entsteht.

Die dargestellten Ergebnisse (Abb. 4.17) lassen folgenden Schluss zu: Für das Erreichen des Nucleolus von ribosomalen Proteinen ist deren intakte NoBiS-Domäne von größerer Bedeutung als das Vorhandensein von Kernimportsignalen. Es besteht jedoch kein Zweifel, dass intakte Importsignale die Katalyse der aktiven Translokation von ribosomalen Proteinen in den Zellkern beschleunigen und damit zu einer effizienteren Biogenese von ribosomalen Untereinheiten führen. Der aktive, gerichtete Kernimport dürfte um Größenordnungen schneller verlaufen als die passive Diffusion. Die

energieabhängige Translokation der ribosomalen Proteine vom Cytoplasma ins Nucleoplasma ist essentiell, um die immense Anzahl von ribosomalen Untereinheiten in einer wachsenden Zelle während eines Zellzyklus zu produzieren (Warner, 1999; Bernstein *et al.*, 2007).

Offenbar ist der dephosphorylierte Zustand des rpS6 essentiell für die korrekte Integration in das neu entstehende 40S-Partikel (Abb. 4.17 und Abb. 4.19). Die S6-Phosphorylierung wird anscheinend verhindert, denn fünf Phosphatgruppen mit ihren zehn negativen Ladungen scheinen die biologisch funktionelle Faltung der S6-Moleküle zu stören, so dass die Wechselwirkung mit dem rRNA-Vorläufermolekül nicht zustande kommen kann. Eine Blockierung der S6-Phosphorylierung im Zellkern ist auch wünschenswert, um eventuelle vorzeitige Assoziationen von mRNAs an die neu entstandenen, hochphosphorylierten 40S-Partikel zu vermeiden. Man kann sich vorstellen, dass die fertig gestellte 40S-Untereinheit von Exportfaktoren bzw. Assemblyfaktoren geschützt ist, so dass die nuclearen S6-Kinasen keinen Zugang zu ihren Substraten, den C-terminalen Serinresten besitzen. Auch im freien S6 scheint das Serincluster sehr wahrscheinlich durch assoziierte Proteinfaktoren vor den S6-Kinasen geschützt zu sein.

5.10 DIE FLEXIBLE PHOSPHORYLIERUNGSDOMÄNE AM S6 C-TERMINUS

Durch ¹H-NMR Spektroskopie wurde eine Struktur für das C-terminale Ende des rpS6(217-249), welches die phosphorylierbaren Serincluster enthält, vorhergesagt (Katahira *et al.*, 1996). Danach ist dieser Bereich in eine α -Helix zwischen E222 und R238, eine nachfolgende verzernte helikale Struktur und einem flexiblen Ende ohne irgendwelche sekundäre Struktur aufgebaut. Dieses flexible Ende muss der cytoplasmatischen S6K1 α 2, die das Tetrapeptid KRRR der NLS3 im rpS6 als Erkennungssequenz nutzt, frei zugänglich bleiben. Eine Bindung dieses 13 Aminosäuren langen C-terminalen Endes des hrpS6 an die 18S rRNA kann ausgeschlossen werden, da dieser Bereich leicht durch Trypsin abgespalten werden kann (Wettenhall und Cohen, 1982). Das Fehlen des verlängerten C-terminalen Serinclusters beim Hefe S6A-Protein ist ein weiterer Hinweis, dass dieser C-terminus nicht wesentlich zur nucleolaren Bindung und auch zur Interaktion mit der rRNA beiträgt.

5.11 LOKALISATION VON DEPHOSPHORYLIERTEN RIBOSOMALEN S6-MOLEKÜLEN IM NUCLEOLUS

Die Transkription der ribosomalen Gene findet im Nucleolus statt (Hadjiolov, 1985). Die molekulare Organisation der ribosomalen Transkripte erfolgt in der Form von sogenannten „Christbäumen“, die vor ungefähr 40 Jahren in Kernspreitungen von Amphibien-Oozyten im Elektronenmikroskop dargestellt wurden (Miller und Beatty, 1969). Ungefähr 400 Kopien ribosomaler Gene sind in dem humanen diploiden Genom vorhanden. Sie sind als Tandem-Wiederholungen „head-to-tail“ innerhalb von fünf Chromosomenpaaren positioniert. Lichtmikroskopisch kann man nachweisen, dass die ribosomalen Gene in 10-40 Foci pro Zellkern vorliegen und dass die Transkriptionsaktivität der RNA-Polymerase I mit diesen Foci assoziiert ist (Koberna *et al.*, 2002). EM-Daten identifizieren das DFC als das Subkompartiment des Nucleolus in dem die rRNA-Synthese stattfindet, in Übereinstimmung mit der Detektion von rDNA innerhalb der DFC (Koberna *et al.*, 2002; Granneman und Baserga, 2004). Die Prozessierung der Vorläufer-45S rRNA und der Zusammenbau von präribosomalen Partikeln findet im DFC und in der granularen Komponente (GC) des Nucleolus statt. Obwohl in den letzten Jahren präribosomale RNP-Komplexe isoliert wurden und ihre Zusammensetzung biochemisch im Detail analysiert wurde (Grandi *et al.*, 2002; Bernstein *et al.*, 2007), ist der subnucleolare Ort und die Reihenfolge der Bindung von ribosomalen Proteinen an die neu entstehenden Untereinheiten bisher kaum untersucht (Krüger *et al.*, 2007).

Die Proteinanalyse der präparierten Zellkerne von serumstimulierten HeLa-Zellen im Westernblot haben eindeutig gezeigt, dass die S6-Moleküle im Zellkern nicht phosphoryliert sind (Abb. 4.17). Vergleicht man die S6-Menge im Kernextrakt (NE) mit der cytoplasmatischen, ribosomalen S6-Menge, stellt man fest, dass eine unerwartet große Anzahl von S6-Molekülen im Nucleolus gebunden ist. Da in einer HeLa-Zelle etwa 3000 Ribosomen pro Minute zusammgebaut werden, würde man annehmen, dass der positive Nachweis von S6 im Zellkern nur nach mehrfacher Anreicherung des nuclearen Proteinextraktes möglich sein sollte. Anscheinend sind im Nucleolus größere Mengen an ribosomalen Proteinen gespeichert als dort akut benötigt werden. Andernfalls könnte man das S6-Protein weder als S6-GFP-Fusionsprotein noch immunologisch durch spezifische Antikörper (Abb. 4.19) nachweisen. Lam *et al.* (2007) kommen nach ihrer Analyse der nucleolaren Proteindynamik mittels

Massenspektroskopie zur gleichen Auffassung, dass ein Überschuss an ribosomalen Proteinen im Nucleolus im „steady state“ vorliegt, wenn man den akut für den Partikel-Zusammenbau benötigten Bedarf zugrunde legt. Ihre Proteasom-Inhibierungsversuche deuten darauf hin, dass ein Teil der überschüssigen ribosomalen Proteine durch die im Nucleoplasma vorhandene Proteasomaktivität abgebaut wird (Rockel *et al.*, 2005). Die Konzentration an ribosomalen Proteinen in isolierten Nucleoli nimmt ab, sobald die rRNA-Transkription inhibiert wird (Andersen *et al.*, 2005).

In welchem Subkompartiment des Nucleolus binden freie, neu in den Zellkern importierte S6-Moleküle? Synthese, Modifikationen und die ersten Spaltungen der Prä-rRNA finden in der fibrillaren Komponente (FC) und in der diese umgebenden dichten fibrillaren Komponente (DFC) statt, während spätere Prozessierungsschritte in der granularen Komponente (GC) durchgeführt werden. Bisher wird angenommen, dass die Ribosomenbiogenese im DFC der Säugetierzelle mit der Bildung eines 80S RNP-Komplexes beginnt, der die vollständige 45S Prä-rRNA, früh bindende ribosomale Proteine und eine Vielzahl von nicht-ribosomalen Proteinen sowie Prozessierungsfaktoren sowie Assemblierungsfaktoren enthält (Gerbi und Borovjagan, 2004).

Die Lokalisierung der S6-Moleküle durch Immunelektronenmikroskopie zeigt (Abb. 4.20 und 4.21), dass S6 tatsächlich gehäuft im dargestellten DFC, ringförmig um die fibrillare Komponente (F) angeordnet, zu finden ist, wobei geringe S6-Markierungen in der granularen Komponente (G) ebenfalls auftauchen. Röntgenstrukturanalysen der dreidimensionalen Konformation der 30S und 50S ribosomalen Untereinheiten von Prokaryonten haben gezeigt, dass die ribosomalen Proteine für die Stabilisierung der Faltung von den rRNA-Molekülen essentiell sind (Brodersen *et al.*, 2002; Klein *et al.*, 2004). Nach der Bindung der ribosomalen Proteine sollten die rRNA-Vorläufermoleküle von einer gestreckten Konformation eine Kompaktierung zu einer granularen Konfiguration durchmachen. Nach dieser Überlegung sollte die Bindung von S6 primär im DFC stattfinden und anschließend sollte die weitere Prozessierung der rRNA im GC stattfinden. Experimentell konnte dieses S6-Bindungsverhalten beobachtet werden (Abb. 4.21).

Die Gruppe von Scheer (Krüger *et al.*, 2007) konnte ebenfalls den intranucleolaren Ort der Ribosomenbiogenese über die Lokalisation früh bindender ribosomaler Proteine definieren. Ihre EM-Daten, die mit myc-modifizierten S9 und S14 erhoben wurden, zeigen, dass ein großer Teil der Moleküle in der granularen Komponente detektierbar

ist. Die unterschiedliche Bindung ribosomaler Proteine im DFC bzw. im GC kann dadurch zustande kommen, dass das rRNA-Primärtranskript noch teilweise durch die transiente Interaktion mit etwa 200 snoRNA-Proteinkomplexen assoziiert ist, die die Faltung der Prä-rRNA verhindern und die Wechselwirkung mit den ribosomalen Proteinen mit den spezifischen rRNA-Sequenzen inhibieren.

6. ANHANG

6.1 ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung	DFC	dichte fibrilläre Komponente (im Nucleolus)
AcOH	Acetat, Essigsäure	FCS	Fetal calf serum
AK	Antikörper	FITC	Fluoresceinisothiocyanat
AS	Aminosäure(n)	G	Granuläres Zentrum
ATP	Adenosintriphosphat	GAR	Glycin-Arginin reich(e)
bp	Basenpaar(e)	GC	granuläre Komponente (im Nucleolus)
BSA	bovine serum albumin	GDP	Guanosindiphosphat
C	Cytoplasma	GEF	Guanosin exchange factor
CaM	Calmodulin	GFP	green fluorescent protein
CE	Gesamtzellextrakt	GTP	Guanosintriphosphat
CIP	Calf intestinal alkaline phosphatase	GVO	Gentechnisch veränderter Organismus
COS	CV1 origin SV40 (s. 3.2.2)	H	Stunde(n)
CTP	Cytidintriphosphat	HAc	Wasserstoff-Acetat, Essigsäure
d	Desoxy-	HeLa	Henrietta Lacks (s. 3.2.3)
dd	Didesoxy-	HIV	Humane Immundefizienz-Virus
Da	Dalton	HTLV	Humanes T-Zell-lymphotropes Virus
DEAE	Diethylaminoethyl	IG	Interchromatin-Granula
DMEM	Dulbecco modifiziertes Minimal Essential Medium	IgG	Immunglobulin G
DNA	Desoxyribonucleinsäure	ITS	interne Transkriptionsspacer
cDNA	komplementäre DNA	Kb	Kilobasen
rDNA	Gen der rRNA	KNS	K-Protein nuclear shuttling
DTT	Dithiothreitol	KLH	Keyhole limpet Hämocyanin (s. 3.1.4)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	lacZ	β -Galactosidase codierendes Gen
ER	endoplasmatisches Reticulum	LB-Medium	Luria-Bertani Medium
rER	raues endoplasmatisches Reticulum	M	Molar
ETS	externe Transkriptionsspacer	MCS	multiple cloning site
FG-Seq.	Phenylalanin-Glycin-reiche Sequenzen	min	Minute(n)
F	fibrilläres Zentrum	MWM	molecular weight marker
FC	fibrilläre Komponente (im Nucleolus)		

NE	Nuclearer Extrakt	RPGD	Ribosomal protein gene database
NES	nuclear export signal	rpm	rounds per minute
NLS	nuclear localization signal	rpS6	ribosomales Protein S6
bNLS	bipartite NLS	hrpS6	humanes rpS6
cNLS	classical NLS	yrpS6	Yeast (Hefe) rpS6
No	Nucleolus	RSB	reticulocyte suspension buffer
NoBiS	nucleolare Bindungssequenz	RSV	Rous Sarcoma Virus
NOR	nucleolar organizing region	RT	Raumtemperatur
NOS	nucleolar localization signal	s	Sekunde(n)
NPC	nuclear pore complex	SDS	Natriumdodecylsulfat
NTP	Nucleotidtriphosphat	S6K1	S6-Kinase 1
Nu	Nucleus	S6K2	S6-Kinase 2
OD	optische Dichte	SV40	Simian Virus 40
p.a.	pro analysi, lat.für die Analyse	Tab.	Tabelle
PBS	phosphate buffered saline	TAE	Tris-Acetat-EDTA
PCR	polymerase chain reaction	Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
PNS	postnuclear supernatant	TE	Tris-EDTA
Ran	Ras associated nuclear protein	TBS	Tris buffered saline
Ras	<i>Rat sarcoma Proto-Onkogen</i>	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
RNA	Ribonucleinsäure	TTP	Thymidintriphosphat
mRNA	messenger RNA	U	Unit
rRNA	ribosomal RNA	ÜNK	Übernachtkultur
snRNA	small nuclear RNA	UV	Ultraviolett
snoRNA	small nucleolar RNA	v/v	Volumen pro Volumen
tRNA	transfer RNA	vgl.	vergleiche
RRM	RNA recognition motif	w/v	Gewicht pro Volumen
RNase A	Ribonuclease A	yrpS6A	yeast ribosomal protein S6A
RNP	ribonucleoprotein	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid
hnRNP	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein		
snRNP	small ribonucleoprotein		

6.2 PCR-PRIMER

Name	Sequenz: 5' → 3' - Richtung	Länge	T _{m1} [°C]	T _{m2} [°C]
S10(A1)	ATGGTACTTAAGATGAAGTTGAACATTTCTTACCC	35-mer	46	65
S10(A53)	TTACCATGGTACTTAAGTCTGGTGGTAACGAC	32-mer	46	67
S10(A74)	CGCACCATGGTACTTAAGTTGTTGTTGACCAA	32-mer	46	67
S10(A174)	ACCATGGTACTTAAGATCCAAAGATTGGTT	30-mer	48	63
S10(H135)	CGATATGATCAGAAGCTTGGACCCAATCTCTT	32-mer	46	68
S10(H159)	CGTCTTGATCAGAAGCTTCTGATGACGAAATC	32-mer	48	67
S10(H173)	CTATATGATCAGAAGCTTGGAGCCTTGGTGTA	32-mer	48	67
S10(H190)	ACTCGTGATCAGAAGCTTTGGTGTCTCTTTCT	32-mer	48	67
S10(H195)	CGTGATCAGAAGCTTACCTTCAAAGCTCTTTG	32-mer	48	67
S10(H200)	TCGTGATCAGAAGCTTGCTTGAGCGTTTCTG	31-mer	46	69
S10(H204)	TCGTGATCAGAAGCTTGCTTCTCTTTGAGCTT	32-mer	46	67
S10(H209)	TCGTGATCAGAAGCTTGC GTATTCGGCAGC	30-mer	46	68
S10(H215)	GCGTGATCAGAAGCTTCTCTTAGCCAACAATT	32-mer	46	67
S10(H220)	GTGATCAGAAGCTTTTTCTTTCAGACAATCTC	32-mer	48	67
S10(H236)	TCGTGATCAGAAGCTTGCCTTCAAAGAAGAAG	32-mer	46	67

Tab. 6.1 5'- und 3'-PCR-Primer. (S10 ist die alte Bezeichnung des yrpS6A)

Die Restriktionsschnittstellen Afl II (CTTAAG) und Hind III (AAGCTT) sind **fett** hervorgehoben.

T_{m1} entspricht der ersten Anlagerungstemperatur, T_{m2} der zweiten Anlagerungstemperatur.

6.3 SEQUENZIER-PRIMER

Name	Sequenz: 5' → 3' - Richtung	Länge
pASH-FSeq	GGTCTGACATGGATTGGACG	20-mer
pASH-RSeq	GGAGTGCTGCAAGGCG	16-mer

Tab. 6.2 Sequenzier-Primer.

6.4 SV40-MCS-OLIGONUCLEOTIDE

Name	Sequenz: 5' → 3' - Richtung	Länge
SV40.1	GGCCGCCCCGAAAAAAAAAACGAAAGTGCTTAAGACTAGTGC TAGCATA	48-mer
SV40.2	AGCTTATGCTAGCACTAGTCTTAAGCACTTTGCGTTTTTTT TTCGGGC	48-mer

Tab. 6.3 Oligonucleotide der SV40-MCS.

6.5 S6-KONSTRUKTE DER ARBEITSGRUPPE

Nachfolgend eine Auflistung der in der Arbeitsgruppe erstellten und untersuchten hrpS6- und yrpS6A-Konstrukte und ihre intrazelluläre Lokalisation nach indirekter Immunfluoreszenzdetektion.

Konstrukte hrpS6		Lokalisation		
		Cytosol	Nucleus	Nucleolus
pASH-Konstrukte:				
pASH-S6(1-236)	No	-	+	+++
pASH-S6(1-173)	Nu > C	++	+++	-
pASH-S6(1-159)	C	+++	-	-
pASH-S6(1-135)	C	+++	-	-
pASH-S6(53-220)	No	-	+	+++
pASH-S6(53-159)	C	+++	-	-
pASH-S6(53-135)	C	+++	-	-
pASH-S6(74-159)	C	+++	-	-
pASH-S6(174-236)	No	-	++	+++
pASH-S6(174-220)	No	-	++	+++
pASH-S6(174-215)	No	-	++	+++
pASH-S6(174-209)	Nu	-	+++	-
pASH-S6(174-204)	Nu	-	+++	-
pASH-S6(174-200)	Nu	+	+++	-
pASH-S6(174-195)	Nu	+	+++	-
pASH-S6(174-190)	C	+++	-	-

pASH-SV40-Konstrukte:		Cytosol	Nucleus	Nucleolus
pASH-SV40-S6(1-236)	No	-	+	+++
pASH-SV40-S6(1-173)	No	-	++	+++
pASH-SV40-S6(1-159)	No	-	++	+++
pASH-SV40-S6(1-135)	No	-	++	+++
pASH-SV40-S6(53-220)	No	-	+	+++
pASH-SV40-S6(53-159)	No	-	++	+++
pASH-SV40-S6(53-135)	No	-	++	+++
pASH-SV40-S6(74-159)	No	-	++	+++

		Cytosol	Nucleus	Nucleolus
Deletionskonstrukte				
hrpS6(d53-159)(d170-210)	N	-	+++	-
pASH hrpS6(d53-159) (d170-210)	No	-	-	+++

Konstrukte yrpS6A		Lokalisation		
		Cytosol	Nucleus	Nucleolus
pASH-Konstrukte:				
pASH-S6A(1-236)	No	-	+	+++
pASH-S6A(1-173)	Nu > C	++	+++	-
pASH-S6A(1-159)	C	+++	-	-
pASH-S6A(1-135)	C	+++	-	-
pASH-S6A(53-220)	No	-	+	+++
pASH-S6A(53-159)	C	+++	-	-
pASH-S6A(53-135)	C	+++	-	-
pASH-S6A(74-135)	C	+++	-	-
pASH-S6A(74-159)	C	+++	-	-
pASH-S6A(174-236)	No	-	++	+++
pASH-S6A(174-220)	No	-	++	+++
pASH-S6A(174-215)	No	-	++	+++
pASH-S6A(174-209)	Nu	-	+++	-
pASH-S6A(174-204)	Nu	-	+++	-
pASH-S6A(174-200)	Nu	+	+++	-
pASH-S6A(174-195)	Nu	+	+++	-
pASH-S6A(174-190)	C	+++	-	-

pASH-SV40-Konstrukte:		Cytosol	Nucleus	Nucleolus
pASH-SV40-S6A(1-236)	No	-	+	+++
pASH-SV40-S6A(1-173)	No	-	++	+++
pASH-SV40-S6A(1-159)	No	-	++	+++
pASH-SV40-S6A(1-135)	No	-	++	+++
pASH-SV40-S6A(53-220)	No	-	+	+++
pASH-SV40-S6A(53-159)	No	-	++	+++

pASH-SV40-Konstrukte:		Cytosol	Nucleus	Nucleolus
pASH-SV40-S6A(53-135)	No	-	++	+++
pASH-SV40-S6A(74-135)	No	-	++	+++
pASH-SV40-S6A(74-159)	No	-	++	+++

Tab. 6.4 Lokalisation der bisher untersuchten β -Galactosidase-Fusionsproteine.

Zeichenerklärung: (-) keine Färbung, (+) schwache Färbung,
(++) mittlere Färbung, (+++) starke Färbung.

6.6 DIE 20 KANONISCHEN AMINOSÄUREN

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

6.7 BLAST SUCHE MIT BLASTP 2.2.13

Referenz:

Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

Für den Sequenzvergleich wurde die online Software BLASTP des NCBI am amerikanischen NIH (New York Institute for Health, www.ncbi-nih.gov) genutzt.

Alle verwendeten Sequenzdaten sind bereits veröffentlicht und in der Medline Datenbank zu finden.

Die Einstellungen wurden je nach gewünschtem Vergleichsergebnis gewählt.

So wurde die Sequenz der Homologiedomäne (hrpS6 AS 53-159) als Vergleich durch die Eingrenzung der Vergleichsorganismengruppen z.B. mit den in der PubMed Datenbank vorhandenen AS-Sequenzen von Säugetieren, mit höheren Eukaryonten, niederen Eukaryonten und mit Bakterien verglichen.

The image shows the NCBI protein-protein BLAST search interface. At the top, the NCBI logo is on the left, and the text "protein-protein BLAST" is on the right. Below the logo, there are four tabs: "Nucleotide", "Protein", "Translations", and "Retrieve results for an RID". The "Protein" tab is selected. The main search area contains a large text input field. To the left of this field is a "Search" link. Below the input field, there are several options: "Set subsequence" with "From:" and "To:" input fields; "Choose database" with a dropdown menu showing "nr"; "Do CD-Search" with a checked checkbox; and "Now:" followed by three buttons: "BLAST", "Reset query", and "Reset all".

Im Search Window lassen sich die AS-Sequenzen ohne Nachbearbeitung direkt aus der Medline (PubMed) Datenbank einfügen. Zahlenwerte werden vom Programm ignoriert.

Die Subsequenz kann auf den zu vergleichenden Bereich, hier die Homologiedomäne von AS 53 bis 159 eingestellt werden. Eine Spezifizierung der Datenbank reduziert evtl. die Anzahl positiver Ergebnisse.

The screenshot shows the NCBI BLAST interface. At the top, the NCBI logo and 'nucleotide-nucleotide BLAST' are visible. Below the logo, there are tabs for 'Nucleotide', 'Protein', 'Translations', and 'Retrieve results for an RFD'. The main area contains a text input field with the following sequence:

```

1 atgaagctga acatctcctt cccagccact ggctgccaga aactcattga
agtggacgat
61 gaacgcaaac ttctactttt ctatgagaag cgtatggcca cagaagttgc
tgctgacgct
121 ctgggtgaag aatggaaggg ttatgtggtc cgaatcagtg gtgggaacga
caanaaggt

```

Below the sequence, there is a 'Search' link. Underneath, there are input fields for 'Set subsequence' with 'From: 159' and 'To: 477'. A 'Choose database' dropdown menu is set to 'nr'. At the bottom, there are buttons for 'Now: BLAST!' and 'Reset query' and 'Reset all'.

The 'Options for advanced blasting' section includes:

- 'Limit by entrez query' with an empty input field and 'or select from: All organisms' dropdown menu.
- 'Choose filter' with checkboxes for 'Low complexity', 'Human repeats', 'Mask for lookup table only', and 'Mask lower case'.
- 'Expect' input field set to '10000'.
- 'Word Size' dropdown menu set to '7'.
- 'Other advanced' input field.

In diesem Fensterbereich lassen sich weitere Optionen eingeben. Zum Beispiel lässt sich hier die Organismengruppe von „All organisms“ auf vorgegebene Gruppen umstellen. Möglich ist, wie hier zu sehen die Wahl von Organismengruppen und auch der direkte Vergleich mit speziellen Organismen.

The screenshot shows a dropdown menu for selecting organisms. The list includes:

- All organisms
- Viruses [ORGN]
- Archaea [ORGN]
- Bacteria [ORGN]
- Eukaryota [ORGN]
- Viridiplantae [ORGN]
- Fungi [ORGN]
- Metazoa [ORGN]
- Arthropoda [ORGN]
- Vertebrata [ORGN]
- Mammalia [ORGN]
- Rodentia [ORGN]
- Primates [ORGN]
- Aeropyrum pernix [ORGN]** (highlighted)
- Aquifex aeolicus [ORGN]
- Arabidopsis thaliana [ORGN]
- Bacillus subtilis [ORGN]
- Bos taurus [ORGN]
- Caenorhabditis elegans [ORGN]

Format

Show [Graphical Overview](#) [Linkout](#) [Sequence Retrieval](#) [NCBI-gi](#) Alignment in [HTML](#) [format](#)

[CDS feature](#)

[Masking Character](#) [Lower Case](#) [Masking Color](#) [Grey](#)

Number of: [Descriptions](#) [500](#) [Alignments](#) [250](#)

[Alignment view](#) [Pairwise](#)

[Format for PSI-BLAST](#) [with inclusion threshold](#) [0.005](#)

[Limit results by entrez query](#) or select from: [All organisms](#)

[Expect value range:](#)

[Layout:](#) [Two Windows](#) [Formatting options on page with results:](#) [None](#)

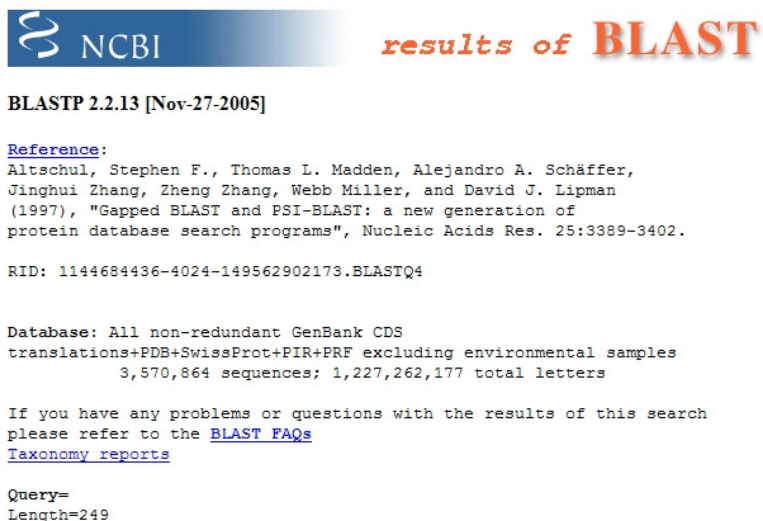
[Autoformat](#) [Semi-auto](#)

BLAST! or **Reset all**

Get the URL with preset values ? **Get URL**

Die im oben gezeigten Formatierungsfenster vorhandenen Möglichkeiten dienen der Anpassung der Ausgabe des Ergebnisses. Die Ergebnisausgabe erfolgt in einem neuen Browserfenster.

Dieses ist in vier unterschiedliche Abschnitte aufgeteilt:



NCBI *results of BLAST*

BLASTP 2.2.13 [Nov-27-2005]

Reference:
 Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 1144684436-4024-149562902173.BLASTQ4

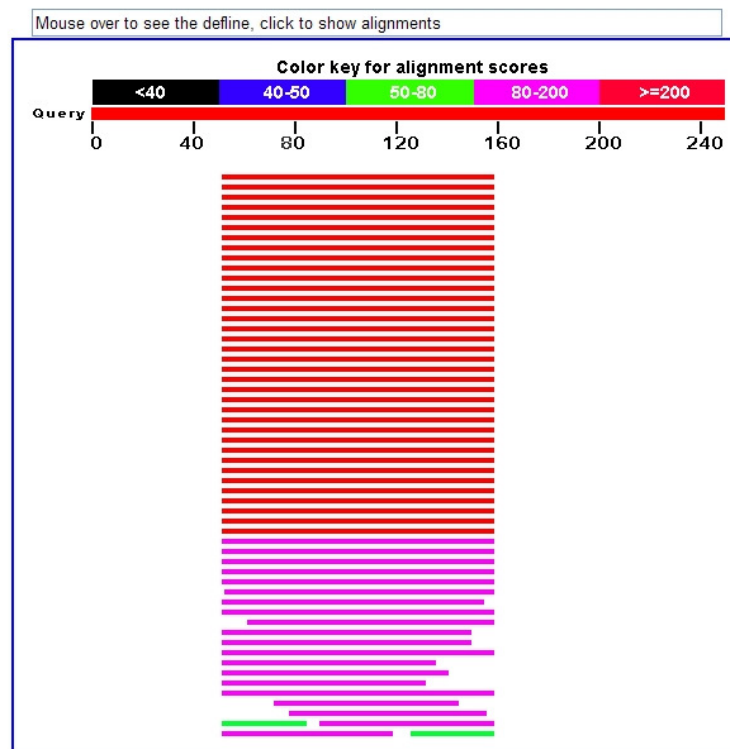
Database: All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples
 3,570,864 sequences; 1,227,262,177 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the [BLAST FAQs](#)
[Taxonomy reports](#)

Query=
 Length=249

1. Reference und Zusammenfassung

Distribution of 73 Blast Hits on the Query Sequence



2. Übersichtstabelle

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value	
gi 15342049 gb AAH13296.1 Ribosomal protein S6 [Homo sapiens]	216	3e-56	G
gi 20381196 gb AAH27620.1 Ribosomal protein S6 [Homo sapiens]	216	3e-56	G
gi 26389925 dbj BAC25813.1 unnamed protein product [Mus musculus]	216	3e-56	G
gi 6448641 emb CAB61268.1 putative ribosomal protein s6 [Trache	216	3e-56	
gi 6601470 gb AAF18987.1 ribosomal protein S6 [Gallus gallus]	216	3e-56	G
gi 83001302 ref XP_903737.1 PREDICTED: similar to 40S riboso...	216	3e-56	G
gi 62752040 ref NP_001015548.1 ribosomal protein S6 [Bos tau...	216	3e-56	G
gi 45382571 ref NP_990556.1 ribosomal protein S6 [Gallus gal...	216	3e-56	G
gi 17158044 ref NP_001001.2 ribosomal protein S6 [Homo sapie...	216	3e-56	G
gi 34785048 gb AAH09427.2 RPS6 protein [Homo sapiens]	216	3e-56	G
gi 74177679 dbj BAE38939.1 unnamed protein product [Mus musculu	216	3e-56	G
gi 82929979 ref XP_486222.2 PREDICTED: similar to 40S riboso...	216	3e-56	G
gi 5921213 emb CAB56419.1 ribosomal protein S6 [Crocodylus nilo	215	7e-56	
gi 58569772 gb AAH79046.1 GekBS200P [Gekko japonicus]	215	9e-56	
gi 78558013 gb ABB46360.1 ribosomal protein S6 [Ovis aries]	215	9e-56	
gi 337516 gb AAA60288.1 ribosomal protein s6	214	2e-55	G
gi 57101416 ref XP_533921.1 PREDICTED: similar to 40S riboso...	214	2e-55	G
gi 50369269 gb AAH75953.1 Zgc:92237 [Danio rerio] >gi 512262...	214	2e-55	G
gi 27735388 gb AAH41281.1 Rps6-prov protein [Xenopus laevis]	213	3e-55	G
gi 15558812 emb CAC69540.1 putative ribosomal protein s6 [Elaph	213	3e-55	
gi 38494291 gb AAH61628.1 40S ribosomal protein S6 [Xenopus ...	213	3e-55	G
gi 32484303 gb AAH54151.1 Rps-6-prov protein [Xenopus laevis...	213	3e-55	G
gi 37779084 gb AAP20202.1 S6 ribosomal protein [Pagrus major]	213	5e-55	
gi 47214750 emb CAG01285.1 unnamed protein product [Tetraodon n	211	1e-54	
gi 46811229 gb AAT01908.1 40S ribosomal protein S6 [Pseudopleur	211	1e-54	
gi 15294023 gb AAK95188.1 40S ribosomal protein S6 [Ictaluru...	211	2e-54	
gi 337514 gb AAA60287.1 ribosomal protein S6	209	4e-54	G
gi 82954408 ref XP_899567.1 PREDICTED: similar to 40S ribosomal	208	9e-54	G
gi 82955311 ref XP_919631.1 PREDICTED: similar to 40S ribosomal	208	9e-54	G
gi 4102186 gb AAD01429.1 S6 ribosomal protein [Oncorhynchus ...	208	9e-54	

3. Sequenzliste

Alignments

```

>  gi|15342049|gb|AAH13296.1|  Ribosomal protein S6 [Homo sapiens]
Length=249

Score = 216 bits (551), Expect = 3e-56
Identities = 107/107 (100%), Positives = 107/107 (100%), Gaps = 0/107 (0%)

Query  53  SGGNDKQGFPMKQGVLTHTGRVRLLLSKGHSCYRPRRTGERKRSVRCIVDANLSVLNLV  112
          SGGNDKQGFPMKQGVLTHTGRVRLLLSKGHSCYRPRRTGERKRSVRCIVDANLSVLNLV
Sbjct  53  SGGNDKQGFPMKQGVLTHTGRVRLLLSKGHSCYRPRRTGERKRSVRCIVDANLSVLNLV  112

Query  113 IVKKGKDIPLGTDITVPRRLGPKRASRIRKLFNLSKEDDVRQYVVR  159
          IVKKGKDIPLGTDITVPRRLGPKRASRIRKLFNLSKEDDVRQYVVR
Sbjct  113 IVKKGKDIPLGTDITVPRRLGPKRASRIRKLFNLSKEDDVRQYVVR  159

>  gi|20381196|gb|AAH27620.1|  Ribosomal protein S6 [Homo sapiens]
Length=249

Score = 216 bits (551), Expect = 3e-56
Identities = 107/107 (100%), Positives = 107/107 (100%), Gaps = 0/107 (0%)

Query  53  SGGNDKQGFPMKQGVLTHTGRVRLLLSKGHSCYRPRRTGERKRSVRCIVDANLSVLNLV  112
          SGGNDKQGFPMKQGVLTHTGRVRLLLSKGHSCYRPRRTGERKRSVRCIVDANLSVLNLV
Sbjct  53  SGGNDKQGFPMKQGVLTHTGRVRLLLSKGHSCYRPRRTGERKRSVRCIVDANLSVLNLV  112

Query  113 IVKKGKDIPLGTDITVPRRLGPKRASRIRKLFNLSKEDDVRQYVVR  159
          IVKKGKDIPLGTDITVPRRLGPKRASRIRKLFNLSKEDDVRQYVVR
Sbjct  113 IVKKGKDIPLGTDITVPRRLGPKRASRIRKLFNLSKEDDVRQYVVR  159

```

4. detaillierter Sequenzvergleich.

LITERATUR

- Adachi, Y., Copeland, T.D., Hatanaka, M. and Oroszlan, M.** (1993). Nucleolar targeting signal of Rex protein of human T-cell leukemia virus type 1 specifically binds to nucleolar shuttle protein B23. *J. Biol. Chem.* **268**: 13930-13934.
- Adam, E.J.H. and Adam, S.A.** (1994). Identification of cytosolic factors required for nuclear location sequence-mediated binding to the nuclear envelope. *J. Cell Biol.* **125**: 547-555.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Andersen, J.S., Lam, Y.W., Leung, A.K., Ong, S.E., Lyon, C.E., Lammond, A.I. and Mann, M.** (2005). Nucleolar proteome dynamics. *Nature* **433**: 77-83.
- Annilo, T., Karis, A., Hoth, S., Rikk, T., Kruppa, J. and Metspalu, A.** (1998). Nuclear import and nucleolar accumulation of the human ribosomal protein S7 depends on both a minimal nuclear localization sequence and an adjacent basic region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**: 759-766.
- Arts, G.J., Fornerod, M. and Mattaj, I.W.** (1998). Identification of a nuclear export receptor for tRNA. *Curr. Biol.* **8**: 305-314.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Deidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K.** (1995). Short Protocols in Molecular Biology. Wiley Inc., USA.
- Bastos, R., Lin, A., Enarson, M. and Burke, B.** (1996). Targeting and function in mRNA export of nuclear pore complex protein NUP153. *J. Cell Biol.* **134**: 1141-1156.
- Bastos, R., Panté, N. and Burke, B.** (1995). Nuclear pore complex proteins. *Int. Rev. Cytol.* **162**: 257-302.
- Bataillé, N., Helser, T. and Friend, H.M.** (1990). Cytoplasmatic transport of ribosomal subunits microinjected into the *Xenopus laevis* oocytes nucleus: A generalized, facilitated process. *J. Cell Biol.* **11**: 1571-1582.
- Bernstein, K.A., Bleichert, F., Bean, J.M., Cross, F.R. and Baserga, S.J.** (2007). Ribosome biogenesis is sensed at the start cell cycle checkpoint. *Mol. Biol. Cell* **18**: 953-964.
- Bischoff, F.R. and Görlich, D.** (1997). RanBP1 is crucial for the release of RanGTP from importin β -related nuclear transport factors. *FEBS Lett.* **419**: 249-254.
- Bischoff, F.R., Krebber, H., Smirnova, F., Dong, W.H. and Ponstingl, H.** (1995). Coactivation of RanGTPase and inhibition of GTP dissociation by RanGTP binding protein RanBP1. *EMBO J.* **14**: 705-715.

- Bischoff, F.R. and Ponstingl, H.** (1991). Mitotic regulator protein RCC1 is complexed with a nuclear Ras-related polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 10830-10834.
- Bouvet, P., Diaz, J.J., Kindbeiter, K., Madjar, J.J. and Amalric, F.** (1998). Nucleolin interacts with several ribosomal proteins through its RRG domain. *J. Biol. Chem.* **273**: 19025-19029.
- Brendel, V., Bucher, P., Nourbakhsh, I., Blaisdell, B.E. and Karlin, S.** (1992). Methods and algorithms for statistical analysis of protein sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 2002-2006.
- Brodersen, D.E., Clemenons, Jr., W.M., Carter, A.P., Wimberly, B.T. and Ramakrishnan, V.** (2002). Crystal structure of the 30S ribosomal subunit from *thermus thermophilus*: structure of the proteins and their interactions with 16S RNA. *J. Mol. Biol.* **316**: 725-768.
- Burd, C.G. and Dreyfuss, G.** (1994). Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* **265**: 615-621.
- Chelsky, D., Ralph, R. and Jonak, G.** (1989). Sequence requirements for synthetic peptide-mediated translocation to the nucleus. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 2487-2492.
- Chi, N.C., Adam, E.J.H., Visser, G.D. and Adam, S.A.** (1996). RanBP1 stabilises the interaction of Ran with p97 in nuclear protein import. *J. Cell Biol.* **135**: 559-569.
- Chou, M.M. and Blenis, J.** (1995). The 70kDa S6 kinase: regulation of a kinase with multiple roles in mitogenic signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**: 806-814.
- Claussen M, Rudt F, Pieler T** (1999) Functional modules in ribosomal protein L5 for ribonucleoprotein complex formation and nucleocytoplasmic transport. *J Biol Chem* **274**: 33951–33958
- Coutavas, E., Ren, M., Oppenheim, J.D., D'Eustachio, P. and Rush, M.G.** (1993). Characterization of proteins that interact with the cell-cycle regulatory protein Ran/TC4. *Nature* **366**: 585-587.
- Crooks, G.E., Hon, G., Chadonia, J.M. and Brenner, S.E.** (2004). WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Res.* **14**: 1188-1190.
- Cullen, B.R., Berger, S.L. and Kimmel, A.R.** (1987). Use of eukaryotic expression technology in the functional analysis of cloned genes. *Meth. Enzym.*, 152, Academic Press Inc., USA.
- Dang, C.V. and Lee, W.M.** (1989). Nuclear and nucleolar targeting sequences of c-erbA, c-myc, N-myc, p53, HSP70 and HIV tat proteins. *J. Biol. Chem.* **264**: 18019-18023.
- Dingwall, C. and Laskey, R.A.** (1991). Nuclear targeting sequences – a consensus? *Trends Biochem. Sci.* **16**: 478-481.

- Dingwall, C., Robbins, J. and Dilworth, S.M.** (1989). Characterisation of the nuclear location sequence of *Xenopus* nucleoplasmin. *J. Cell Sci. Suppl.* **11**: 243-248.
- Ferreira-Cerca, S., Pöll, G., Gleizes, P.-E., Tschochner, H., Milkereit, P.** (2005). Roles of eukaryotic ribosomal proteins in maturation and transport of pre-18S rRNA and ribosome function. *Mol. Cell* **20**: 263-277
- Fantes, P. and Brooks, R.** (1993). *The Cell Cycle. A Practical Approach.* Oxford University Press Inc., USA.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M. and Mattaj, I.W.** (1997). Crm1p is an export receptor for leucine rich nuclear export signals. *Cell* **90**: 1051-1060.
- Fournier, M.J. and Maxwell, E.S.** (1993). The nucleolar snRNAs: catching up with the spliceosomal snRNAs. *Trends Biochem. Sci.* **18**: 131-135.
- Frankenhauser, C., Izaurrealde, E., Adachi, Y., Wingfield, P. and Laemmli, U.K.** (1991). Specific complex of human immunodeficiency virus type 1 Rev and nucleolar B23 proteins: dissociation by the Rev response element. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 2567-2575.
- Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M. and Nashida, E.** (1997). CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* **390**: 308-311.
- Fumagalli, S. and Thomas, G.** (2000). S6 phosphorylation and signal transduction. *In* Translational Control of Gene Expression (Sonenberg, N. *et al.*, eds.) pp. 695-717, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Garcia-Bustos, J., Heitmann, J. and Hall, M.N.** (1991). Nuclear protein localization. *Biochim. Biophys. Acta* **1071**: 83-101.
- Gerace, L. and Burke, B.** (1988). Functional organization of the nuclear envelope. *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**: 335-374
- Gerace L. and Foisner R.** (1994). Integral membrane proteins and dynamic organization of the nuclear envelope. *Trends Cell Biol.*, **4**: 127-131.
- Gerbi, P. and Borojavan, A.V.** (2004). Pre-ribosomal RNA processing in multicellular organisms. *In* The Nucleolus. (M.Olson, ed.). pp. 170-198, Landes Bioscience, New York.
- Görlich, D.** (1998). Transport into and out of the cell nucleus. *EMBO J.* **17**: 2721-2727.
- Görlich, D. and Jäkel, S.** (1998). Importin β , transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells. *EMBO J.* **15**: 4491-4502.
- Görlich, D., Henklein, P., Laskey, R.A. and Hartmann, E.** (1996a). A 41 amino acid motif in importin α confers binding to importin β and hence transit into the nucleus. *EMBO J.* **15**: 1810-1817.

- Görlich, D., Panté, N., Kutay, U., Aebi, U. and Bischoff, F.R.** (1996b). Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *EMBO J.* **15**: 5584-5594.
- Görlich, D., Kosta, S., Kraft, R., Dingwall, C., Laskey, R.A., Hartmann, E. and Prehn, S.** (1995a). Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. *Curr. Biol.* **5**: 383-392.
- Görlich, D., Vogel, F., Mills, A.D., Hartmann, E. and Laskey, R.A.** (1995b). Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import. *Nature* **377**: 246-248.
- Grandi, P., Rybin, V., Bassler, J., Petfalski, E., Strauss, D., Marzioch, M., Schafer, T., Kuster, B., Tschochner, H., Gavin, D. and Hurt, E.** (2002). 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. *Mol. Cell* **10**: 105-115.
- Granneman S. and Baserga, S.J.** (2004). Ribosome biogenesis: of knobs and RNA processing. *Exp. Cell Res.* **296**: 43-50.
- Gressner, A.M. and Wool, I.G.** (1974). The phosphorylation of liver ribosomal protein *in vivo*. Evidence that only a single small subunit protein (S6) is phosphorylated. *J. Biol. Chem.* **249**: 6917-6925.
- Gritz, L., Abovich, N., Teem, J.L. and Rosbash, M.** (1985). Posttranscriptional regulation and assembly into ribosomes of a *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal protein β -galactosidase fusion. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 3426-3442.
- Grove, J.R., Banerjee, P., Balasubramanyam, A., Coffey, P.J., Price, D.J., Avruch, J. and Woodgett, J.R.** (1991). Cloning and expression of two human p70 S6 kinase polypeptides differing only at their amino termini. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 5541-5550.
- Gustavson, W.C., Taylor, C.W., Valdez, B.C., Henning, D., Phippard, A., Ren, Y., Busch, H. and Durban, E.** (1998). Nucleolar protein p120 contains arginine-rich domain that binds to ribosomal RNA. *Biochem. J.* **331**: 387-393.
- Hadjiolov, A.A.** (1985). *The Nucleolus and Ribosome Biogenesis*. Springer-Verlag, Wien.
- Hall, M.N., Craik, C. and Hiraoka, Y.** (1990). Homeodomain of yeast repressor $\alpha 2$ contains a nuclear localization signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 6954-6958.
- Heinze, H., Arnold, H.H., Fischer, D. and Kruppa, J.** (1988). The primary structure of the human ribosomal protein S6 derived from a cloned cDNA. *J. Biol. Chem.* **263**: 4139-4144.
- Henry, Y., Wood, H., Morrissey, J.P., Petfalski, E., Kearsey, S. and Tollervey, D.** (1994). The 5' end of yeast 5.8S rRNA is generated by exonucleases from an upstream cleavage site. *EMBO J.* **13**: 2452-2463.

- Hernandez-Verdun, D. and Gautier, T.** (1994). The chromosome periphery during mitosis. *Bioessays* **16**: 179-185.
- Hopper, A.K., Traglia, H.M. and Dunst, R.W.** (1990). The yeast RNA1 gene product necessary for RNA processing is located in the cytosol and apparently excluded from the nucleus. *J. Cell Biol.* **111**: 309-321.
- Hoth, S.** (1993). Zur Biogenese von Ribosomen: S6-Genstruktur, S3a-Primärstruktur und -Kernimport. Dissertation, Universität Hamburg.
- Hozak, P., Cook, P.R., Schofer, C. Mosgoller, W. and Wachtler, F.** (1994). Site of transcription of ribosomal-RNA and intranucleolar structure in HeLa cells. *J. Cell Sci.* **107**: 639-648.
- Hurt, E., Hannus, S., Schmelzl, B., Lau, D., Tollervey, D. and Simos, G.** (1999). A novel *in vivo* assay reveals inhibition of ribosomal nuclear export in Ran-cycle and nucleoporin mutants. *J. Cell Biol.* **144**: 389-401.
- Iborra, F.J., Jackson, D.A. and Cook, P.R.** (2001). Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells. *Science* **293**: 1139-1142.
- Imamoto, N., Tachibana, T., Matsubae, M. and Yoneda, Y.** (1995). A karyophilic protein forms a stable complex with cytoplasmic components prior to nuclear pore binding. *J. Biol. Chem.* **270**: 8559-8565.
- Isaac, C., Yang, Y. and Meier, U.T.** (1998). Nopp140 functions as a molecular link between the nucleolus and the coiled bodies. *J. Cell Biol.* **142**: 319-329.
- Izaurrealde, E., Kutay, U., von Kobbe, C., Mattaj, I.W. and Görlich, D.** (1997). The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *EMBO J.* **16**: 6535-6547.
- Izaurrealde, E. and Mattaj, I.W.** (1995). RNA export. *Cell* **81**: 153-159.
- Jefferies, H.B.J., Reinhard, C., Kozma, S.C. and Thomas, G.** (1994). Rapamycin selectively repress translation of the "polypyrimidine tract" mRNA family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 4441-4445.
- Johnson, S. and Warner, J.** (1987). Phosphorylation of the *Saccharomyces cerevisiae* equivalent of ribosomal protein S6 has no detectable effect on growth. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 1338-1345.
- Kalderon, D., Roberts, B.L., Richardson, W.D. and Smith, A.E.** (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear localization. *Cell* **39**: 499-509.
- Kass, S., Tyc, K., Steitz, J.P. and Sollner-Webb, B.** (1990). The U3 small nuclear ribonucleoprotein functions at the first step in preribosomal RNA processing. *Cell* **60**: 897-908.

- Katahira, R., Flotow, H., Thomas, G. and Nosaka, A.Y.** (1996). Solution structure of the phosphorylated sites of ribosomal protein S6 by ¹H-NMR spectroscopy. *Int. J. Pep. Protein Res.* **47**: 282-288.
- Klein, D.J., Moore, P.B. and Steitz, T.A.** (2004). The roles of ribosomal protein in the structure assembly and evolution of the large subunit. *J. Mol. Biol.* **340**: 141-177.
- Klokow, T. and Walter, K.** (2000). Unveröffentlichte Beobachtungen.
- Koberna, K., Malinsky, J., Pliss, A., Masata, M., Vecerova, J., Fialova, M., Bednar, J. and Raska, I.** (2002). Ribosomal genes in focus: new transcripts label the dense fibrillar components and form clusters indicative of "Christmas trees" *in situ*. *J. Cell Biol.* **157**: 743-748.
- Krüger, T., Zentgraf, H. and Scheer, U.** (2007). Intranucleolar sites of ribosome biogenesis defined by the localization of early binding ribosomal proteins. *J. Cell Biol.* **177**: 573-578.
- Kruppa, J. and Martini, O.H.W.** (1978). Dephosphorylation of one 40S ribosomal protein in MPC11 cells induced by hypertonic medium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **85**: 349-3458.
- Kruppa, J. and Clemens, M.** (1984). Differential kinetics of changes in the state of phosphorylation of ribosomal protein S6 in the rate of protein synthesis in MPC 11 cells during tonicity shifts. *EMBO J.* **3**: 95-100.
- Kubota, S., Siomi, H., Satoh, T. Endo, S., Maki, M. and Hatanaka, M.** (1989). Functional similarity of HIV-I rev and HTLV-I rex proteins: identification of a new nucleolar-targeting signal in rev protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **162**: 963-970.
- Kundu-Michalik, S., Bisotti, M.-A., Lipsius, E., Bauche, A., Kruppa, A., Klokow, T., Kammler, G. and Kruppa, J.** (2007). Nucleolar binding sequences of human ribosomal protein S6 reside in evolutionary highly conserved peptide clusters.
- Kundu-Michalik, S.** (1997). Nucleolusbindende Domänen im humanen ribosomalen S6-Protein. Dissertation, Universität Hamburg.
- Kutay, U., Bischoff, F.R., Kostka, S., Kraft, R. and Görlich D.** (1997). Export of importin α from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell* **90**: 1061-1071.
- Kyte, J. and Doolittle, R.F.** (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**: 105-142.
- Lam, Y.W., Lammond, A.I., Mann, M. and Andersen, J.S.** (2007). Analysis of nucleolar protein dynamics reveals the nuclear degradation of ribosomal proteins. *Curr. Biol.* **17**: 749-760.

- Leer, R.J., van Raamsdonk-Duin, M.M., Molenaar, C.M., Cohen, L.H., Mager, W.H. and Planta, R.J.** (1982). The structure of the gene coding for the phosphorylated ribosomal protein S10 in yeast. *Nucleic Acids Res.* **10**: 5869-5878.
- Leicher, T.** (1994). Untersuchungen zum Kerntransport des ribosomalen S10-Proteins aus *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit, Universität Hamburg.
- Lipsius, E.** (1998). Nuclearer Import und nucleolare Akkumulation des ribosomalen S6-Proteins. Dissertation, Universität Hamburg.
- Lipsius, E., Walter, K., Leicher, T., Phlippen, W., Bisotti, M.A. and Kruppa, J.** (2005). Evolutionary conservation of nuclear and nucleolar targeting sequences in yeast ribosomal protein S6A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **333**: 1353-1360.
- Long, E.O. and Dawid, I.B.** (1980). Repeated genes in eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **49**: 727-764.
- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L. and Melchior, F.** (1997). A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* **88**: 97-107.
- Martin, K.A., Schalm, S.S., Romanelli, A., Keon, K.L. and Blenis, J.** (2001). Ribosomal S6 kinase2 inhibition by a potent C-terminal repressor domain is relieved by mitogen-activated protein-extracellular signal-regulated kinase kinase regulated phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **276**: 7892-7898.
- Matunis, M.J., Coutavas, E. and Blobel, G.** (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein between cytosol and nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* **135**: 1457-1470.
- Meier, U.T. and Blobel, G.** (1992). Nopp140 shuttles on tracks between nucleolus and cytoplasm. *Cell* **70**: 127-138.
- Melchior, F., Pascal, B., Evans, E. and Gerace, L.** (1993). Inhibition of nuclear protein import by nonhydrolyzable analogs of GTP and identification of the small GTPase Ran/TC4 as an essential transport factor. *J. Cell Biol.* **123**: 1649-1659.
- Mélèse, T. and Xue, Z.** (1995). The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**: 319-324.
- Michael, W.M., Choi, M. and Dreyfuss, G.** (1995). A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway. *Cell* **83**: 415-422.
- Michael, W.M. and Dreyfuss, G.** (1996). Distinct domains in ribosomal protein L5 mediate 5S rRNA binding and nucleolar localization. *J. Biol. Chem.* **271**: 11571-11574.
- Michael, W.M., Eder, P.S. and Dreyfuss, G.** (1997). The K nuclear shuttling domain: A novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein. *EMBO J.* **16**: 3587-3598.

- Miller, O.L. and Beatty, B.R.** (1969). Visualization of nucleolar genes. *Science* **164**: 955-957.
- Montagne, J., Stewart, M.J., Stocker, H., Hafen, E., Kozma, S.C. and Thomas, G.** (1999). *Drosophila* S6 kinase : a regulator of cell size. *Science* **285**: 2126-2129.
- Moore, M.S. and Blobel, G.** (1993). The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature* **365**: 661-663.
- Moreland, R.B., Nam, H.G., Hereford, L.M. and Fried, H.M.** (1985). Identification of a nuclear localization signal of a yeast ribosomal protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 6561-6565.
- Moroianu, J., Hijikata, M., Blobel, G. and Radu, A.** (1995). Mammalian karyopherin $\alpha 1\beta$ and $\alpha 2\beta$ heterodimers: $\alpha 1$ and $\alpha 2$ subunit binds nuclear localization sequences and β subunit interacts with peptide repeat containing nucleoporins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 6532-6536.
- Moy, T.I. and Silver, P.A.** (1999). Nuclear export of the small ribosomal subunit requires the Ran-GTPase cycle and certain nucleoporins. *Genes Dev.* **13**: 2118-2133.
- Nigg, E.A.** (1997). Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature* **386**: 779-787.
- Nomura, M.** (1973). Assembly of bacterial ribosomes. *Science* **179**: 864-873.
- Ohtsubo, M., Okazaki, H. and Nishimoto, T.** (1989). The RCC1 protein, a regulator for the onset of chromosome condensation locates in the nucleus and binds to DNA. *J. Cell Biol.* **109**: 1389-1397.
- Panté, N. and Aebi, U.** (1996a). Sequential binding for import ligands to distinct nuclear pore regions during their nuclear import. *Science* **273**: 1729-1732.
- Panté, N. and Aebi, U.** (1996b). Toward the molecular dissection of protein import into nuclei. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**: 397-406
- Pende, M., Um, S.H., Mieulet, V., Sticker, M., Goss, V.L., Mestan, J., Mueller, M., Fumagalli, S., Kozma, S.C. and Thomas, G.** (2004). S6K1^{-/-}/S6K2^{-/-} mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 3112-3124.
- Phlippen, W.** (1994). Charakterisierung eines postulierten zweiteiligen Kernsignals im carboxyterminalen Abschnitt des ribosomalen S10-Proteins aus der Hefe. Diplomarbeit, Universität Hamburg.
- Pollard, V.W., Michael, W.M., Nakielny, S., Siomi, M.C., Wang, F. and Dreyfuss, G.** (1996). A novel receptor mediated nuclear protein import pathway. *Cell* **88**: 985-994.

- Quaye, I.K.E., Toku, S. and Tanaka, T.** (1996). Sequence requirement for nucleolar localization of rat ribosomal protein L31. *Eur. J. Cell Biol.* **69**: 151-155.
- Rapoport, T.A., Jungnickel, B. and Kutay, U.** (1996). Protein transport across the eukaryotic endoplasmatic reticulum and the bacterial inner membranes. *Annu. Rev. Biochem.* **65**: 271-303.
- Rexach, M. and Blobel, G.** (1995). Protein import into nuclei: Association and dissociation reactions involving transport substrat, transport factors and nucleoporins. *Cell* **83**: 683-692.
- Richards, S.A., Lounsbury, K.M., Carey, K.L. and Macara, I.G.** (1996). A nuclear export signal is essential for the cytosolic localization of the Ran binding protein RanBP1. *J. Cell Biol.* **134**: 1157-1168.
- Rockel, T.D., Stuhlmann, D. and von Mikecz, A.** (2005). Proteasomes degrade proteins in focal subdomians of the human cell nucleus. *J. Cell Sci.* **118**: 5231-5242.
- Rout, M.P., Blobel, G. and Aitchison, J.D.** (1997). A distinct nuclear import pathway used by ribosomal proteins. *Cell* **89**: 717-725.
- Rout, M.P. and Wentz, S.R.** (1994). Pores for thought: nuclear pore complex proteins. *Trends Cell Biol.* **4**: 357-365.
- Rudt, F. and Pieler, T.** (1996). Cytoplasmatic retention and nuclear import of 5S ribosomal RNA containing RNPs. *EMBO J.* **15**: 1383-1391.
- Russo, G., Ricciardelli, G. and Pietropaolo, C.** (1997). Different domains cooperate to target the human ribosomal L7a protein to the nucleus and to the nucleoli. *J. Biol. Chem.* **272**: 5229-5235.
- Ruvinsky, I. and Meyuhas, O.** (2006). Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein sythesis to cell size. *Trends Biochem. Sci.* **31**: 342-348.
- Ruvinsky, I., Sharon, N., Lerer, T., Cohen, H., Stolovich-Rain, M., Nir, T., Dor, Y., Zisman P. and Meyuhas, O.** (2005). Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes Dev.* **19**: 2199-2211.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** (1989). *Molekular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Sanes, J.R., Rubenstein, J.L.R. and Nicolas, J.F.** (1986). Use of a recombinant retrovirus to study post-implantation cell lineage in mouse embryos. *EMBO J.* **5**: 3133-3142.
- Schaap, P.J., van't Riet, J., Woldringh, C.L. and Raué, H.A.** (1991). Identification and functional analysis of the nuclear localization signals of ribosomal protein L25 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* **221**: 225-237.

- Schatz, G. and Dobberstein, B.** (1996). Common principles of protein translocation across membranes. *Science* **271**: 1519-1526.
- Scheer, U., Thiry, M. and Goessens, G.** (1993). Structure, function and assembly of the nucleolus. *Trends Cell Biol.* **3**: 236-241.
- Schlenstedt, G., Smirnova, E., Deane, R. Solsbacher, J., Kutay, U., Görlich, D., Ponstingl, H. and Bischoff, F.R.** (1997). Yrb4p, a yeast RanGTP binding protein involved in import of ribosomal protein L25 into the nucleus. *EMBO J.* **16**: 6237-6249.
- Schmidt, C., Lipsius, E. and Kruppa, J.** (1995). Nuclear and nucleolar targeting of human ribosomal protein S6. *Mol. Biol. Cell* **6**: 1875-1885.
- Schmidt-Zachmann, M.S. and Nigg, E.A.** (1993). Protein localization to the nucleolus: a search for targeting domains in nucleolin. *J. Cell Sci.* **105**: 799-806.
- Schneider T.D. and Stephens, R.M.** (1990). Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acid Res.* **18**: 6097-6100.
- Shaw, P.J. and Jordan, E.G.** (1995). The nucleolus. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**: 93-121.
- Shima, H., Pende, M., Chen, Y., Fumagalli, S., Thomas, G. and Kozma, S.C.** (1998). Disruption of the p70^{s6k}/p85^{s6k} gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. *EMBO J.* **17**: 6649-6659.
- Silver, P.A.** (1991). How proteins enter the nucleus. *Cell* **64**: 489-497.
- Siomi, H., Shida, H., Maki, M. and Hatanaka, M.** (1990). Effects of a highly basic region of human immunodeficiency virus Tat protein on nucleolar localization. *J. Virol.* **64**: 1803-1807.
- Stade, K., Ford, C.S., Guthrie, C. and Weis, K.** (1997). Exportin 1 is an essential nuclear export factor. *Cell* **90**: 1041-1050.
- Stoffler, D., Goldie, N.K., Feja, B. and Aebi, U.** (1999). Calcium-mediated structural changes of native nuclear pore complexes monitored by time-lapse Atomic Force Microscopy. *J. Mol. Biol.* **287**: 741-752.
- Sulic, S. Panic, L., Barkic, M., Mercep, M., Uzelac, M. and Volarevic, S.** (2005). Inactivation of ribosomal protein gene in T lymphocytes activates a p53-dependent checkpoint response. *Genes Dev.* **19**: 3070-3082.
- Taylor, W.R.** (1986). The classification of amino acid conservation. *J. Theor. Biol.* **119**: 205-218.
- Thiry, M. and Goessens, G.** (1996). The nucleolus during the cell cycle. Springer Verlag, Heidelberg.

- Thomas, G., Martin-Perez, J., Siegmann, M. and Otto, A.M.** (1982). The effect of serum, EGF, PGF2a and insulin on S6 phosphorylation and the initiation of protein and DNA synthesis. *Cell* **30**: 235-242.
- Timmers, A.C.J., Stuger, R., Shaap, P.J., van't Riet, J. and Raué, H.A.** (1999). Nuclear and nucleolar localization of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal proteins S22 and S25. *FEBS Lett.* **452**: 335-340.
- Todorov, I.T., Noll, F. and Hadjiolov, A.A.** (1983). The sequential addition of ribosomal proteins during the formation of the small ribosomal subunit in friend erythroleukemia cells. *Eur. J. Biochem.* **131**: 271-275.
- Tschochner, H. and Hurt, E.** (2003). Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol.* **13**: 255-263.
- Underwood, M.R. and Fried, H.M.** (1990). Characterization of nuclear localization sequences derived from yeast ribosomal protein L29. *EMBO J.* **9**: 91-99.
- Valdez, B.C., Perlaky, L., Henning, D., Saijo, Y. Chan, P.K. and Bush, H.** (1994). Identification of the nuclear and nucleolar localization signals of the protein p120. Interaction with translocation protein B23. *J. Biol. Chem.* **269**: 23776-23783.
- Walter, K.** (2000). Signale für den Kernimport und die Nucleolus-Akkumulation im ribosomalen S10-Protein aus *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit, Universität Hamburg.
- Warner, J.** (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem. Sci.* **24**: 437-441.
- Weis, K., Ryder, U. and Lamond, A.I.** (1996). The conserved amino terminal domain of hSRP1 α is essential for nuclear protein import. *EMBO J.* **15**: 1818-1825.
- Wen, W., Meinkoth, J.L., Tsien, R.Y. and Taylor, S.S.** (1995). Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* **82**: 463-473.
- Wettenhall, R.E. and Cohen, P.** (1982). Isolation and characterization of cyclic AMP-dependent phosphorylation sites from rat liver ribosomal protein S6. *FEBS Lett.* **140**: 263-269.
- Wittmann-Liebold, B., Geissler, A.W., Lin, A. and Wool, I.G.** (1979). Sequence of the amino-terminal region of rat liver ribosomal proteins S4, S6, S8, L6, L7a, L18, L27, L30, L37, L37a and L39. *J. Supramol. Struct.* **12**: 425-33.
- Wool, I.G. and Stöffler, G.** (1976). Determination of the size of the pool of free ribosomal proteins in rat liver cytoplasm. *J. Mol. Biol.* **108**: 201-218
- Wool, I.G., Chan, Y.L. and Glück, A.** (1996). Mammalian ribosomes: The structure and evolution of proteins. Translational control. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Xue, Z. and Mélése, T.** (1994). Nucleolar proteins that bind NLSs: a role in nuclear import or ribosome biogenesis? *Trends Cell Biol.* **4**: 414-417.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1 Schematische Darstellung einer eukaryontischen Zelle.	12
Abb. 1.2 Architektur des Kernporenkomplexes (Rout und Wentz, 1994).	14
Abb. 1.3 Importmechanismus klassischer NLS-Proteine (Görlich, 1998).	21
Abb. 1.4 Transport von Importinen und Exportinen (Görlich, 1998).	24
Abb. 1.5 Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Pinealocyten-Nucleolus der Ratte.	28
Abb. 1.6 Effektoren der S6-Kinase.	37
Abb. 4.1 Genkarte des pASH-Vektors.	69
Abb. 4.3 Restriktionsmuster der Vektoren pKHIacZ, pASH und pASH-SV40.	71
Abb. 4.4 DNA-Sequenz der MCS des pASH-SV40-Vektors.	72
Abb. 4.5 Lokalisation von β -Galactosidase, Darstellung durch Immunfluoreszenz und in der Phasenkontrastdarstellung.	75
Abb. 4.6 Lokalisation von SV40- β -Galactosidase durch indirekte Immunfluoreszenz.	76
Abb. 4.7 Schematische Darstellung von yrpS6A(1-236).	77
Abb. 4.8 Lokalisation des yrpS6A(1-236)- β -Galactosidase-Fusionsproteins durch indirekte Immunfluoreszenz	77
Abb. 4.9 Schematische Darstellung der bisher untersuchten Fragmente der Homologiedomäne aus yrpS6A.	78
Abb. 4.10 Lokalisation des β -Galactosidase-Fusionsproteins SV40-S6A(74-135).	79
Abb. 4.11 Schematische Darstellung der Fragmente der Homologiedomäne.	79
Abb. 4.12 Intrazelluläre Lokalisation der β -Galactosidase-Fusionsproteine.	80
Abb. 4.13 Schematische Darstellung der Fragmente der Homologiedomäne.	81
Abb. 4.14 Lokalisation der β -Galactosidase-Fusionsproteine SV40-hrpS6(d53-159) (d170-210), hrpS6(d53-159)(d170-210).	81
Abb. 4.15 Homologiedomäne im aminoterminalen Sequenzbereich von rpS6 verschiedener Hefen.	83
Abb. 4.16 NoBiS 2 im carboxyterminalen Sequenzbereich von rpS6 verschiedener Hefen.	84
Abb. 4.17 Blockierung der Integration von S6-Deletionsmutanten in 40S-Partikel und Inhibierung der S6-Phosphorylierung im Zellkern.	89
Abb. 4.18 Intrazelluläre Lokalisation der S6Kinase1 Isoenzyme.	90
Abb. 4.19 Intrazelluläre Verteilung von phosphorylierten S6-Molekülen.	93

Abb. 4.20 Verteilung der S6-Proteine im Zellkern.....	95
Abb. 4.21 Verteilung der S6-Proteine im Zellkern.....	96
Abb. 5.1 Exon-Intron Struktur des ribosomalen S6-Gens verschiedenem Spezies.	97
Abb. 5.2 Hydrophatisches Profil des ribosomalen S6- und S6A-Proteins nach Kyte-Doolittle.	99
Abb. 5.3 Physikochemischer Aminosäure-Vergleich der ribosomalen Proteine S6 und S6A.	100
Abb. 5.4 Schematische Darstellung bisher identifizierter Kernlokalisierungssignale (NLS) und nucleolusbindender Domänen (NoBiS) in S6 und S6A.	106
Abb. 5.5 Aminosäuresequenzen bisher identifizierter Kernlokalisierungssignale (NLS) und nucleolusbindender Domänen (NoBiS) in S6A und S6.....	107
Abb. 5.6 S6 NoBiS1 in der "Homologiedomäne" gelegen.....	109
Abb. 5.7 S6 NoBiS2 um das NLSII gelegen	110

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1.1 NLS des großen SV40 T-Antigens.....	16
Tab. 1.2 Bipartites NLS des nuclearen Proteins Nucleoplasmin.....	17
Tab. 1.3 Nicht-klassisches NLS des transkriptionalen Repressors Met α 2.....	18
Tab. 1.4 NLS ribosomaler Proteine aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
Tab. 1.5 NLS ribosomaler Proteine aus <i>Homo sapiens</i>	19
Tab. 1.6 NES des HIV-Rev-Proteins.....	19
Tab. 1.7 M9-Domäne des hnRNP A1-Proteins.....	20
Tab. 1.8 KNS-Domäne des hnRNP K-Proteins.....	20
Tab. 1.9 BIB-Domäne des ribosomalen Proteins L23a.....	26
Tab. 1.10 NOS der retroviralen Proteine HIV-Tat, HIV-Rev und HTLV-Rex.....	34
Tab. 1.11 NOS des nucleolaren Proteins p120.....	34
Tab. 1.12 NoBiS des ribosomalen Proteins L31 der Ratte.....	35
Tab. 4.1 Kernlokalisationssignale (NLS) und nucleolare Bindungssequenzen (NoBiS) der ribosomalen Proteine hrpS6 und yrpS6A.....	67
Tab. 4.2 Phosphorylierungsstellen am C-terminus von rpS6.....	86
Tab. 5.1 Aminosäurezusammensetzung der ribosomalen Proteine S6 und S6A.....	98
Tab. 5.2 Aminosäure-Klassifizierung.....	101
Tab. 5.3 Peptidsequenzen p120 NOS, L31 NoBiS, S6A NoBiS.....	104
Tab. 5.4 Nucleare Lokalisations Sequenzen verschiedener Proteine.....	105
Tab. 6.1 5'- und 3'-PCR-Primer.....	118
Tab. 6.2 Sequenzier-Primer.....	118
Tab. 6.3 Oligonucleotide der SV40-MCS.....	118
Tab. 6.4 Lokalisation der bisher untersuchten β -Galactosidase-Fusionsproteine.....	121