

Die funktionelle Domänenstruktur des humanen Kernproteins Scaffold Attachment Factor A

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
an dem Fachbereich für Biologie der Universität Hamburg



vorgelegt von
Andrea Schwander
aus Rheinfelden

Hamburg, Juni 2004

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. W. DEPERT
Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. M. BÖTTGER

Tag der Disputation: 20. August 2004

Hamburg, den 06. August 2004



A handwritten signature in black ink, appearing to read "Arno Frühwald".

Professor Dr. Arno Frühwald
Dekan

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von Dezember 2000 bis Juni 2004 in der Abteilung für Molekulare Zellbiologie am Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie in Hamburg angefertigt.

Danksagung

Mein Dank gilt zuerst *Herrn Prof. Dr. Wolfgang Deppert* für die Ermöglichung und Betreuung dieser Dissertation.

Dr. Frank O. Fackelmayer danke ich besonders herzlich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für die Bereitstellung der interessanten Fragestellungen, die ich im Laufe meiner Dissertation bearbeiten durfte, für seine ständige Diskussionsbereitschaft und für das entspannte Arbeitsklima.

Den Mitgliedern unseres Labors *Maike Bossert, Giulia Mearini, Roger Helbig* und *Frank Herrmann* danke ich ganz besonders für die tolle Atmosphäre und für ihre Bereitschaft mich mit Rat und Tat durch die Höhen und Tiefen meiner Arbeit zu begleiten und nicht zuletzt für den Spaß, den wir während dieser Zeit hatten. Ganz besonders danke ich *Maike Bossert* und *Giulia Mearini* für ihre enorme Hilfsbereitschaft.

Andreas Rimek danke ich für die Durchführung der Zellsortierung und *Gideon Dreyfuss* und seinem Labor für die Bereitstellung des Antikörpers gegen die hnRNP-Proteine. Dem Labor *Deppert* danke ich für viele kleine Leihgaben und Hilfestellungen bei mikroskopischen Methoden.

Meinen Eltern und meinen Geschwistern, meinen Freunden und Mitbewohnern, und ganz besonders *Annette Weise*, danke ich sehr herzlich dafür, dass sie mich immer unterstützt haben und mir einen so schönen Ausgleich zu meiner Arbeit geschenkt haben. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	V
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1. Der Zellkern	1
1.1.1. Die Kernhülle	1
1.1.2. Proteinimport über die Kernmembran	2
1.1.3. Dynamische Prozesse im Zellkern	4
1.1.4. Der strukturelle Aufbau des Zellkerns	7
1.1.4.1. Substrukturen des Zellkerns	7
1.1.4.2. Organisation des Chromatins	8
1.1.4.3. Die Kernmatrix (Kerngerüst)	9
1.1.5. SAR/MAR-DNA	11
1.1.6. SAR/MAR-bindende Proteine	12
1.2. ‚Scaffold Attachment Factor A‘ (SAF-A)	13
1.2.1. Identifizierung und Lokalisation des SAF-A	13
1.2.2. Domänenstruktur des humanen SAF-A	14
1.2.3. Die SAF-Box und der DNA-Bindungsmodus von SAF-A	15
1.2.4. Funktionen des menschlichen SAF-A	17
2. Zielsetzung	19
3. Material und Methoden	20
3.1. Material	20
3.1.1. Chemikalien, Geräte und Zubehör	20
3.1.2. Oligonukleotide, Vektoren und Antikörper	22
3.1.2.1. Verwendete Primer	22
3.1.2.2. Verwendete Vektoren	23
3.1.2.3. Verwendete Antikörper	23
3.1.3. Allgemeine Puffer und Lösungen	24

3.2. Methoden	25
3.2.1. Allgemeine Methoden	25
3.2.2. Arbeiten mit DNA	26
3.2.2.1. Gerichtete Klonierung	26
3.2.2.2. Deletions-PCR	27
3.2.2.3. Mutagenese-PCR	29
3.2.2.4. Elektroporation von <i>E. coli</i>	30
3.2.2.5. Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> (Minipräparation)	30
3.2.2.6. Plasmid-Isolierung aus <i>E. coli</i> -Zellen (Maxipräparation)	31
3.2.2.7. DNA-Sequenzierung	31
3.2.3. Analyse von Proteinen	32
3.2.3.1. Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	32
3.2.3.2. Westernblot Analyse	32
3.2.3.3. Immunpräzipitation von Proteinen	33
3.2.3.4. Chromatinfractionierung- und DNA-Bindungs-Assays	33
3.2.4. Arbeiten mit Zellen	35
3.2.4.1. Zellkultur	35
3.2.4.2. Chemische Transfektion mit Polyethylenimin (PEI)	35
3.2.4.3. Herstellung stabiler Zelllinien	35
3.2.4.4. Zellsortierung	36
3.2.4.5. Zellfraktionierung von HEK-293-Zellen <i>in situ</i>	37
3.2.4.6. Immunfärbung <i>in situ</i>	38
3.2.5. Mikroskopische Methoden	39
3.2.5.1. Herstellung von Präparaten für die Mikroskopie	39
3.2.5.2. Fluoreszenzmikroskopie	40
3.2.5.3. Arbeiten mit dem konfokalen Mikroskop	40
3.2.5.4. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen am konfokalen Mikroskop	41
3.2.5.5. Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP)	42
4. Ergebnisse	46
4.1. Mutationsanalyse der konservierten SAF-Box	46
4.1.1. Klonierung der SAF-Box in eukaryotische Expressionsvektoren	46
4.1.2. Einführung von Punktmutationen in N45rot	48
4.1.3. Subzelluläre Lokalisation der mutierten SAF-Box-Proteine	49
4.1.4. Analyse der potentiellen zweiteiligen NLS	52

4.1.5. Überprüfung der Funktionalität der putativen NLS in SAF-A	54
4.1.6. Analyse verkürzter aminoterminaler SAF-A-Konstrukte	56
4.1.7. Bindung mutierten SAF-Box-Proteine an mitotische Chromosomen	58
4.1.8. Protein-Chromatin-Bindungsassay	60
4.1.9. Chromatinfractionierung einiger ausgewählter SAF-Box-Mutanten	62
4.1.10. Mobilitätsmessung <i>in vivo</i>	64
4.2. Auswirkung einer Punktmutation in Gesamt-SAF-A	66
4.2.1. Klonierung und Analyse der Mutante SAFG29A	67
4.2.2. Einfluss der SAF-Box auf die Mobilität des SAF-A	69
4.2.3. Zellfraktionierung SAFG29A transfizierter Zellen	71
4.2.4. Vergleich der Expression von SAFG29A in transient und stabil transfizierten HEK 293-Zellen	73
4.2.5. Auswirkung der SAFG29A-Expression auf die Replikation	75
4.3. Charakterisierung funktionaler Bereiche im Carboxyterminus von SAF-A	77
4.3.1 Lokalisierung und Charakterisierung der Multimerisierungsdomäne von SAF-A	77
4.3.1.1. Lokalisierung der Multimerisierungsdomäne	77
4.3.1.2. Vergleich der Lokalisationsmuster von hnRNP-C1/C2 und C280	79
4.3.1.3. RNA-Abhängigkeit der C280/SAF-A-Wechselwirkung	81
4.3.1.4. Eingrenzung der SAF-A Multimerisierungsdomäne	83
4.3.2. Differenzierung der Kernmatrix-Bindedomäne von der Multimerisierungs- domäne des hSAF-A	85
4.3.2.1. Chromatinfractionierung C280	85
4.3.2.2. Zellfraktionierung C84 transfizierter Zellen	87
4.3.2.3. FRAP-Analysen der carboxyterminalen Teilbereiche des SAF-A	88
5. Diskussion	92
5.1. Sequenzanalyse der konservierten DNA-bindenden Domäne des SAF-A	94
5.1.1. Die Kernlokalisierung des SAF-A	95
5.1.1.1. Analyse der potentiellen zweiteiligen NLS 2	95
5.1.1.2. NLS 1 ist das funktionelle Kernlokalisierungssignal des SAF-A	97
5.1.1.3 Unspezifische Kernlokalisierung durch NLS 2	98
5.1.2. Die konservierten Aminosäuren der SAF-Box sind notwendig für die DNA-Bindung des SAF-A	99
5.2. Auswirkungen einer defekten SAF-Box auf das Gesamt-SAF-A	102
5.2.1. Charakterisierung des SAFG29A	102
5.2.2. Die Expression des SAFG29A behindert Replikation und Zellproliferation	104

5.3. Identifizierung der Multimerisierungsdomäne des SAF- A	106
5.3.1. Die Multimerisierungsdomäne liegt im Carboxyterminus des SAF-A	106
5.3.2. Die Multimerisierung des SAF-A ist unabhängig von RNA	107
5.3.3. Die carboxyterminalen 84 Aminosäuren des SAF-A sind für die Multimerisierung ausreichend	108
5.4. SAF-A benötigt die Multimerisierung zur Kernmatrixbindung	109
5.5. Bedeutung dieser Ergebnisse für Gesamt-SAF-A	111
<u>6. Zusammenfassung</u>	<u>115</u>
<u>7. Literaturverzeichnis</u>	<u>116</u>

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
DIC	Differential Interferenz Kontrast
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy Nukleotid-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis[β -aminoethylether]-tetraacetat
EGFP	„Enhanced Green Fluorescent Protein“
FCS	Fötale Kälberserum
FRAP	„Fluorescence Recovery after Photobleaching“
g	Erdbeschleunigung
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
hnRNA	heterogene nukleäre Ribonukleinsäure
hnRNP	heterogene nukleäre Ribonukleoproteinkomplexe
HMW	„High Molecular Weight“
IP	Immunpräzipitation
kDa	Kilodalton
M	molar
MCS	„Multiple Cloning Site“
MRS	„MAR recognition signature“
NLS	Kernlokalisationssequenz
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEI	Polyethylenimin
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-2-Ethansulfonsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
ROI	„Region Of Interest“
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SAF-A	„Scaffold Attachment Factor A“
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN	Über Nacht
ÜS	Überstand
WT	Wildtyp
α	anti
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsvolumenprozent
% (w/w)	Gewichtsprozent

Abkürzungen für Aminosäuren und Nukleotide sind nach IUPAC-Standard angegeben.

Abbildung- und Tabellenverzeichnis

1. Abbildungsverzeichnis	Seite
Abb. 1: Schematische Darstellung des Proteinimports in den Zellkern	3
Abb. 2: Aufbau des Zellkerns	8
Abb. 3: Nukleäre Lokalisation des C280	10
Abb. 4. Modellvorstellung der Organisation des Genoms	11
Abb. 5: Schematische Darstellung von SAF-A	14
Abb. 6: Aminosäuresequenzanalyse der SAF-Box	16
Abb. 7: Schematische Darstellung der gerichteten Klonierungen	26
Abb. 8: Darstellung der Primerorientierung und der Entstehung der BamHI -Schnittstelle	28
Abb. 9: Schematische Darstellung der Orientierung der Mutageneseprimer	29
Abb. 10: Auswahlkriterien für den Einzelzellsort mit DsRed fusionierten Proteinen	36
Abb. 11: Schematische Darstellung einer Zellfraktionierung	37
Abb. 12: Beispiel für die Auswertung von Zellen mit dem Programm ImageJ	44
Abb. 13: Diagramm ausgewerteter FRAP-Daten	45
Abb. 14: Klonierung und Expression von N45rot und N45grün	47
Abb. 15: Punktmutationen in N45rot	48
Abb. 16: Typische Lokalisation der mutierten SAF-Box-Proteine	50
Abb. 17: Typische Lokalisation aller mutierter SAF-Box-Proteine	51
Abb. 18: Untersuchung der Mutante N45 Δ aa21-24	53
Abb. 19: Untersuchung der Δ NLS-Mutanten	55
Abb. 20: Verkürzte aminoternale SAF-A-Konstrukte	56
Abb. 21: Fluoreszenzaufnahmen aminoterminaler SAF-A-Konstrukte	57
Abb. 22: Bindung der mutierten SAF-Box-Proteine an mitotische Chromosomen	59
Abb. 23: Chromatin-Protein-Bindungsassay mutierter SAF-Box-Proteine	61
Abb. 24: Chromatinfractionierung	63
Abb. 25: FRAP-Analysen mutierter SAF-Box-Proteine	64
Abb. 26: Auswertung der FRAP-Daten mutierter SAF-Box-Proteine	65
Abb. 27: Typische Lokalisation des SAFG29A in HEK 293-Zellen	68
Abb. 28: Rückstrom der Proteine nach Bleichen einer definierten Region	69
Abb. 29: Auswirkungen der DNA-Bindung auf die Mobilität von SAF-A	70
Abb. 30: Langzeitmessung des Rückstroms geblichener SAF-A und SAFG29A-Proteine	71
Abb. 31: Zellfraktionierung von SAFG29A transfizierten HEK 293-Zellen	72
Abb. 32: Proteingehalt transient und stabil exprimierender HEK 293-Zellen	74

Abb. 33: Replikationsanalyse bei SAFG29A und SAF-A transfizierten Zellen	76
Abb. 34: Eingrenzung der SAF-A-Interaktionsdomäne (1)	78
Abb. 35: Eingrenzung der SAF-A-Interaktionsdomäne (2)	79
Abb. 36: Immunfärbung des hnRNP-C1/C2	80
Abb. 37: RNA-Abhängigkeit der C280/SAF-A-Wechselwirkung	82
Abb. 38: Eingrenzung der Multimerisierungsdomäne	84
Abb. 39: Chromatinfractionierung C280	86
Abb. 40: Kernfraktionierung von C84 transfizierten HEK 293-Zellen	88
Abb. 41: Rückstrom der Proteine nach Bleichen einer definierten Region	89
Abb. 42: <i>In vivo</i> Mobilität carboxyterminaler Teilproteine von SAF-A	90
Abb. 43: Interpretation der SAF-A Rückstromkurve	103

2. Tabellenverzeichnis

Seite

Tab. 1: Verwendete Mutageneseprimer	22
Tab. 2: Verwendete Deletionsprimer	22
Tab. 3: Primer zur gerichteten Klonierung	23
Tab. 4: Verwendete Vektoren	23
Tab. 5: Verwendete primäre Antikörper	23
Tab. 6: Verwendete sekundäre Antikörper	24
Tab. 7: Benutzte Materialien für die einzelnen Klonierungen 1	26
Tab. 8: Benutzte Materialien für die einzelnen Klonierungen 2	28
Tab. 9: Einstellungen zur Aufnahme konfokaler Bilder	41
Tab. 10: Einstellungen am konfokalen Mikroskop für FRAP-Experimente	43

1. Einleitung

1.1. Der Zellkern

Die eukaryotische Zelle ist strukturell und funktionell in distinkte Reaktionsräume unterteilt. Das befähigt sie dazu eine Vielzahl gleichzeitig ablaufender Stoffwechselprozesse durchzuführen. Im Zellkern, der genetischen Steuerzentrale eukaryotischer Zellen, finden viele essentielle Prozesse, wie die Expression der Gene, oder die Replikation, Reparatur und Rekombination der DNA statt. Die Abgrenzung des Zellkerns vom Cytoplasma schafft enorme Möglichkeiten zur Regulation dieser Prozesse, weshalb der Zellkern deutlich mehr darstellt als eine Schutzhülle für die Erbsubstanz. Der Zellkern wurde als erste intrazelluläre Struktur 1802 von Franz Bauer entdeckt und zog unter anderem wegen seines faszinierenden Verhaltens bei der Zellteilung viel Aufmerksamkeit auf sich. Das Aufkommen der Fluoreszenzmikroskopie in den 1980er Jahren, mit der Möglichkeit fluoreszierende Proteine in der lebenden Zelle zu beobachten, erweiterte neben den molekularbiologischen Untersuchungen das Wissen um Struktur und Funktionen des Zellkerns außerordentlich. In den folgenden Abschnitten wird im Kontext zur vorliegenden Arbeit auf einige Merkmale subnukleärer Strukturen des Zellkerns und auf den Molekültransport im und in den Zellkern eingegangen.

1.1.1. Die Kernhülle

Der Zellkern ist von der Kernhülle umgeben, die aus der inneren und der äußeren Membran gebildet wird. Zwischen den beiden Kernmembranen liegt der perinukleäre Raum, der in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) übergeht. Die äußere Membran setzt sich in der Membran des ER fort, während die innere Membran an der Kernlamina verankert ist. Die Stabilität der Membran ergibt sich auf der cytoplasmatischen Seite durch Intermediärfilamente, die den Zellkern beweglich im Zellinneren lagern. Die Kernlamina, ein Netzwerk aus filamentösen Proteinen, die Ähnlichkeiten mit den Intermediärfilamenten aufweisen, stabilisiert die innere Kernmembran. Je nach Zelltyp und Organismus sind bis zu fünf verschiedene Proteine, die Lamine, an der Ausbildung dieses polymorphen Netzwerkes beteiligt (Aebi et al., 1986). Die Lamina in Säugetierzellen besteht aus den Laminen A, B und C. Kernporenkomplexe, die in die Kernhülle eingelagert sind, erlauben den passiven und aktiven Transport von Makromolekülen aus dem und in das Cytoplasma (Görllich & Mattaj, 1996). Der Kernporenkomplex (Nuclear Pore Complex, NPC) ist ein

Multiproteinkomplex mit einem geschätzten Molekulargewicht von 125 MDa in Vertebraten (Reichelt et al., 1990; Akey & Radermacher, 1993) und setzt sich in Säugern aus 30-50 Proteinen zusammen. Eine menschliche Zelle verfügt in Abhängigkeit ihres Zellzyklusstatus im Durchschnitt über 2000-4000 Kernporen (Ribbeck & Görlich, 2001).

1.1.2. Proteinimport über die Kernmembran

Die Passage von Molekülen durch den Kernporenkomplex erfolgt prinzipiell auf zwei verschiedene Arten: Kleine Moleküle und Ionen können die Kernporen passiv durch Diffusion durchqueren. Makromoleküle, die größer als ~40 kDa sind, werden aktiv, vermittelt von Carrierproteinen durch den Kernporenkomplex transportiert (Rout et al., 2003). Der aktive Kernimport und Export von Proteinen wird durch bestimmte Aminosäuresequenzen vermittelt, dem Kernlokalisierungssignal (Nuclear Localisation Signal (NLS)) und dem Kernexportsignal (Nuclear Export Signal (NES)) (Romanello & Morandi, 2002). Für die Kernlokalisierungssignale wurden zwei klassische Typen (cNLS) definiert, die mit vergleichbarer Sequenz in einer Vielzahl von Kernproteinen vorkommen. Der klassische Vertreter des einteiligen Kernlokalisierungssignals wurde im großen Tumor-Antigen des Simian Virus (SV40) beschrieben (T-ag PKKKRKV) (Kalderon et al., 1984; Nigg, 1997) und besteht aus einem Aminosäureheptamer, das fünf basische Reste einschließt. Das zweite klassische Signal besteht aus zwei Gruppen basischer Aminosäuren, die durch einen Abschnitt von 10-12 Aminosäuren getrennt werden. Dabei ist die Sequenz dieser 10-12 Reste mutationstolerant, während die beiden Abschnitte basischer Aminosäuren absolut notwendig sind. Der Prototyp einer zweiteiligen NLS ist das Signal des Nucleoplasmin (KRPAATKKAGQAKKKK) (Dingwall et al., 1982; Robbins et al., 1991).

Die meisten bekannten Kernlokalisierungssignale werden von einem heterodimeren Import/Rezeptor-Komplex erkannt, der aus den beiden Proteinen Importin α und β besteht, die auch als Karyopherine bezeichnet werden (Makkerh et al., 1996; Weis, 1998; Rout et al., 2003). Importin α bindet an das Kernlokalisierungssignal eines Proteins, während Importin β den Kontakt des Importin α -Substrat-Komplex mit dem Kernporenkomplex vermittelt und die Translokation durch die Pore gewährleistet. Für diesen Transport werden zwei weitere lösliche Proteine benötigt, die GTPase Ran und der ‚Nuclear Transport Factor‘-2 (NTF2) (Görlich & Kutay, 1999).

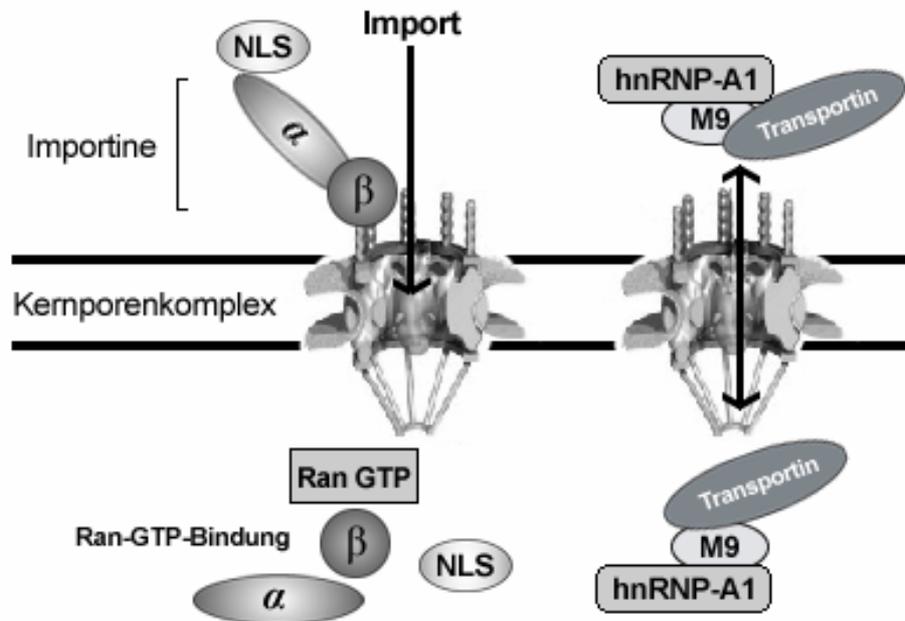


Abb. 1: Schematische Darstellung des Proteinimports in den Zellkern

Dargestellt werden zwei alternative Wege von Proteinen, in den Zellkern zu gelangen. Der Importinvermittelte Transport kommt bei den meisten Proteinen mit klassischen NLS-Typen vor und ist abhängig von der Ran-GTP/GDP-Verteilung. Ein alternativer Weg, die Kernlokalisierung des hnRNP-A1 über Transportin, wird auf der rechten Seite dargestellt. (nach: <http://www.georg-speyerhaus.de/Gruppen/agstauber/nctrans.jpg>)

Einmal im Kern, bewirkt die Bindung des Ran-GTP die Dissoziation des Importkomplexes und damit die Freisetzung des transportierten Proteins. Die Richtung des Kerntransportes wird gewährleistet durch die asymmetrische Verteilung der GDP- und GTP-gebundenen Ran-Formen, da sich die GTP-gebundene Ran-Form überwiegend im Zellkern befindet (Brownawell et al., 2001).

Aus den Daten der klassischen NLS-Typen wurde ursprünglich geschlossen, dass Kernlokalisierungssignale prinzipiell mit basischen Aminosäuren angereichert sind. In den vergangenen Jahren wurde diese Annahme entkräftet, da für mehrere Proteine Kernlokalisierungssignale identifiziert wurden, die wenig oder keine Ähnlichkeit mit den klassischen NLS-Typen aufweisen. Beim Kernlokalisierungssignal des Proto-Onkogens c-Myc sind nur drei der neun Aminosäuren basisch, flankierende Prolin- und Aspartat-Reste sind dagegen für den Kernimport unerlässlich (Dang & Lee, 1988). Ein ungewöhnliches Kernlokalisierungssignal aus vielen sauren Aminosäureresten ermöglicht den Transport der humanen DNA-Topoisomerase I in den Zellkern (Mo et al., 2000). Neben dem Vorkommen nicht-basischer Aminosäuren kann auch die Anzahl der Gruppen basischer Aminosäuren variieren: Für den Transkriptions-Aktivator PrnA wurde ein ungewöhnliches Signal identifiziert, bei dem drei Gruppen basischer Aminosäuren an

der spezifischen Kernlokalisierung beteiligt sind (Pokorska et al., 2000). Einige dieser Proteine werden wie Proteine mit klassischer NLS über Importin α/β in den Kern transportiert. Die ungewöhnlich Glycin-reiche M9 NLS des hnRNP-A1, wird statt von Importin α von Transportin (Karyopherin $\beta 2$) erkannt und nimmt damit einen alternativen Weg, um in den Zellkern zu gelangen (Romanelli & Morandi, 2002). Die Transportwege der Proteine in den Zellkern, sowie die daran beteiligten Proteine erscheinen beinahe so vielfältig wie die Kernlokalisierungssignale und sind noch nicht für alle Proteine aufgeklärt. Für einige der untypischen Kernlokalisierungssignale kann zusätzlich nicht ausgeschlossen werden, dass sie an Proteine binden, die eines der klassischen Signale besitzen und so in den Zellkern gelangen (Makkerh et al., 1996). Kernlokalisierungssignale sind mit 4-30 Aminosäuren zum Teil zu kurz, um eigenständige dreidimensionale Strukturen auszubilden, so dass sie höchstwahrscheinlich Abschnitte größerer Sequenzbereiche sind, die strukturelle oder globuläre Domänen ausbilden (La Casse & Lefebvre, 1995). Das Kernlokalisierungssignal liegt zumeist an der Oberfläche von Proteinen, damit es erkannt werden kann. Reguliert werden kann der Kernimport dann, wenn die NLS gezielt durch die Interaktion mit anderen Proteinen maskiert wird, wie im Falle des Transkriptionsfaktors NF κ B, um so den Kerntransport des Proteins zu verhindern (Arenzana-Seisdedos et al., 1997). Umgekehrt konnte bei DNA-Reparaturenzymen gezeigt werden, dass die carboxyterminale Dimerisierung der Proteine MLH1 und PMS2 erst die Erkennung der NLS ermöglicht, der ungebundene Carboxyterminus scheint die NLS zu maskieren (Wu et al., 2003). Statt einer Interaktion mit einem zweiten Protein kann der Kernimport auch durch Phosphorylierung reguliert werden, wie bei dem Transkriptionsfaktor AFX (Brownawell et al., 2001).

1.1.3. Dynamische Prozesse im Zellkern

Die enorme Masse an Proteinen, DNA und RNA im Zellkern ließen lange Zeit vermuten, dass der Zellkern hochviskos ist und die Proteine und Nukleinsäuren sich nur langsam darin fortbewegen können. Genauere Einsichten wurden erst mit Einführung fluoreszenzbasierter Beweglichkeitsmessungen möglich. In FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching)-Experimenten kann die Mobilität von fluoreszierenden Proteinen in lebenden Zellen ermittelt werden. Dazu werden fluoreszierende Moleküle in einem definierten Bereich der Zelle durch starke Lasereinstrahlung irreversibel geblichen und der Rückstrom nicht-geblicher Proteine wird über einen definierten Zeitraum festgehalten. Die ausgewerteten Daten geben Information über die Mobilität eines Proteins (mobile Fraktion, M_f) und die Zeit, die sie benötigen, um eine bestimmte Strecke

in einem definierten Raum zurückzulegen (Diffusionskonstante, D) (Lippincott-Schwartz et al., 2001). Zahlreiche Experimente der letzten Jahre mit GFP (Green Fluorescent Protein)-fusionierten Kernproteinen in ‚Photobleaching‘-Experimenten zeigten, dass viele von ihnen hochmobil sind und sich sehr schnell durch den Zellkern bewegen (Spector & Gasser, 2003).

Die Bewegung der Proteine im Zellkern erfolgt dabei überwiegend über einen passiven, diffusions-basierten Mechanismus, nicht wie früher vermutet über energieabhängigen, aktiven Transport (Dundr & Misteli, 2001). Eine hohe Mobilität im Zellkern ist eine Eigenschaft vieler Kernproteine, wie am Beispiel für bestimmte Transkriptionsfaktoren (McNally et al., 2000; Stenoien et al., 1999), Spleiß-Faktoren (Kruhlak et al., 2000; Phair & Misteli, 2000), rRNA-prozessierende Enzyme (Phair & Misteli, 2000), DNA-reparierende Enzyme (Houtsmuller et al., 1999), sowie Chromatin-bindende Proteine (Phair & Misteli, 2000; Lever et al., 2000; Misteli et al., 2000; Perche et al., 2000) gezeigt werden konnte. Die Diffusion von Proteinen im Zellkern ist dabei nur 4-5 mal geringer als die in wässriger Lösung (Sesek et al., 1997; Lang et al., 1986) und scheint nicht systematisch von der Größe der Moleküle abzuhängen, da bis zu einer Größe von 500 kDa keine Unterschiede in der Mobilität verschieden großer FITC-Ficoll- oder Dextran-Moleküle festgestellt werden konnten (Sesek et al., 1997).

Zur Untersuchungen der Mobilität des Chromatins *in vivo* wurden unter anderem GFP-fusioniertes Histon H2B benutzt, um Bewegungen des Chromatins sichtbar zu machen (Abney et al., 1997; Kanda et al., 1998). Fluoreszenzmikroskopische Langzeit-Messungen ergaben, dass Chromosomen und Chromatin im Vergleich zu Proteinen in Interphasekernen, abgesehen von Brownschen Molekularbewegungen, relativ immobil sind. Experimente mit fluoreszenzmarkierter, doppelsträngiger DNA (dsDNA) bestätigen diese Beobachtung: Im Cytoplasma unterliegen die mikroinjizierten Nukleinsäuren einer freien, größenabhängige Diffusion, werden aber nahezu immobil, sobald sie in den Zellkern transportiert werden (Lukacs et al., 2000; Mearini et al., 2004).

Mikroskopische *in vivo* Experimente fluoreszenzmarkierter RNA-Moleküle zeigten dagegen, dass RNA sehr schnell durch den Zellkern diffundiert (Politz et al., 1999). FRAP-Analysen zur Mobilität von mRNA in fluoreszenzmarkierten mRNP-Partikeln deuten allerdings darauf hin, dass deren Beweglichkeit sowohl auf freier Diffusion als auch auf energieabhängigen Prozessen beruht (Calapez et al., 2002).

Substrukturen im Zellkern wie der Nukleolus, Cajal-Bodies oder SCFs (Splicing-Factor-Compartments oder Speckles) können über mehrere Stunden beobachtet werden, ohne dass sie ihre Form verlieren. Diese strukturelle Integrität impliziert, dass es sich um stabile, inerte Kernkompartimente handelt. Werden aber in FRAP-Experimenten die

Komponenten dieser Substrukturen untersucht, zeigt sich, dass ein kontinuierlicher Austausch zwischen den Proteinen des Kernkompartiments und dem Nukleoplasma stattfindet (Dundr & Misteli, 2001). Der Fluss der Proteine dabei ist beachtlich, so konnte gezeigt werden, dass mehr als 100.000 Fibrillarin-Proteine pro Sekunde von 2-3 Nukleoli ins Nukleoplasma abgegeben werden (Phair & Misteli, 2000). Diese Beobachtungen verdeutlichen, dass Zellkompartimente weit davon entfernt sind, feste Strukturen darzustellen, im Gegenteil, sie unterliegen einem kontinuierlichen Austausch von Proteinen.

FRAP-Experimente haben gezeigt, dass viele Proteine eine geringere Mobilität aufweisen, als von ihrem Molekulargewicht zu erwarten gewesen wäre (Phair & Misteli, 2000; Pederson, 2000a; Shopland & Lawrence, 2000). Da sich herausstellte, dass biologisch inaktive Proteine 10-200 mal schneller sind als biologisch aktive gleicher Größe (Houtsmuller et al., 1999; Phair & Misteli, 2000; Kruhlak et al., 2000), ist die verringerte Mobilität der Proteine kaum auf eine räumliche Behinderung durch andere Zellkernbestandteile zurückzuführen. Der Grund dafür liegt vielmehr in der Ausübung ihrer biologischen Funktion, bei der sie an immobile Strukturen im Zellkern binden. So kann beispielsweise die transiente Bindung von Proteinen an Kernmatrixstrukturen die Mobilität dieser Proteinen deutlich senken (Shopland & Lawrence, 2000; Kruhlak et al., 2000). Einige Proteine, die an Chromatin binden, werden durch die Immobilität dieses Substrats ebenfalls verlangsamt oder statisch. FRAP-Experimente mit GFP-fusioniertem Histon H1 zeigten, dass H1 bereits nach vier Minuten wieder vollständig in den geblichenen Bereich zurückgekehrt ist, während das Core-Histon H2B einen leichten Rückfluss nach 30 Minuten oder länger zeigt, also wesentlich stabiler an Chromatin gebunden ist als das Linkerhiston (Lever et al., 2000). Am Beispiel von DNA-Reparatur-Enzymen wird der Zusammenhang zwischen Mobilität und Aktivität besonders deutlich. Ohne einen DNA-Schaden ist das Reparatur-Enzym ERCC1/XPF zu 100% mobil. Wird über UV-Bestrahlung ein DNA-Schaden indiziert, bindet das Enzym an DNA, ist für die Zeit seiner Aktion immobil, um danach wieder im Nukleoplasma für die nächste Aktion bereitzustehen (Houtsmuller et al., 1999). Ein ähnliches Verhalten konnte auch bei dem sequenzspezifisch an DNA bindenden Glukocorticoid-Rezeptor (GR) beobachtet werden. Obwohl biochemische Arbeiten prognostizierten, dass der Hormon-gebundene GR seine Ziel-DNA sehr stabil bindet, wurde über FRAP-Experimente festgestellt, dass der Komplex tatsächlich nur fünf Sekunden an der DNA verweilt. Dieses Verhalten wurde als ‚hit-and-run‘-Mechanismus bezeichnet, das heißt die Proteine binden nach Aktivierung an ihre Zielsequenz, verweilen aber nur wenige Sekunden, bevor sie wieder abdiffundieren und neue Rezeptoren binden (McNally et. al, 2000; Rigaud et al., 1991).

Durch fluoreszenzmikroskopische Methoden wie FRAP ist es möglich geworden, diese dynamischen Prozesse in lebenden Zellen zu beobachten, und über die Mobilität von Proteinen deren Wirkungsweise zu ergründen.

1.1.4. Der innere strukturelle Aufbau des Zellkerns

1.1.4.1. Substrukturen des Zellkerns

Der Zellkern ist mit einem Durchmesser von etwa 10 µm das größte lichtmikroskopisch sichtbare Organell der menschlichen Zelle. Präparativ lässt sich der Zellkern in zwei Fraktionen trennen: die lösliche Fraktion, das „Nukleoplasma“, und die unlösliche Fraktion, die aus der Kernmembran, der Kernlamina, der Kernmatrix und dem Chromatin besteht. Im Kerninneren können morphologisch distinkte Strukturen unterschieden werden. Diese Strukturen sind nicht durch Membranen abgegrenzt, werden aber wegen folgender Gründe trotzdem als Subkompartimente bezeichnet. Sie enthalten eine Anzahl bestimmter Proteine, sind im Licht- oder Elektronenmikroskop morphologisch von anderen Strukturen zu unterscheiden und einige von ihnen können durch eine biochemische Isolierung angereichert werden (Dundr & Misteli, 2001).

Die bestuntersuchten Kompartimente im Zellkern sind die Nukleoli, ‚Splicing-Factor-Compartments‘ (SCFs) und ‚Promyelocytic Leukaemia Oncoprotein‘ (PML)-bodies, sowie eine wachsende Familie kleiner runder Kernkörperchen. Der Nukleolus ist die auffälligste und größte Substruktur im Zellkern. Im Nukleolus findet vor allem das Prozessieren von prä-rRNAs statt, sowie die Ausbildung von Vorstufen der ribosomalen großen und kleinen Untereinheiten (Olson et al., 2000). Die SCFs scheinen eine Art Lagerstelle für spleißosomale Komponenten darzustellen (Houtsmuller & Vermeulen, 2001). PML-bodies sind kleine runde Domänen, die im gesamten Nukleoplasma verteilt sind und abhängig vom Zellzyklus in 10-30 Kopien vorliegen (Spector, 2001). Die genaue Funktion der PML-bodies ist nicht bekannt, sie werden aber mit transkriptioneller Regulation, terminaler Differenzierung, Speichermöglichkeiten, Wachstumskontrolle und Apoptose in Verbindung gebracht (Dundr & Misteli, 2001).

1.1.4.2. Organisation des Chromatins

Die DNA liegt im Zellkern in einem Komplex aus Protein und DNA vor, dem Chromatin. Die DNA wird dabei um die Histone H2A, H2B, H3 und H4 gewunden und bildet eine Faser mit einem Durchmesser von 10 nm. Durch die Bindung des Histon H1 wird die Faser weiter auf einen Durchmesser von 30 nm gestaucht. Der größte Teil des Chromatins liegt als 30 nm Faser vor (Finch & Klug, 1976; Graziano et al., 1994) und ist nach heutigen Vorstellungen in vielen tausend Schleifen organisiert (siehe Abb. 4). Nach Färbung mit bestimmten Farbstoffen kann man bei mikroskopischer Betrachtung des Zellkerns deutlich dunklere, am Rand des Kerns gelegene Bereiche (Heterochromatin) von helleren Bereichen (Euchromatin), in der Mitte des Kerns, unterscheiden. Diese Bereiche stellen unterschiedliche Packungsdichten des Chromatins dar und korrelieren mit der Aktivität der dort lokalisierten Gene. Die aktive Transkription von Genen findet hauptsächlich im Euchromatin statt. Eine nähere Beschreibung der Organisation der DNA in Interphasekernen war lange nicht möglich, bis über die Schädigung von Chromosomen durch Laserbestrahlung gezeigt werden konnte, dass Chromosomen definierte Bereiche des Zellkerns besetzen, die so genannten Chromosomen-Territorien (Cremer & Cremer, 2001).

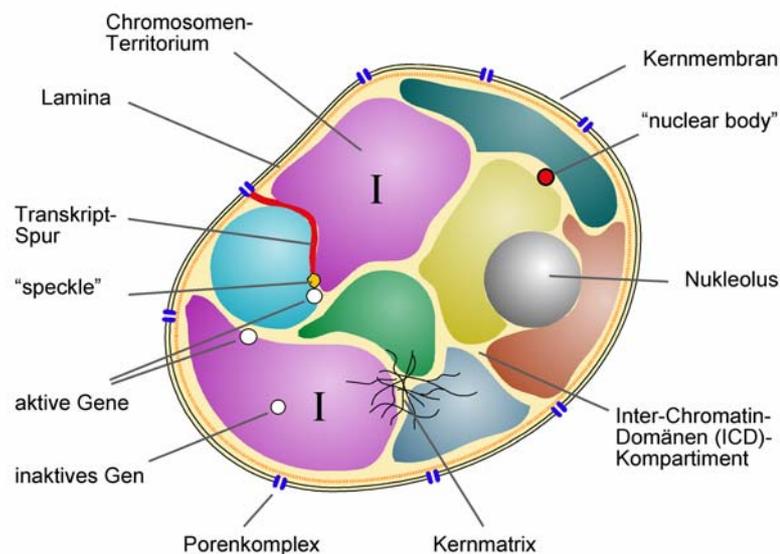


Abb. 2: Aufbau des Zellkerns

Der Zellkern ist ein mosaikartig zusammengesetztes Organell, das durch eine Kernhülle vom Cytoplasma abgetrennt ist. Im Inneren ist der Zellkern in zahlreiche strukturell und funktionell getrennte Bereiche (Kompartimente) unterteilt. Die größten Strukturen sind die Chromosomen-Territorien (hier als verschiedenfarbige „Inseln“ dargestellt), die durch einen chromatinfreien Bereich voneinander getrennt sind. In diesem als Inter-Chromatindomänen-Kompartiment (ICD) bezeichneten Bereich sind zahlreiche funktionelle „Kernkörperchen“ (nuclear bodies) eingebettet, an denen die meisten Reaktionen der Gen-Expression, der RNA-Reifung und der Genom-Replikation ablaufen (aus Fackelmayer, 2000).

Dabei nimmt jedes Chromosom ein dem DNA-Gehalt entsprechendes definiertes Territorium ein, das sich nicht mit anderen Chromosomen-Territorien überschneidet (Lichter et al., 1988). Auch wenn die Position der Chromosomen-Territorien von Zelle zu Zelle unterschiedlich sein kann, scheinen sie nicht willkürlich im Zellkern verteilt zu sein. Vielmehr konnte mittels FISH (Fluoreszenz In Situ Hybridisierung)-Experimenten gezeigt werden, dass Chromosomen mit einer hohen Zahl stillgelegter Gene bevorzugt am Zellkernrand liegen, während Chromosomen mit vielen aktiven Genen eher in der Kernmitte lokalisieren (Croft et al., 1999). Innerhalb eines Chromosomen-Territoriums beschränkt sich die Lokalisation aktiver Gene nicht wie bislang vermutet auf den Rand des Territoriums (Kurz et al., 1996; Cremer & Cremer, 2001), denn auch im Inneren dieser Bereiche konnten aktive Genloci nachgewiesen werden (Mahy et al., 2002). Die Chromosomen-Territorien setzen sich aus einer Vielzahl kleiner Einheiten zusammen, die als subchromosomale Foci bezeichnet werden. Eine Vermutung ist, dass diese Foci Orte der Gen-Expression und DNA-Replikation darstellen (Fackelmayer, 2000).

Die einzelnen Chromosomen-Territorien werden durch einen DNA-freien Raum voneinander getrennt. Dieser Raum wird als Inter-Chromatin-Domänen-Kompartiment (ICD-Kompartiment) bezeichnet und kann durch die Überexpression von Vimentin zwischen den Chromosomen-Territorien sichtbar gemacht werden (Bridger et al., 1998).

1.1.4.3. Die Kernmatrix

Die räumliche Trennung der einzelnen Subkompartimente des Zellkerns wird möglicherweise durch die Anheftung an eine größere Struktur bewirkt. Schon in den 1940er Jahren wurde ein Proteinnetzwerk beschrieben, das nach DNA-Extraktion und Entfernung löslicher Proteine aus Zellkernen auf Deckgläsern verbleibt (Zbarskii & Debov, 1948). Die extrahierbare Proteinsubstanz wurde als Kernmatrix (nuclear matrix) bezeichnet (Berezney & Coffey, 1974) und es wurde vermutet, dass sie die Basis für die räumliche Organisation von DNA und den ablaufenden Prozessen im Zellkern bildet. Hinweise, hauptsächlich von *in vitro* Experimenten, deuten auf eine Beteiligung der Kernmatrix bei der Replikation, RNA-Synthese und Prozessierung, Verankerung von Chromatinschleifen, Regulation der Genexpression und anderen Funktionen hin (Berezney, 1991).

Bei der klassischen *in situ* Kernmatrixpräparation werden Zellkerne zunächst mit einer DNA-spezifischen Endonuklease (DNase I) inkubiert, um das Chromatin zu entfernen, bevor mit 2 M NaCl ein Großteil der Proteine extrahiert wird. Die Kernmatrix besteht zu 98% aus Proteinen und setzt sich strukturell aus der Lamina mit den integrierten

Kernporenkomplexen, Teilen der Nukleoli sowie einem dreidimensionalen Netzwerk aus unterschiedlich dicken Fasern zusammen. Präpariert man die Kernmatrix unter schonenden Bedingungen ohne abschließende Hochsalzextraktion, so beobachtet man 20-50 nm dicke polymorphe Fasern, an denen Proteinkomplexe angelagert sind (He et al., 1990). In weiteren biochemischen Schritten können diese Proteinkomplexe von der Präparation abgelöst werden, es bleiben Fasern mit einem Durchmesser von 2-3 nm, die Proteine und hnRNA enthalten. Die Bedeutung der RNA für die Struktur des Fasergeflechts wurde nach einem RNase-Verdau deutlich; schon geringe Mengen RNase führten dazu, dass das Fasergeflecht komplett kollabiert (Ma et al., 1999). Die Proteinzusammensetzung der Kernmatrix hängt sehr stark von der Präparationsmethode ab (Cook, 1988). Es ist gesichert, dass Lamine die Hauptkomponente der perinukleären Kernmatrix darstellen. Dagegen ist die Proteinzusammensetzung der intranukleären Kernmatrix heterogen, wobei den Ribonukleotidproteinen eine wichtige Rolle zugeschrieben wird (Fey et al., 1986). Die Existenz einer Kernmatrix *in vivo* wird kontrovers diskutiert (Peterson, 2000 b; Hancock, 2000). Die Möglichkeit der Artefaktbildung bei den recht harschen Bedingungen zur Isolierung von Kernmatrixstrukturen *in vitro* ist dabei einer der Hauptkritikpunkte. Eine Forderung, die Kritiker an die Kernmatrixforscher stellen, ist die Visualisierung der Kernmatrix in lebenden Zellen.

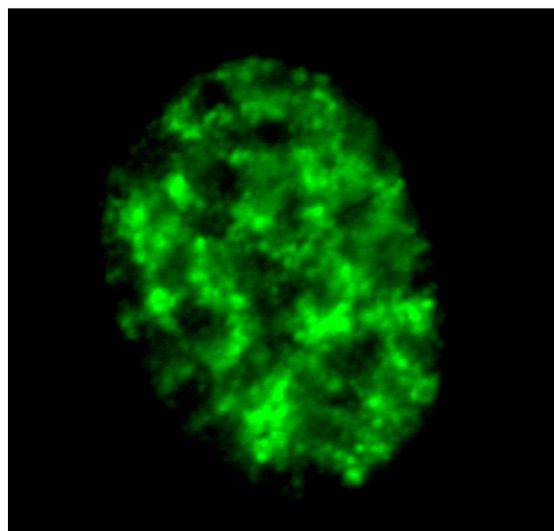


Abb. 3: Nukleäre Lokalisation des C280

Dargestellt ist die Lokalisation des C280/GFP in unextrahierten HEK 293-Zellen. Die carboxyterminalen 280 Aminosäuren des Kernmatrixproteins SAF-A vermitteln höchstwahrscheinlich die Assoziation des Proteins mit Kernmatrixstrukturen.

Für das carboxyterminale Teilkonstrukt (C280/GFP) des Kernmatrix-assoziierten, SAR/MAR-bindenden Proteins SAF-A, konnte eine dreidimensionale, schwammartige Struktur in lebenden, unbehandelten Zellen beobachtet werden (Hermann, 2002).

Auch neue Untersuchungsmethoden, die die Mobilität von Proteinen in der lebenden Zelle bestimmen, widersprechen der Existenz einer Kerngerüststruktur nicht, obwohl Proteine und RNA mobiler sind, als vermutet wurde. Die Diffusionsgeschwindigkeit von Proteinen im Zellkern ist dennoch 4-5 mal geringer als in wässriger Lösung (Sesek et al., 1997). Zudem scheint die Kernmatrix kein starres Gebilde zu sein, sondern stellt vermutlich eher eine dynamische Struktur dar, die mit den SAR/MAR-Elementen auf der DNA über verschiedene SAR/MAR-bindende Proteine wechselwirkt.

1.1.5. SAR/MAR-DNA

Eine Verbindung zwischen Chromatin und dem Kerngerüst scheint über kurze AT-reiche DNA-Abschnitte stattzufinden, die in allen eukaryotischen Organismen gefunden werden konnten. Es wird angenommen, dass sie das Genom in definierte, topologische, voneinander unabhängige Schleifen unterschiedlicher Größen einteilen (Laemmli et al., 1992). Diese DNA-Bereiche, die als Anheftungsstelle des Chromatins an die Kernmatrix dienen, werden je nach Isolierungsmethode als SARs (Scaffold Attachment Regions) oder MARs (Matrix Associated Regions) bezeichnet.

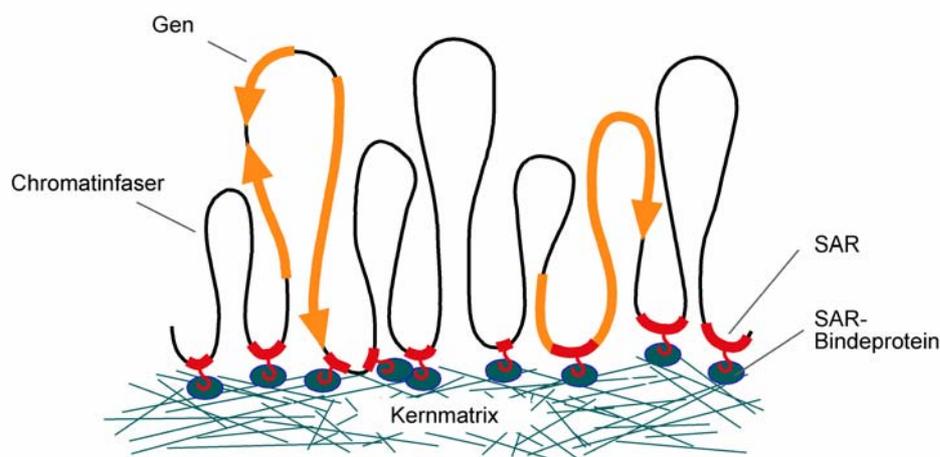


Abb. 4: Modellvorstellung der Organisation des Genoms

Dieses Modell geht davon aus, dass das Chromatin in Form von Schleifen organisiert ist, die an der Basis über spezifische DNA-Elemente, die SAR/MAR-Regionen verbunden sind. Diese Bindung wird in diesem Modell über SAR-Bindeproteine vermittelt. Dadurch bildet jede Schleife eine unabhängige funktionelle Einheit oder Domäne (aus Fackelmayer, 2000).

SAR/MAR-Elemente kommen im Genom in Einzelkopien vor und liegen meist außerhalb Protein-kodierender Bereiche. Häufig flankieren SAR/MAR-Elemente transkribierte Gene oder Gengruppen und liegen in der Nähe von regulatorischen Sequenzen wie Enhancer-Elementen oder Promotoren (Gasser & Lämml, 1986; Blasquez et al., 1989). Auch in Introns und zwischen transkribierten Genen konnten SAR/MAR-Elemente gefunden werden (Garrard, 1990). SAR/MAR-Elemente sind ausgesprochen AT-reich und weisen längere ununterbrochene Oligo-(dA)- oder Oligo-(dT)-Folgen (A-Tracts) auf. Ein Vergleich der SAR/MAR-Elemente zeigte, dass die Erkennung von den Elementen durch ihre Bindepartner nicht von einer Konsensussequenz vermittelt wird, die in allen SAR/MARs vorkommt. Allerdings konnte eine SAR/MAR-Erkennungssignatur (MRS) identifiziert werden, die in 80% aller bekannten SAR/MARs vorhanden ist. Sie besteht aus zwei kurzen, dicht hintereinander liegenden DNA-Sequenzen (8 und 16 bp lang) (van Drunen et al., 1999). Da diese Sequenz nicht in allen SAR/MARs nachgewiesen werden konnte, geht man davon aus, dass es zwei Gruppen SAR/MARs gibt, mit und ohne MRS. Neue Untersuchungen zeigen, dass nicht alle SAR/MARs, die stabil in Zellen transfiziert wurden, als Verankerung an der Kernmatrix verwendet wurden, obwohl die SAR/MARs identische Sequenzen aufwiesen. Die selektive Auswahl bestimmter SAR/MARs deutet darauf hin, dass in den Zellen ein regulatorisches System besteht, welches über die Verwendung der SAR/MAR-Elemente und damit über die Chromatinstruktur entscheidet (Heng et al., 2004). Die Größe der SAR/MAR-Elemente von 200-3000 bp könnte auf die Notwendigkeit einer kooperativen Interaktion zwischen SAR/MARs und deren vermeintlicher Bindeproteine im Kerngerüst hinweisen (Fackelmayer, 2000).

Die genauen Funktionen der Elemente sind im Einzelnen noch nicht geklärt, es gibt jedoch Hinweise auf eine Beteiligung von SAR/MAR-Elementen bei der Replikation des Genoms, der DNA-Reparatur und der Rekombination. Die artenüberschreitende Erkennung der SAR/MAR-Elemente zeigt die wichtige, strukturelle Funktion der Elemente für die eukaryotische Zelle.

1.1.6. SAR/MAR-bindende Proteine

SAR/MAR-Elemente werden über spezifische SAR/MAR-Bindeproteine an der Kernmatrix verankert. Um die Funktion der SAR/MAR-Elemente an der Kernmatrix *in vivo* besser zu verstehen, wurden einige dieser Proteine identifiziert und charakterisiert. Dazu gehören prominente, ubiquitäre Proteine wie Topoisomerase II, die

Torsionsspannungen aus DNA entfernen kann und Histon H1, das an der Verpackung der DNA zu Chromatin beteiligt ist. Beide Proteine besitzen sowohl eine allgemeine DNA-Bindfähigkeit wie auch eine spezifische Bindung an SAR/MAR-Elemente (Adachi et al., 1989; Izaurralde et al., 1989; Käs et al., 1989). Für Lamin B1 konnte gezeigt werden, dass es die Bindung von SAR/MAR-Elementen an den Lamina-Porenkomplex vermitteln kann (Luderus et al., 1992). Des Weiteren wurden die ubiquitären Proteine HMGI/Y und Nucleolin als SAR/MAR-bindende Proteine identifiziert (Zhao et al., 1993; Dickson & Kohwi-Shigematsu, 1995). Nach einer Modellvorstellung von Laemmli und Mitarbeitern (Zhao et al., 1993) bestimmt Histon H1 zusammen mit HMGI/Y den Zustand einer Chromatindomäne. Neben diesen ubiquitären Proteinen wurden auch die zelltypspezifisch exprimierenden Proteine SATB1 und p114 (Dickinson et al., 1992; Yanagisawa et al., 1996; Nakagomi et al., 1994) als SAR/MAR-bindende Proteine identifiziert.

Zwei weitere Proteine, die spezifisch an SAR/MAR-Elemente binden können, wurden in früheren Arbeiten dieses Labors charakterisiert. SAF-A/hnRNP-U (Fackelmayer et al., 1994a und b; Kiledjian & Dreyfuss, 1992) und SAF-B (Renz & Fackelmayer, 1996) binden über eine konservierte DNA-Bindedomäne an SAR/MAR-DNA (Kipp et al., 2000). Die beiden Proteine sind, abgesehen von ihrer praktisch identischen DNA-bindenden Domäne, nicht miteinander verwandt, spielen jedoch beide eine Rolle bei der Zellkernarchitektur und bei der Prozessierung der RNA.

1.2. Scaffold Attachment factor A (SAF-A)

1.2.1. Identifizierung und Lokalisation des SAF-A

SAF-A ist ein SAR/MAR/DNA-bindendes Kernprotein, das in verschiedenen Wirbeltieren wie Mensch, Rind, Frosch und in verschiedenen Geweben der Maus identifiziert werden konnte (Romig et al., 1992). Ein Sequenzvergleich der cDNA von SAF-A (Fackelmayer & Richter, 1994a) zeigte, dass es mit hnRNP-U identisch ist. HnRNP-U wurde mit Hilfe immunologischer und biochemischer Techniken als eine Komponente von hnRNP-Komplexen identifiziert (Choi & Dreyfuss, 1984). HnRNP-Komplexe setzen sich aus mindestens 20 verschiedenen Proteinen zusammen, die gemeinsam an heterogene nukleäre RNA (hnRNA) binden, und scheinen die Struktur der hnRNA zu beeinflussen und dadurch an der prä-mRNA-Prozessierung beteiligt zu sein (Dreyfuss, 1986; Dreyfuss et al., 1988). Die molekularen Massen der hnRNPs variieren zwischen 34 kDa

(hnRNP-A1) und 120 kDa (SAF-A) (Choi & Dreyfuss, 1984; Pinol-Roma et al., 1988). Ein Zellkern enthält durchschnittlich 2 Millionen SAF-A-Moleküle (Göhring & Fackelmayer et al., 1997), wobei zwei Isoformen des Proteins identifiziert werden konnten. Beide weisen das gleiche RNA- und DNA-Bindevverhalten auf, komplexieren aber in unterschiedlich großen und geformten Aggregaten (Fackelmayer & Richter, 1994b). SAF-A ist ausschließlich im Zellkern lokalisiert. In Fraktionierungsexperimenten von Zellkernen konnte gezeigt werden, dass 50% des gesamten SAF-A fest und salzstabil an Kerngerüststrukturen gebunden sind (Fackelmayer et al., 1994; Mattern et al., 1996). Die restlichen 50% des Proteins sind zu gleichen Teilen verteilt auf eine lösliche, eventuell RNA-gebundene Population, und eine Population, die durch DNase I-Behandlung extrahiert werden kann (Fackelmayer et al., 1994).

1.2.2. Domänenstruktur des humanen SAF-A

SAF-A ist ein 824 Aminosäuren großes Protein, das in definierte Bereiche mit unterschiedlichen Aminosäurezusammensetzungen eingeteilt werden kann. Der aminoterminal Bereich ist reich an den sauren Aminosäureresten Asparaginsäure und Glutaminsäure. Innerhalb dieses Abschnittes konnte der DNA-bindende Bereich von SAF-A auf die aminoterminalen 45 Aminosäuren eingegrenzt werden (Göhring et al., 1997b; Kipp et al., 2000). Elektrisch neutral und Sequenz-unauffällig ist der mittlere Teil des Proteins, wogegen der Carboxyterminus viele basische Aminosäuren enthält. Für die carboxyterminalen 210 Aminosäuren von SAF-A konnte die Assoziation mit Kernmatrixstrukturen nachgewiesen werden (Herrmann, 2002). Ebenfalls im Carboxyterminus lokalisiert ist die RNA-Bindedomäne, die so genannte RGG-Box (Kiledijan & Dreyfuss, 1992).

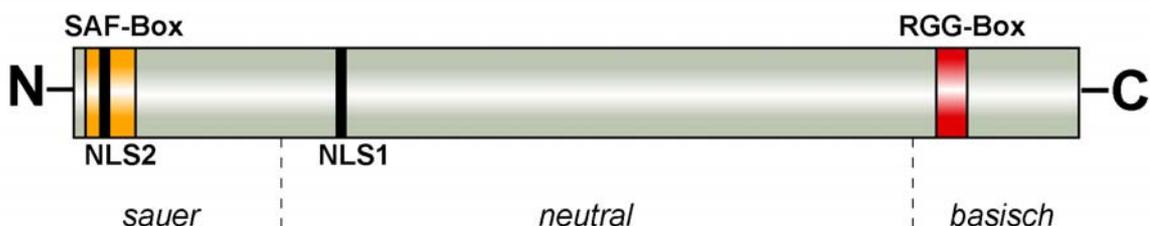


Abb. 5: Schematische Darstellung von SAF-A

Die aminoterminal SAF-Box (gelb) vermittelt SAR/MAR-spezifische DNA-Bindung. Mit der im Carboxyterminus zwischen den Aminosäuren 714-738 lokalisierten RGG-Box (rot) bindet SAF-A an RNA. Der aminoterminal Bereich ist reich an sauren Aminosäuren, der carboxyterminale ist auf 129 Aminosäuren reich an Glycin. Zwei potentielle Kernlokalisierungssignale (NLS 1 und 2) werden als schwarze Balken angegeben.

Sie konnte in ähnlicher Form in anderen RNA-bindenden Proteinen, wie Nucleolin, Fibrillarin, SSB-1 und dem SAF-A verwandten Protein E1B-AP5, nachgewiesen werden (Jong et al., 1987; Aris & Blobel, 1991; Gabler et al., 1998).

Aus der Aminosäuresequenz des SAF-A konnten zwei potentielle Kernlokalisierungssignale vorhergesagt werden. NLS 1 ($_{241}\text{KKRGVKRPR}_{249}$), ein potentielles neun Aminosäuren langes Signal, liegt im aminoterminalen Drittel des SAF-A (Kiledjian & Dreyfuss, 1992). Während dieser Arbeit durchgeführte Datenbankrecherchen mit NLS-Suchprogrammen wie Prosite fanden dieses Signal nicht, konnten aber im Bereich der SAF-Box ein zweites, zweiteiliges Kernlokalisierungssignal ($_{9}\text{KKLKVSELKEELKKRR}_{24}$) vorhersagen, das in dieser Arbeit als NLS 2 bezeichnet wird (Abb. 6b). Neben dem Vorhandensein der DNA- und RNA-bindenden Domäne mehren sich Hinweise auf eine Protein-Interaktions-Domäne, da verschiedene Proteine als Interaktionspartner des SAF-A identifiziert werden konnten (Eggert et al., 1997, 2001; Martens et al., 2002; Kim & Nikodem, 1999; Taniura & Yoshikawa, 2002; Davis et al., 2002). Ob SAF-A eine definierte Protein-bindende Domäne besitzt, oder mehrere Abschnitte des Proteins an unterschiedlichen Interaktionen beteiligt sind, ist noch unklar.

1.2.3. Die SAF-Box und der DNA-Bindungsmodus von hSAF-A

SAF-A bindet *in vitro* mit hoher Spezifität an SAR/MAR-DNA (Fackelmayer et al. 1994; Romig et al., 1992). Um die DNA-Bindung des SAF-A *in vivo* nachzuweisen, wurden ‚crosslink‘-Experimente durchgeführt, bei denen gezeigt werden konnte, dass durch Formaldehydbehandlung ungefähr 20% des SAF-A im Zellkern an DNA gebunden vorliegen (Fackelmayer et al., 1994a; Göhring & Fackelmayer, 1997). Erste Hinweise auf das Vorhandensein einer DNA-bindenden Domäne im aminoterminalen Drittel des SAF-A führten zu deren Eingrenzung und biochemischen Charakterisierung. Dabei stellte sich heraus, dass eine 31 Aminosäuren große Region in den aminoterminalen 45 Aminosäuren des SAF-A die DNA-Bindung vermittelt. Es handelt sich hierbei um eine eigenständige Proteindomäne, wie durch Versuche mit einem synthetischen Peptid dieses Proteinabschnittes gezeigt werden konnte: Das identische SAR-Bindevverhalten des Peptids mit dem des Wildtyp-Protein in DNA-Bindungsassays zeigte, dass es sich spontan in die aktive Konformation faltet (Kipp et al., 2000).

Datenbankvergleiche zeigten, dass ein Protein-Motiv homolog zu den 31 Aminosäuren im Aminoterminus des SAF-A in vielen eukaryotischen Proteinen vorhanden ist. Da dieses Motiv in SAF-A und SAF-B identifiziert werden konnte, wurde es SAF-Box genannt (Kipp et al., 2000). Zu Beginn dieser Arbeit wurde ein

Aminosäuresequenzvergleich humaner SAF-Boxen erstellt. In Abb. 6a ist ein erweitertes Alignment von 15 humanen Proteinen dargestellt, die homologe Bereiche zur SAF-Box von SAF-A aufweisen. Zwei hochkonservierte Leucin-Reste sind innerhalb dieser Domäne zu finden, ebenso wie ein zu 94% konservierter Glycin- und Lysinrest.

a)

```

hsSAF-A Q00839      PVNVKKLKVSELKEELKKRRLSDKGLKAELMERLQAALDDE
hsE1B-AP5NP653335 .MDVRRLKVNELREELQRRGLDTRGLKTELAERLQAALAEAE
hsMYCD Q8IZQ8      ...LDDLKVSELRQQLRIRRGLPVSGTKTALMDRLRPF....
hsSFB2 Q14151      ...LSELRVDILRAELKKRNLDTGCNKSVLMERL.....
hsMRTB Q9ULH7      ...LDDLKVSELKTELKLRGLPVSGTKPDLIERLKPYQ...
hsAcin Q9UKV3      ...LQALRVTDLKAALEQRLAKSCQKSALVKRLKGAL...
hsSAF-B Q15424     TRRLSDLRVDILRADVRKRNVDSSCNKSVLMERLKKAIED.
hsHcc-1 P82979     TVELHKLKLAELKQECLARGLETKGIKQDLIHRLQAYLEEH
hsMRTA Q969v6      ...LDDMKVAELKQELKLRSLPVSGTKTELIERLRAYQ...
hsRA18 Q9NS91      ...YNLSDRDLKKKLKEHGLSIQGNKQLIKRHQEFV...
hsPIAG Q8N2W9      ...VMSFRVSDLQMLLGFVGRSKSGLKHELVTRALQLV...
hsS3B2 Q13435     ...MAPGAAQELQAKLAEIGAPIQCNREELVERLQSYT...
hsPIA1 O75925     ...VMSLRVSELQVLLGYAGRNKHGRKHELLTKALHLL...
hsPIA3 Q9Y6x2     ...VMSFRVSELQVLLGFAGRNKSGRKHELLAKALHLL...
hsKU70 P12956     ...LGKFTVPMLKEACRAYGLKSGLKKQELLEALTKHF...
  
```

Consensus SAF-BoxlkV.eL^k.l..R.L...G.K..L..RL..a....
 (Kipp et al, 2000)

Vergleich Alignment/

Consensus SAF-Boxv.^BL.....G.K..L..R.....

b)

N45 AS-Sequenz: MSSSPVNV**KKL**KV**SEL**KEEL**KKRR**LSDKGLKAE**L**MER**L**QAA

zweiteilige NLS in N45: **KKLKVSELKEELKKRR**

Scan Prosite

(PS00015)

Abb. 6: Aminosäuresequenzanalyse der SAF-Box

a) Aminosäuresequenzvergleich humaner SAF-Boxen: Dargestellt sind SAF-Boxen von 15 humanen Proteinen (Prosite search SAP-Domäne und Proteinblast SAF-Box) die mit der Konsensussequenz für SAF-Boxen (Kipp et al., 2000) verglichen werden. Hochkonservierte Aminosäuren sind dunkel unterlegt, Aminosäurepositionen, die bei vielen Proteinen übereinstimmen sind grau unterlegt, Aminosäuren mit gleichen funktionellen Seitenketten sind fett gedruckt. In den Konsensussequenzen bezeichnen Großbuchstaben eine 90-100%ige Konservierung, Kleinbuchstaben eine auffällige Häufigkeit.

b) Potentielles Kernlokalisierungssignal in der SAF-Box: Die Suche nach einem Kernlokalisierungssignal in der Aminosäuresequenz des hSAF-A mit dem Programm Scan Prosite führte zur Identifizierung eines potentiellen, zweiteiligen Signals (NLS 2) (unten) innerhalb der aminoterminalen 45 Aminosäuren des SAF-A (oben). Die Aminosäuren, die an der Kernlokalisierung beteiligt sein könnten sind fett unterlegt.

Neben diesen konservierten Aminosäurepositionen findet man bei den verschiedenen Proteinen Positionen mit unterschiedlichen Aminosäuren, die aber gleiche Gruppen an ihren Seitenketten aufweisen (z.B. Glutaminsäure oder Asparaginsäure). Die SAF-Box weist signifikante Homologien zu Helix 1 und 2 der Homeobox auf, und alle Reste der Konsensussequenz der Homeobox sind mit denen der SAF-Box vergleichbar. Helix 3, die in allen bekannten Homeoboxen vorkommt und für die spezifische DNA-Bindung verantwortlich ist, fehlt bei der SAF-Box (Kipp et al., 2000).

Die Bindung von humanem SAF-A an DNA ist verbunden mit einer Selbst-Organisation des Proteins in filamentöse Multimere (Fackelmayer & Richter, 1994). Unter keinen experimentellen Bedingungen konnte eine DNA-Bindung des SAF-A beobachtet werden, ohne dass eine Multimerisierung des SAF-A stattfindet. Die Identifizierung der SAF-Box und die Möglichkeit, die verkürzten SAF-A-Bereiche an Festphasen zu koppeln, um die nötige Selbstorganisation des Proteins nachzuahmen, ermöglicht die genauere Untersuchung der DNA-Bindung. In diesen Experimenten konnte die eindeutige Bevorzugung von SAR-DNA vor nicht SAR-DNA nachgewiesen werden. Weitere DNA-Bindungs-Experimente ließen Rückschlüsse auf den DNA-Bindemechanismus zu. Für die spezifische und stabile Bindung des SAF-A an DNA müssen zwei Voraussetzungen erfüllt sein: Zum einen werden bestimmte kurze Sequenzabschnitte, vier oder mehr Adeninreste (A-Tracts) von der SAF-Box gebunden. Die Interaktion einer SAF-Box mit DNA ist jedoch so schwach, dass sie kaum nachgewiesen werden kann. Der zweite Effekt, die Multimerisierung von SAF-A, koppelt viele SAF-Boxen aneinander, so dass die SAF-A-Multimere mit einer hohen Spezifität und Stabilität an ein DNA-Stück binden. Dieser ungewöhnliche DNA-Bindungs-Mechanismus wird Massenbindung genannt (Zuckerandl & Villet, 1988). Die Länge und Sequenz der DNA spielt dabei eine wichtige Rolle. Erst das Vorhandensein von mindestens 5 ‚A-Tracts‘ in einer Sequenz von 200 oder mehr Basenpaaren führt, zusammen mit der Multimerisierung des Proteins, zu einer spezifischen Erkennung durch SAF-A (Kipp et al., 2000).

1.2.4. Funktionen des menschlichen SAF-A

SAF-A ist ein multifunktionelles Kernprotein. Es ist als Bestandteil der hnRNP-Komplexe an der Verpackung und Prozessierung von prä-mRNA beteiligt (Dreyfuss et al., 1993), und kann aufgrund seiner DNA-Bindungseigenschaften wichtige strukturelle, Chromatinorganisierende Aufgaben bei der Zellkernarchitektur übernehmen (Romig et al., 1992; Kipp et al., 2000). Interessanterweise konnte bei der Bindung des SAF-A an Nukleinsäuren eine Bevorzugung der DNA vor RNA beobachtet werden (Fackelmayer et

al., 1994). SAF-A ist eines der zehn häufigsten Proteine der Kernmatrix und das einzige mit spezifischer SAR-Bindung. Die evolutionäre Konservierung der SAF-Box liefert einen weiteren Hinweis auf eine wichtige Rolle des SAF-A bei der Architektur des Zellkerns. Die Identifizierung von Proteinen, die mit SAF-A wechselwirken, erweitert das Spektrum möglicher Aufgaben des SAF-A. Hinweise auf eine mögliche Beteiligung bei der Proliferation und dem proteasomalen Abbau liefern die beobachteten Interaktionen des SAF-A mit dem Proliferationsinhibitor Necdin (Taniura & Yoshikawa, 2002) und der Rezeptoruntereinheit E3RS der E3-Ubiquitin-Ligase SCF ^{β -TrCP} (Davis et al., 2002). Auf eine mögliche funktionelle Rolle des SAF-A bei der Regulation der Transkription gibt es mehrere Hinweise. SAF-A bindet *in vivo* an den carboxyterminalen Bereich des Glukocorticoid-Rezeptors, der die Transkription vieler Hormon-abhängiger Gene reguliert. Dabei stört es die GR-abhängige Transkription durch Unterdrückung der Glukocorticoid-abhängigen Aktivierung (Eggert et al., 1997) und wirkt als Korepressor. Eine Subpopulation des menschlichen SAF-A-Proteins wird als Teil des prä-Initiationskomplexes *in vivo* an RNA Polymerase II gebunden. Die Bindung wird durch den mittleren Teil von SAF-A (AS 269-536) vermittelt. SAF-A behindert dabei die Phosphorylierung der carboxyterminalen Domäne (CTD) durch den Transkriptionsfaktor TFIIH und verhindert so den Start der Transkription (Kim & Nikodem, 1999). Ein weiteres mit SAF-A assoziiertes Protein ist p300/CBP, ein Transkriptionsfaktor, der zwischen dem Transkriptionskomplex und anderen DNA-gebundenen Transkriptionsfaktoren agiert (Martens et al., 2002) und eine intrinsische Acetyltransferase-Aktivität besitzt (Ogryzko et al., 1996; Bannister & Kouzarides, 1996). Über Chromatin-Immunpräzipitationen wurde gezeigt, dass p300-SAF-A-Komplexe an SAR/MAR-Elemente im Topoisomerase I-Gen binden, bevor dieses während der G₁-Phase im Zellzyklus aktiviert wird. Gleichzeitig erfolgt eine lokale Acetylierung der Nukleosomen (Martens et al., 2002). Die Interaktion von p300 und SAF-A mit SAR/MAR-Elementen nicht transkribierter Gene könnte zu einer Acetylierung lokaler Histone durch p300 führen, und somit diese Chromatinregionen für die Transkriptionskomplexe zugänglich machen.

2. Zielsetzung

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit dem humanen Kernprotein SAF-A (Scaffold Attachment Factor A), das zu den zehn häufigsten Kernmatrix-assoziierten Proteinen zählt. SAF-A erfüllt *in vivo* wahrscheinlich mehrere Funktionen, da es sowohl eine RNA-Bindedomäne (Kildijan & Dreyfuss, 1992) als auch eine spezifisch an SAR/MAR-DNA-bindende Domäne besitzt (Göhring et al., 1997a; Kipp et al., 2000). Die SAR/MAR-Bindung des SAF-A wird von der konservierten SAF-Box vermittelt.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollen die für die DNA-Bindung essentiellen Aminosäuren innerhalb der SAF-Box identifiziert werden. Dazu wird eine Punktmutationsanalyse verschiedener Aminosäurenreste innerhalb der ersten 45 Aminosäuren des SAF-A durchgeführt. Die SAF-Box ist dabei Teil eines Fusionsproteins mit DsRed, wodurch fluoreszenzmikroskopische und molekularbiologische Analysen ermöglicht werden. Die Auswirkung einer Punktmutation in der SAF-Box auf die Funktion des SAF-A wird über eine Mutante im gesamten SAF-A überprüft. In der Sequenz des SAF-A konnten zwei potentielle Kernlokalisierungssignale identifiziert werden. Eines der Signale liegt in der SAF-Box und soll ebenfalls durch eine Punktmutationsanalyse auf seine Funktionalität überprüft werden.

Die DNA-Bindung der SAF-Box ist abhängig von einer Selbstorganisation des Proteins (Fackelmayer & Richter, 1994), das heißt das Protein bedarf zur spezifischen festen Bindung an DNA der Multimerisierung. Im zweiten Teil dieser Arbeit soll daher der Bereich des SAF-A, der für die Multimerisierung verantwortlich ist, identifiziert und charakterisiert werden. Dazu werden über Immunpräzipitationen verkürzte GFP-fusionierte Teilbereiche des SAF-A auf eine mögliche Interaktion mit endogenem SAF-A untersucht. In einem weiteren Teilbereich der Arbeit wird versucht die Multimerisierungsdomäne mit der carboxyterminalen Assoziation des SAF-A an Kernmatrixstrukturen in Verbindung zu bringen. Dazu werden unter anderem FRAP-Analysen und *in situ* Matrixpräparationen durchgeführt.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien, Geräte und Zubehör

Geräte

Brutschränke	HeraCell, Heraeus, Hanau
Elektroporationssystem	GenePulser II, Bio-Rad, München
Fluoreszenzmikroskope	Zeiss, Leica
Konfokal-Lasermikroskop (LSM 510)	Zeiss, Jena
PCR-Gerät	Mastercycler Gradient, Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	Modell CG842, Schott, Hofheim
Röntgenfilme	Fuji Super RX
Röntgenfilmentwickler	Classic E.O.S., Agfa Medical
Semi-Dry-Blotter	Trans-Blot SD, Bio-Rad, München
Spannungsgeräte	PowerPac 300, Bio-Rad, München
	Modell E815, Consort, Belgien
Spectrophotometer	SmartSpec 3000, BioRad, München
Sterilbank	HeraSafe, Heraeus, Hanau
Ultraschallgerät	Sonopuls HD 2070, Bandelin, Berlin
Waage	Sartorius, Göttingen
Zellkulturmikroskop	Axiovert, Zeiss, Jena
Zentrifugen	Super T21, Sorvall, Bad Homburg
	Modell 5415D, Eppendorf, Hamburg

Chemikalienliste

Acrylamid/Bisacrylamid Rotiphorese [®] 30	Roth
Agar	Difco
Agarose	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
Bromphenolblau	Roth
Cäsiumchlorid	Roth
DABCO (Triethylendiamine)	Sigma
EDTA	Merck
Essigsäure	Merck
Ethanol p.a.	Merck
Ethidiumbromid	Roth
Glycerin	Merck
Glycin	Roth
Hefeextrakt	Difco
Isopropanol	Merck
Magermilchpulver	Drogeriemarkt
Methanol p.a.	Merck
Natriumdeoxycholsäure	Fluka
Natriumorthovanadat	Sigma
Nonidet [®] P40 Substitute	Fluka
Polyethylenimin	Sigma
Ponceau S	Sigma
P-Phenylenediamine (PPD)	Sigma
Protease Inhibitor Tabletten (Complete EDTA-free)	Roche

Protein A Sepharose CL-4B	Amersham Pharmacia
PVDF-Membran	Millipore
Rotiblock 10x	Roth
Salzsäure 25%	Merck
SDS	Roth
Silbernitrat	Roth
TEMED	Roth
Tris	Merck
Triton X-100	Sigma
Trypton	Merck
Tween® 20	Promega
Zinkchlorid	Merck

Antibiotika

Ampicillin	Roche
Kanamycin	Sigma
Penicillin	PAA, Linz
Streptomycin	PAA, Linz

Enzyme

DNase freie RNase	Roche
Micrococcus Nuklease	MBI Fermentas
RNase freie DNase	Roche
Restriktionsenzyme	NEB Biolabs
Pfu-Turbo®	Stratagene
T4-Ligase	Roche

Zellkultur

DMEM High Glucose Medium	PAA, Linz
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Linz
Insulin	Sigma
Trypsin-EDTA Lösung (1x)	PAA, Linz
Zellkulturschalen (100 mm, 145 mm)	Greiner
6, 24 und 96-Well-Platten	Greiner
35 mm Glasboden-Kulturschalen	MatTek, Ashland, USA
G418-Sulfate	PAA, Linz

Größenmarker

<i>DNA</i>	
Lambda DNA/Eco130I (Styl)/MluI Marker 17	MBI Fermentas
<i>Protein</i>	
High Molecular weight SDS-Page	Sigma

Farbstoffe

Hoechst 33258	Sigma
Sytox® Green Nucleic Acid Stain	Molecular Probes
TO-PRO® - 3 iodide	Molecular Probes

Kits

GFX PCR-Purification/Gelband	Pharmacia
Minipräp Kit	Pharmacia

3.1.2. Oligonukleotide, Vektoren und Antikörper

3.1.2.1. Verwendete Primer

<i>Primer für eine ,site-directed'- Mutagenese</i>		
K9/10A	1	5'-GTTCTCGCCTGTTAATGTAG CGAGCG CTGAAGGTGTCCGAGCTG-3'
	2	5'-CAGCTCCGACACCTTCAG CGCTGC TACATTAACAGGCGAGGAAC-3'
K12A *	1	5'-AATGTAAAAAAGCTG GCG GTGTCCGAGCTGAA-3'
	2	5'-TTCAGCTCCGACAC GCC CAGCTTTTTTACATT-3'
K17A *	1	5'-AGGTGTCCGAGCTG GCA GAGGAGCTCAAGAAG-3'
	2	5'-CTTCTTGAGCTCCTC TGC CAGCTCCGACACCT-3'
K22A	1	5'-AAAGAGGAGCTCAAG GCG CGACGCCTTTCTGA-3'
	2	5'-TCAGAAAGGCGTCG GCC CTTGAGCTCCTCTTT-3'
K22R23A	1	5'-CTGAAAGAGGAGCTCAAG GCGGCA CGCCTTTCTGACAAGGGT-3'
	2	5'-ACCCTTGTCAGAAAGGCG TGCCGC CTTGAGCTCCTCTTTCAG-3'
G29A	1	5'-ACGCCTTTCTGACAAG GCC CTCAAGGCCGAGCTC-3'
	2	5'-GAGCTCGGCCTTGAG GCC CTTGTCAGAAAGGCGT-3'
K31A	1	5'-TTCTGACAAGGGTCTC GCG GCCGAGCTCATGGAGC-3'
	2	5'-GCTCCATGAGCTCGGC GCG GAGACCCTTGTCAGAA-3'
L34A	1	5'-GGGTCTCAAGGCCGAG GCC ATGGAGCGACTCCAGG-3'
	2	5'-CCTGGAGTCGCTCCAT GGC CTCGGCCTTGAGACCC-3'
R37A	1	5'-GGCCGAGCTCATGGAG GCC CTCCAGGCTGCGCTGG-3'
	2	5'-CCAGCGCAGCCTGGAG GGC CTCCATGAGCTCGGCC-3'
L38A	1	5'-CGAGCTCATGGAGCGA GGC CAGGCTGCGCTGGACG-3'
	2	5'-CGTCCAGCGCAGCCTG GGC TCGCTCCATGAGCTCG-3'

Tab. 1: Verwendete Mutageneseprimer

Die ausgetauschten Nukleotide, die nun für Alanin kodieren, wurden rot markiert.

Primer 1: komplementärer Primer

Primer 2: revers komplementärer Primer

* Bestandteil der Laborsammlung

Die restlichen Primer wurden im Rahmen dieser Arbeit entworfen und von der Firma MWG-Biotech AG synthetisiert

<i>Deletionsprimer</i>		
ΔNLS2	v	5'-CTTTCTGACAAGGGTCTCAAG-3'
	h	5'-GAGCTCCTTTTCAGCTCCGA-3'
ΔNLSalt	v	5'- TCC GAAGATCATGGCCGTGGA-3'
	h	5'- TCC ATCTCCGCCTTTCTGTTC-3'

Tab. 2: Verwendete Deletionsprimer

Die Nukleotide, die nach Amplifikation eine BamHI-Schnittstelle (GGATCC) ergeben, wurden rot unterlegt. Primer, die den Beginn eines Fragmentes bilden werden mit v (= vorne) bezeichnet, Primer am Ende eines Fragmentes mit h (= hinten).

SAF-A-Teilkonstrukte	
C84v	5'-AGATC GAATTC TGGGCGGTGGAGGAAGTGGTGGAAATC-3'
C64Δv	5'-AGATC GAATTC TGCGTGGTAGTTACTCAAACAG-3'
C64Δh	5'-AGATC GGATCC GATGCCACTGGTTGTAGCCCTG-3'
C280v *	5'-AGATC GAATTC TGTTTAAGAAGCAAATGGCAGAT-3'
N45h	5'-AGATC GGATCC TCGTTCGTCCAGCGCAGCCTGGAG-3'
N420h *	5'-AGATC GGATCC GAATAATATCCTTGGTGATAATGC-3'
N280h *	5'-AGATC GGATCC GATGTGTCATCGAAGTGTTTCATCT-3'
N420v *	5'-AGATC GAATTC TGATGAGTTCCTCGCCTGTTAATG-3'
N100h	5'-AGATC GGATCC GAGCCGTCCAGAGCGGAGATTC-3'

Tab. 3: Primer zur gerichteten Klonierung

Die EcoRI-Schnittstellen werden rot, die BamH1-Schnittstellen blau dargestellt. Primer, die den Beginn eines Fragmentes bilden, werden mit v (= vorne) bezeichnet; Primer am Ende eines Fragmentes mit h (= hinten).

* Diese Primer sind Bestandteile der Laborsammlung. Die restlichen Primer wurden im Rahmen dieser Arbeit entworfen und von der Firma MWG-Biotech AG synthetisiert.

3.1.2.2. Verwendete Vektoren

Vektor	Fluoreszenzprotein	Herkunft
pEGFP-N1	GFP	BD Biosciences
DsRed-N1	DsRed	BD Biosciences
pSAF	-	Laborsammlung
C280	GFP	Laborsammlung
CC140	GFP	Laborsammlung
SAF-AGFP	GFP	Laborsammlung
ΔN45	GFP	Laborsammlung
N45rot	DsRed	im Rahmen dieser Arbeit erstellt

Tab. 4: Verwendete Vektoren

3.1.2.3. Verwendete Antikörper

Antikörper	Herkunft	Gegen	Organismus
K371(polyklonal)	Laborsammlung	SAF-A	Kaninchen
K593 (polyklonal)	Laborsammlung	SAF-Box	Kaninchen
7C8 (monoklonal)	Laborsammlung	SAF-A	Ratte
4F4 (monoklonal)	Gideon Dreyfuss Lab	hnRNP C1/C2	Maus
α-BrdU (monoklonal)	DAKO	Bromdesoxyuridin	Maus
α-DsRed (polyklonal)	BD Biosciences	DsRed	Maus
α-GFP (monoklonal)	Roche	GFP	Maus
Lamin B1 (polyklonal)	Santa Cruz	Lamin B	Kaninchen

Tab. 5: Verwendete primäre Antikörper

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Verwendung
anti-Maus Peroxidase (A0545)	Sigma	1:50000	Westernblot
anti-Kaninchen Peroxidase (A9309)	Sigma	1:50000	Westernblot
Alexa fluor 568 goat anti-mouse IgG	Molecular Probes	1:300	Immunfluoreszenz
Alexa fluor 488 goat anti-mouse IgG	Molecular Probes	1:300	Immunfluoreszenz

Tab. 6: Verwendete sekundäre Antikörper

3.1.3. Allgemeine Puffer und Lösungen

Puffer für SDS-Polyacrylamidgele:

2x Sammelgelpuffer	0,25 M Tris/HCl [pH 6,8] 7 mM SDS 1 Spatelspitze Bromphenolblau
5x Trenngelpuffer	1,86 M Tris/HCl [pH 8,8] 15 mM SDS
10x Laufpuffer (5 l)	151,5 g Tris 720,5 g Glycin 50 g SDS
10x Probenpuffer	100 mM Tris/HCl [pH 8,0] 25% (v/w) SDS 50% Mercaptoethanol 0,25% Bromphenolblau

Sonstige Puffer :

50x TAE (Tris/Acetat/EDTA)	242 g Tris-Base 57,1 ml Essigsäure conc. 100 ml EDTA (0,5 M [pH 8,0]) ad 1l H ₂ O bidest.
1x PBS (1 l)	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,44 g Na ₂ HPO ₄ 0,24 g KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Semi-Dry Puffer	50 mM Tris/HCl [pH 8,0] 40 mM Glycin 1,5 mM SDS 20% (v/v) Methanol

TNT (10x)	100 mM Tris/HCl [pH 8,0] 1,5 M NaCl 0,05% (v/v) Tween® 20
Ponceau-S-Lösung	0,2 % (w/w) Ponceau-S 5%ige (v/v) Essigsäure
Coomassie-Färbe-Lösung (nach Steck)	18 ml EtOH 42 ml H ₂ O (VE) 10 ml 35% (v/v) H ₂ CO-Lösung 0,08 g Coomassie
Coomassie Entfärber-Lösung (nach Steck)	250 ml EtOH 750 ml H ₂ O (VE) 10 ml 35% (v/v) H ₂ CO-Lösung
LB-Medium (1 l)	10 g NaCl 10 g Trypton 5 g Hefeextrakt
SOC-Medium (1 l)	20 g Trypton 5 g Hefe 0,5 g NaCl 20 ml Glucose (1 M)

3.2. Methoden

3.2.1. Allgemeine Methoden

Die unten aufgeführten Methoden wurden nach Sambrook et al. (1989) oder den angegebenen Protokollen durchgeführt und werden im Folgenden nicht näher erläutert.

- Agarose-Gelelektrophorese von DNA
- Coomassiefärbung von Proteingelen
- Bestimmung von DNA-Konzentrationen
- CsCl-Dichtegradientenzentrifugation
- Proteinfällung nach Wessel und Flügge (1984)
- Bestimmung der Proteinmenge (Bradford, 1976)
- Silberfärbung (Wray et al., 1981)

3.2.2. Arbeiten mit DNA

3.2.2.1. Gerichtete Klonierung

Primer

Für die Klonierung diverser SAF-A-Teilfragmente in die Vektoren EGFP-N1 und DsRed-N1 (Clontech) wurden zunächst Primer entworfen (siehe Material). Dazu wurden Schnittstellen in die Primer eingefügt, die eine gerichtete Klonierung erlauben, und es wurde darauf geachtet, dass die Leseraster von Fragment und Fusionsprotein (DsRed, GFP) übereinstimmen.



Abb. 7: Schematische Darstellung der gerichteten Klonierungen

Amplifikation der Teilstücke

Mittels PCR (Polymerase Chain Reaction) wurden die unterschiedlichen Fragmente aus den entsprechenden Templates amplifiziert. Als DNA-Matrize dienen mehrere Vektoren, die zusammen mit den passenden Primern in der folgenden Tabelle aufgeführt sind.

Fragment	Template	Primer (Schnittstelle)	Zielvektor
N45 rot/grün	pSAF	N420v (EcoRI) N45h (BamHI)	EGFP-N1 DsRed-N1
N100 rot/grün	pSAF	N420v (EcoRI) N100h (BamHI)	EGFP-N1 DsRed-N1
N420 Δ NLS	SAF-A Δ NLS	N420v (EcoRI) N420h (BamHI)	EGFP-N1
N230	SAF-A Δ NLS	N420v (EcoRI) N280h (BamHI)	EGFP-N1
C85	pSAF	C85v (EcoRI) C420h (BamHI)	EGFP-N1
C64 Δ v	pSAF	C64 Δ v (EcoRI) C420 Δ h (BamHI)	EGFP-N1
C64 Δ h	pSAF	C85v (EcoRI) C64 Δ h (BamHI)	EGFP-N1
C280 Δ h20	pSAF	C280v (EcoRI) C64 Δ h (BamHI)	EGFP-N1

Tab. 7: Benutzte Materialien für die einzelnen Klonierungen 1

Um eine effektive und korrekte Amplifikation zu erreichen, wurde die thermostabile Turbo-Pfu-DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* verwendet, die aufgrund ihrer Korrekturlesefunktion eine sehr niedrige Fehlerrate ($1,3 \times 10^{-6}$) aufweist. Je PCR-Ansatz (50 μ l) wurden 50 ng Template, 100 μ M dNTPs, je 10 pmol/Primer, 1x Pfu-Reaktionspuffer, 1,4 % DMSO und 2,5 U Turbo-Pfu-DNA-Polymerase zugegeben, und mit folgendem Programm bearbeitet:

Prä-Denaturierung:		5 min 95 °C
30 Zyklen:	Denaturierung	30 sec 94 °C
	Hybridisierung	30 sec 52 °C (Gradient +/-10 °C)
	Extension	1 min 72 °C
Post-Extension:		10 min 72 °C

Für die Hybridisierung ist es im Mastercycler-Gradient der Firma Eppendorf möglich einen Temperaturgradienten einzurichten. Dazu wurde die mittlere Temperatur bei 52 °C festgelegt und der Gradient +/-10 °C eingerichtet. In den durchgeführten PCRs wurden mehrere PCR-Ansätze bei unterschiedlichen Hybridisierungstemperaturen inkubiert, um die optimale Temperatur bezüglich Produktmenge und Spezifität zu ermitteln. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese auf die korrekte Größe überprüft.

Klonierung

Die Expressionsvektoren pEGFP-N1, DsRed-N1 sowie die PCR-Produkte wurden mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI (je 20 U für für 3 h oder ÜN) geschnitten und anschließend mit dem GFX-Plasmid-Kit von Amersham Pharmacia Biotech nach Anleitung gereinigt. Anschließend wurden der geschnittene Vektor (0,5 μ g) und die geschnittenen PCR-Produkte (je 1 μ g) mit T4-Ligase (20 U/Ansatz) und dem entsprechenden Puffer über Nacht bei 18 °C ligiert. Die Ligationsansätze wurden erneut gereinigt und durch Elektroporation in *E.coli* XL-1blue (Stratagene) transformiert.

3.2.2.2. Deletions-PCR

Primer

Bei dieser PCR wurde durch die Verwendung gegenläufiger Primer eine Deletion der neun Aminosäuren großen ersten NLS (₂₄₁KKRGVKRPR₂₄₉) ermöglicht. Dazu wurden Primer entworfen, die eine BamHI-Schnittstelle im deletierten Bereich erzeugen. Die

neue BamHI-Schnittstelle kann nach Klonierung zur Kontrolle in einem Restriktionsverdau verwendet werden. In einer zweiten PCR wurde innerhalb der SAF-Box ein 4 Aminosäuren großer Bereich deletiert, ohne dabei eine neue Schnittstelle zu erzeugen.

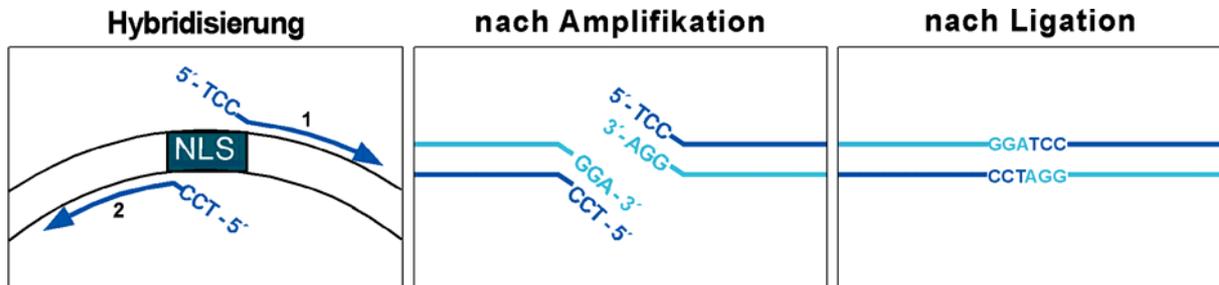


Abb. 8: Darstellung der Primerorientierung und der Entstehung der BamHI-Schnittstelle
Die Primer Δ NLSalt v (1) und h (2) hybridisieren direkt neben der NLS. An den Enden der Primer sind Nukleotide angefügt, die nach Amplifikation und Ligation in der Nukleotidsequenz statt der NLS eine BamHI-Schnittstelle ergeben.

Amplifikation

Die Amplifikation des PCR-Produktes startet an den Primern und verläuft um den gesamten Vektor. Als DNA-Matrize dienen verschiedene Vektoren, die zusammen mit den entsprechenden Primern in der folgenden Tabelle aufgeführt sind.

Erwartetes Fragment	Template	Primer
SAF Δ NLS alt	SAF-A/GFP	Δ NLSalt v Δ NLSalt h
Δ N45 Δ NLS	Δ N45/GFP	Δ NLSalt v Δ NLSalt h
N45 Δ aa21-24	N45/DsRed	Δ NLS2 v Δ NLS2 h

Tab. 8: Benutzte Materialien für die einzelnen Klonierungen 2

Je PCR-Ansatz (50 μ l) wurden 50 ng Template, 100 μ M dNTPs, je 10 pmol/Primer, 1x Pfu-Reaktionspuffer, 1,4% DMSO und 2,5 U Turbo-Pfu-DNA-Polymerase zugegeben, und mit folgendem Programm bearbeitet:

Prä-Denaturierung:		5 min 95 °C
30 Zyklen:	Denaturierung	1,5 min 94 °C
	Hybridisierung	30 sec 58 °C (Gradient +/-10 °C)
	Extension	10 min 72 °C
Post-Extension:		10 min 72 °C

Klonierung

Die PCR-Produkte werden nach Amplifikation für 2 h bei 37 °C mit DpnI (20 U) verdaut, damit die Template-DNA zerstört wird. Anschließend wurden die PCR-Produkte auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt und das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt. Die DNA-Banden entsprechender Größe wurden unter UV-Licht ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel über ein Gelband-PCR-Purification-Kit gereinigt. Zur Ligation der freien Enden wurden die Fragmente im entsprechenden Puffer mit T4-Ligase (20 U/Ansatz) und 0,5 µl Polynukleotidkinase zur Phosphorylierung der 5'-Enden versehen, eine Stunde bei 37 °C und anschließend über Nacht bei 18 °C inkubiert. Die Ligationsansätze wurden erneut gereinigt und durch Elektroporation in *E.coli* XL-1blue transformiert.

3.2.2.3 Mutagenese-PCR

Primer

Zur Mutagenese einzelner Aminosäuren wurde eine ‚site‘-spezifische Mutagenese mittels PCR durchgeführt. Bei dieser PCR werden ‚mismatch‘-Primer verwendet, die durch eine veränderte Nukleotidsequenz, im Vergleich zur Template-DNA, einen Aminosäureaustausch zur Folge haben. In den meisten Fällen wurden Primer verwendet, die den Austausch einer Aminosäure bewirken. Bei diesen Primern kommt es während der Hybridisierung des ersten PCR-Zyklus zu Fehlpaarungen in einem Bereich von ein bis drei Nucleinsäuren. Bei zwei weiteren Mutagenesen wurde ein Primer verwendet, durch den der Austausch von zwei nebeneinander liegenden Aminosäuren erfolgt. Der Bereich der Fehlpaarungen erstreckt sich hier während der Hybridisierung über vier Nucleotide.

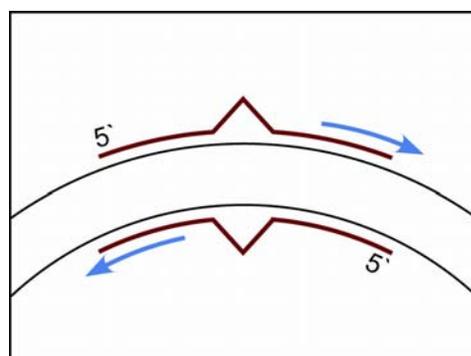


Abb. 9: Schematische Darstellung der Orientierung der Mutageneseprimer

Die Amplifikation startet an den Primer (rot) mit dem ‚mismatch‘ (Dreieck). Die Richtung der Elongation wird durch die blauen Pfeile angegeben und erfolgt über den gesamten Vektor.

Amplifikation

Auch hier erfolgt eine Amplifikation der DNA über den gesamten Vektor. Alle Mutationen wurden zunächst mit dem Template N45rot durchgeführt. Die Mutante K9/10/22A entstand durch erneute Mutation des Vektors K9/10A. Sämtliche verwendeten Primer sind unter Punkt 3.1.2.1. aufgeführt. Die Mutation des Glycin an Position 29 zu einem Alanin wurde außerdem im kompletten SAF-A eingeführt. Dazu wurde SAF-A/GFP als Template verwendet.

Je PCR-Ansatz (50 µl) wurden 10-50 ng Template, 100 µM dNTPs, je 10 pmol/Primer, 1x Pfu-Reaktionspuffer, 1% DMSO und 2,5 U Turbo-Pfu-DNA-Polymerase zugegeben, und mit folgendem Programm bearbeitet:

Prä-Denaturierung:		5 min 95 °C
30 Zyklen:	Denaturierung	1,5 min 94 °C
	Hybridisierung	30 sec 52 °C (Gradient +/-10 °C)
	Extension	7 min 72 °C
Post-Extension:		10 min 72 °C

Klonierung

Um die bakterielle Template-DNA zu entfernen, wurden die Amplifikate bei 37 °C für 2 h mit DpnI (20 U) verdaut. Nach Reinigung über ein PCR-Purification-Kit und EtOH-Fällung werden die DNAs in kompetente XL1 elektroporiert.

3.2.2.4. Elektroporation von *E.coli*

Für die Transformation werden bei -70 °C eingefrorene kompetente *E.coli*-Zellen (XL1-blue, in 40 µl Aliquoten) aufgetaut und auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 1 ng gereinigter DNA wird die Elektroporation in vorgekühlten Küvetten (Spaltbreite 1 mm) mit einem Elektroporator (Gene-Pulser II, BioRad) bei 1.8 kV, 25 µF und 200 Ω durchgeführt. Anschließend werden die Zellen in 1 ml SOC-Medium überführt und nach 1 h bei 37 °C auf Selektionsplatten ausplattiert (LB mit 1,6% Agar und 50 ng/ml Kanamycin).

3.2.2.5. Plasmidisolierung aus *E.coli* (Minipräparation)

Von den Selektionsplatten werden Einzelkolonien in 1 ml LB-kan überimpft und bei 37 °C für 4 h kultiviert. Die Bakterien werden für 5 min abzentrifugiert (13200 rpm) und das Pellet in 100 µl GET (50 mM Glukose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris [pH 8]) resuspendiert.

Die Bakterien werden mit 200 µl alkalischen SDS (0,2 N NaOH, 1% SDS) lysiert und die Proteine sowie die bakterielle genomische DNA mit 150 µl Salzlösung (3 M Kaliumacetat, 1,8 M Essigsäure) gefällt. Der gesamte Ansatz wird 5 min abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit kaltem EtOH (100%) für 30 min bei -20 °C gefällt. Der Ansatz wird erneut abzentrifugiert (13200 rpm, 15 min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das getrocknete DNA-Pellet wird in 100 µl TE + RNase (250 ng/ml) aufgenommen und für 30 min bei 37 °C inkubiert.

3.2.2.6. Plasmid-Isolierung aus *E.coli*-Zellen (Maxipräparation)

Plasmide wurden nach der Methode von Birnboim (1979) isoliert und anschließend über einen CsCl-Dichtegradient nach Sambrook et al. (1989) aufgereinigt.

3.2.2.7. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung klonierter DNA-Fragmente erfolgte entsprechend der Dideoxy- oder Kettenabbruch-Methode nach Sanger (1977) unter Verwendung des BigDye-Kits von Applied Biosystems.

Ansatz:

1 µg	DNA-Template
10 pmol	spezifischer Primer
3 µl	Big Dye (Terminator-Cycle-Sequencing-Mix)
5 µl	2,5x Puffer
ad 20 µl aqua dest.	

Primer für Sequenzierung:

EGFPupstream:	5'-GAG GTC TAT ATA AGC AGA GCT GGT-3'
EGFPdownstream:	5'-GGT CAG CTT GCC GTA GGT GGC ATC-3'
N420v :	siehe oben
N45h:	siehe oben

Thermocycler-Programm:

25 Zyklen:	
Denaturierung:	96 °C 30 sec
Hybridisierung:	50 °C 5 sec
Extension:	60 °C 4 min

Anschließend wurde die DNA mit Ethanol gefällt und getrocknet. Die Auftrennung der Reaktionsprodukte erfolgte am Institut für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie, Hamburg.

3.2.3. Analyse von Proteinen

3.2.3.1. Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) lassen sich Proteine aufgrund ihrer verschiedenen Molekulargewichte auftrennen. Hierzu werden denaturierende Gele nach Laemmli (1970) und Thoma et al. (1979) verwendet. Je nach Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins werden Gele mit 8%, 10% oder 12% (w/v) Polyacrylamidgehalt eingesetzt.

3.2.3.2. Westernblot-Analyse

Für den immunologischen Proteinnachweis werden die mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine nach der Methode von Towbin et al. (1979) auf eine PVDF-Membran (Millipore Porengröße 0,45 μM) transferiert.

Der Transfer wird in einer Semi-Dry-Blot-Kammer der Firma BioRad durchgeführt und erfolgt bei 1 mA/cm² für 1 h bei einer Geldicke von 0,7 mm. Nach dem Transfer wird die Membran mit Ponceau-S-Lösung reversibel angefärbt, um die Positionen der Markerproteine festzuhalten. Unspezifische Proteinbindestellen werden durch 30-minütige Inkubation in 1x Rotiblock-Lösung blockiert. Anschließend folgt die Inkubation mit dem primären Antikörper (Verdünnung: 1:20 bis 1:1000 in TNT, je nach Antiserum) für 1 h bei RT. Nach weiteren Waschschritten (3x 10 min mit TNT) folgt eine 30-minütige Inkubation mit dem sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörper (Verdünnung: 1:50000 in TNT + 0,5% Magermilchpulver).

Die Nachweisreaktion erfolgt nach erneutem Waschen mit TNT (3x 10 min) durch eine Chemilumineszenzreaktion mit dem ECL-System. Anschließend erfolgt eine Lumineszenz-Photographie auf Röntgenfilm.

Bei vergleichenden Analysen wird ein Blot nachfolgend mit mehreren Antikörpern inkubiert. Als Zwischenschritt können die Antikörper der vorherigen Inkubation vom Blot eluiert werden. Dafür inkubiert man die Membran mit Elutionspuffer (62,5 mM Tris/HCl

[pH 6,7], 2% SDS, 100 mM 2-Mercaptoethanol) für 30 min bei 70 °C. Anschließend wird die Membran mit H₂O (2x 10 min) und TNT (1x 10 min) bei RT gewaschen.

3.2.3.3. Immunpräzipitation von Proteinen

Transfizierte Zellen werden 40-48 h nach der Transfektion, stabil exprimierende oder nicht transfizierte Zellen bei einer Konfluenz von 90-100% geerntet. Zuvor wurden transient transfizierte Zellen im Fluoreszenzmikroskop bezüglich der Transfektionseffizienz und den typischen Lokalisationsmustern der Proteine untersucht. Üblicherweise wurden 5×10^7 Zellen pro Immunpräzipitation eingesetzt. Die Zellen werden in 1,5x PBS + 1% Triton X-100 + einem Proteaseinhibitorcocktail (Complete EDTA-free [1 Tablette/10 ml Puffer]) aufgenommen und für 2x 15 sec auf Eis sonifiziert. Anschließend wird das Zellysate mit 13.000 rpm für 15 min bei 4 °C abzentrifugiert. Für die Immunpräzipitation werden 5-10 µg Antikörper zu 1 ml des Überstandes gegeben und für 2 h bei 4 °C auf einem Roller inkubiert. Nach Zugabe von 30 µl gesetzter Protein-A-Sepharose wird für eine weitere Stunde inkubiert. Die Sepharose wird 9-mal mit je 1 ml 1,5x PBS + 1% Triton X-100 gewaschen und 1-mal mit 1 ml H₂O. Der gebundene Immunkomplex wird anschließend durch Kochen (90 °C, 5 min) in 20-30 µl 2x SDS-Puffer eluiert.

3.2.3.4. Chromatinfractionierung- und DNA-Bindungs-Assays

Für diese Versuche wurden sämtliche Lösungen kaltgestellt und die Zentrifugen auf 4 °C vorgekühlt.

Permeabilisierung von Zellkernen durch hypotonen Schock

Transient oder stabil transfizierte HEK 293-Zellen werden auf 10 cm Schalen bis zu einer Konfluenz von 100% kultiviert. Von den Zellkulturschalen werden durch Trypsinierung ungefähr 2×10^7 Zellen geerntet. In einem Weißkappenröhrchen werden die Zellen in 10 ml kaltem DMEM für 3 min bei 2000 g abzentrifugiert. Das Medium wird abgesaugt und das Zellpellet 2-mal mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wird das Zellpellet in 400 µl Lysispuffer (250 mM Sucrose, 20 mM Hepes [pH 7,4], 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ und einem Proteaseinhibitorcocktail (Complete EDTA-free [1 Tablette/10 ml Puffer])) resuspendiert. Tropfenweise wird nun 200 µl Lysispuffer + 1% NP40 zugegeben. Zu diesem Zeitpunkt wurden für den DNA-Bindungs-Assay 50 µl abgenommen (Fraktion 1). Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis folgt ein Zentrifugationsschritt für 3 min bei

2000 rpm. Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Das Pellet wird 2-mal mit 1 ml Lysispuffer + 0,5% NP40 gewaschen (3 min, 2000 rpm). Anschließend wird das Pellet in 1 ml Kernpuffer (250 mM Sucrose, 20 mM Hepes [pH 7,4], 100 mM NaCl, 0,5 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂) unter denselben Zentrifugationsbedingungen 2-mal gewaschen. Die nun permeabilisierten Kerne im Pellet werden in 50 µl Kernpuffer gelöst. Zu diesem Zeitpunkt wurden 1 µl der gelösten Kerne mit 1 µl Einbettungmedium (1x PBS, 40% Glycerin, Höchst 33258 1:1000) auf Objektträgern fixiert.

DNA-Bindungs-Assay

Für den DNase-Verdau werden 50 µl der in Kernpuffer gelösten Kerne mit 900 µl isotonischem Puffer (300 mM Sucrose, 10 mM Pipes [pH 6,8], 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0,5% Triton) aufgefüllt. Eine Probe von 50 µl wird abgenommen (Fraktion 2). Zu den restlichen 900 µl Suspension werden 250 U DNase gegeben und 20 min bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wird die Probe durch Zugabe von Ammoniumsulfat auf eine Endkonzentration von 250 mM eingestellt und für 5 min bei RT inkubiert. Die freigesetzten Chromatin-Proteine werden von den restlichen Bestandteilen durch Zentrifugation (750 g für 5 min) getrennt (Fraktion 3), im Pellet verbleiben unlösliche, festgebundene Proteine (Fraktion 4). Die Proteine der 4 Fraktionen werden gefällt und über einen Westernblot analysiert. Dabei wurde für jede Fraktion 1% bezogen auf das Ausgangsmaterial eingesetzt.

Chromatinfractionierung

Für die Chromatinfractionierung werden 50 µl permeabilisierte Kerne mit Kernpuffer auf 600 µl aufgefüllt und bei 22 °C mit 300 U Micrococcus Nuklease inkubiert. Nach 1, 2 und 4 min werden je 200 µl abgenommen und die enzymatische Reaktion mit 2 µl EDTA (0,5 M) und 2 µl EGTA (0,5 M) gestoppt. Die Fraktionen werden bei 8000 rpm für 3 min zentrifugiert, der Überstand als S1-Fraktion abgenommen. Das Pellet wird in 200 µl EDTA (2 mM) gelöst und 5 min auf Eis inkubiert. Nach einem erneuten Zentrifugationschritt (8000 rpm, 3 min) erhält man mit dem Überstand die Fraktion S2 und das in 200 µl EDTA (2 mM) gelöste Pellet als Fraktion P.

Von den 9 Fraktionen pro Fraktionierung werden je 100 µl zur Analyse der Proteine gefällt und anschließend in einem Westernblot analysiert. Die restlichen 100 µl zur Analyse der DNA werden mit Phenol und Chloroform gereinigt und in äquivalenten Aliquoten auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt.

3.2.4. Arbeiten mit Zellen

3.2.4.1. Zellkultur

HEK 293-Zellen (humane Embryo-Nierenzellen) wurden in 14,5 cm und 10 cm Kulturschalen als Monolayerkultur in DMEM mit 10% FCS (3,75 g/l NaHCO₃, 4,5 g/l Glukose) bei 37 °C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert. Außerdem wurden dem Medium 40 µg/ml Penicilin-G und 80 µg/ml Streptomycin-Sulfat zugegeben. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage geteilt, indem sie mit Trypsin (5 mg/ml in PBS) von der Kulturschale gelöst und 1:5 bzw. 1:10 umgesetzt wurden.

3.2.4.2. Chemische Transfektion mit Polyethylenimin (PEI)

24 h vor der Transfektion werden die Zellen 1:5 geteilt. Zu 10 µg DNA wird 50 µl serumfreies Kulturmedium gegeben. Anschließend vermischt man die DNA mit 304,5 µl PEI-Arbeitslösung (4,5 µl 0,5%ige PEI-Lösung + 300 µl serumfreies Medium) und inkubiert den Ansatz für 30 min bei Raumtemperatur. Das Medium der Zellen wird abgenommen und mit 3 ml frischem Medium versetzt. Die Transfektionslösung wird tropfenweise auf die Zellen gegeben, gut verteilt und für 4 h unter Standard-Kulturbedingungen inkubiert. Anschließend wird das Medium abgesaugt, durch frisches Medium ersetzt, und die Zellen bis zur Analyse weiter kultiviert.

3.2.4.3. Herstellung stabiler Zelllinien

Vektoren mit dem Gen für die Neomycin-Phosphotransferase erlauben nach Transfektion in geeignete Zellen die Etablierung stabil exprimierender Zelllinien durch Selektion mit G418 (G418-Sulfat, Geneticin). Für die meisten der hier verwendeten Vektoren wurde versucht, eine stabile Expression in HEK 293-Zellen zu erzielen.

Transfizierte Zellen werden zwei Tage nach Transfektion 1:10 umgesetzt. Dem Medium (10 ml) wird 20 µl G418 (500x) zugegeben und die Zellen weiterkultiviert. Die ersten Zellen ohne Resistenzgen sterben nach 3-4 Tagen ab. Nach 4-6 Wochen entstehen durch den Selektionsdruck stabil exprimierende Zellen. Während dieser Zeit werden die Zellen bei normalen Kulturbedingungen kultiviert, lediglich das verbrauchte Medium wird gegen frisches mit G418 ausgetauscht.

3.2.4.4. Zellsortierung

Bei einer Zellsortierung ist es möglich, über die Rauheit der Zelloberfläche aus einer Zellpopulation gesunde von ungesunden Zellen zu unterscheiden, sowie Aussagen über die Anzahl fluoreszierender Zellen und deren Fluoreszenzintensität zu treffen. Die Zellsorter ermöglichen es dann Zellen, die bestimmte Kriterien erfüllen, von der Population zu trennen.

Mit zahlreichen Zelllinien wurde eine Einzelzellsortierung durchgeführt. Die Sortierung wurde von Andreas Rimek (Heinrich-Pette-Institut) am MoFlo Zellsorter der Firma Dako Cytomation durchgeführt.

In Abb. 10 sind die Auswahlkriterien für die Sortierung der stabilen Zelllinien dargestellt.

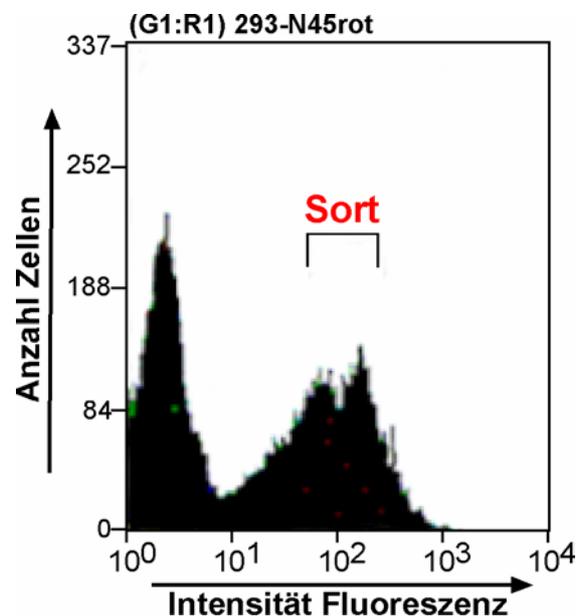


Abb. 10: Auswahlkriterien für den Einzelzellsort mit DsRed fusionierten Proteinen

Es wurden Zellen ausgewählt, die in einem mittleren Bereich der Fluoreszenzintensität liegen und den Durchschnitt aller Zellen darstellen (am Beispiel N45 rot).

Für jede stabile Zelllinie wurden 192 Einzelzellen aus dem ausgewählten Bereich in 96-Well-Platten sortiert. Die mikroskopische Überprüfung der einzelnen Wells zeigte, dass tatsächlich nur eine Zelle/Well abgelegt wurde. Gut wachsende und fluoreszierende Zellklone wurden ausgewählt, zunächst auf 24-Well-Platten und später auf 6-Well-Platten umgesetzt.

Für die weiteren Experimente wurden aus den 6-Well-Platten Zellklone ausgewählt, die einen gleichmäßigen Expressionslevel der Proteine aufweisen und deren Fluoreszenzstärke in einem mittleren Bereich liegt. Diese Zellen wurden unter den üblichen Kulturbedingungen weiter gezogen.

Mit einigen anderen Zelllinien wurde ein Massensort durchgeführt, wenn beobachtet wurde, dass trotz Selektion nur wenige Kolonien stabiler, fluoreszierender Zellen entstanden sind. Dazu wurden ungefähr 10^6 Zellen/Zelllinie aus einem definierten Fluoreszenzbereich (siehe oben) gesortet und nach mikroskopischer Analyse weiter kultiviert.

3.2.4.5. Zellfraktionierung von HEK 293-Zellen *in situ*

Die Fraktionierung von Zellen und Zellkernen wurde leicht verändert nach Fey & Penman (1988) durchgeführt.

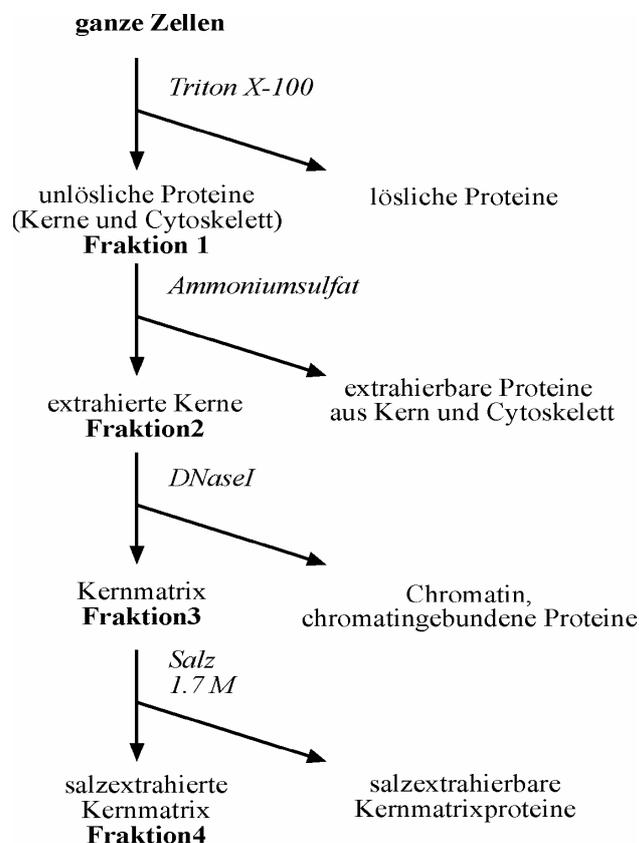


Abb. 11: Schematische Darstellung einer Zellfraktionierung

HEK 293-Zellen werden mit den verschiedenen SAF-A/GFP-Konstrukten auf Alzianblau-beschichtete Deckgläschen (13 mm) transfiziert. Nach 24 h werden die Zellen fraktioniert. Dafür wäscht man die Zellen 2-mal kurz mit PBS und überschichtet sie anschließend mit 100 µl/Deckgläschen isotonischem Puffer 1 (10 mM PIPES [pH6,8], 100 mM NaCl, 300 mM Sucrose, 3 mM MgCl₂, 0,5% Triton X-100). Zur Stabilisierung wird Natriumtetrathionat (Endkonzentration: 2 mM) zugegeben und der Ansatz 10 min

bei RT inkubiert. Ein Teil der Deckgläschen wird erneut kurz in PBS gewaschen und mit 1 µl Fixierlösung (1x PBS, 1x Hoechst 33258, 40% Glycerin, 8% Formaldehyd) auf einem Objektträger fixiert (Fraktion 1). Die restlichen Deckgläschen werden mit je 100 µl/Deckglas Extraktionspuffer 1 (10 mM PIPES [pH 6,8], 250 mM Ammoniumsulfat, 300 mM Sucrose, 3 mM MgCl₂, 0,5% Triton X-100) überschichtet und für 10 min bei RT inkubiert, und anschließend ein Teil fixiert (Fraktion 2). In einem weiteren Fraktionierungsschritt werden die Zellen mit 100 µl isotonischen Puffer 2 (10 mM PIPES [pH 6,8], 50 mM NaCl, 300 mM Sucrose, 3 mM MgCl₂, 0,5% Triton X-100) + 20 Einheiten DNase/100 µl für 20 min bei RT überschichtet, und anschließend für 5 min mit isotonischen Puffer 2 (+ 250 mM Ammoniumsulfat, ohne DNase) behandelt (Fraktion 3). Im letzten Schritt werden die Zellen mit Extraktionspuffer 2 (10 mM PIPES [pH 6,8], 1,7 M NaCl, 300 mM Sucrose, 3 mM MgCl₂, 0,5% Triton X-100) für weitere 10 min extrahiert. Anschließend werden sie mit Fixierlösung fixiert (Fraktion 4). Die Analyse der Zellen nach den jeweiligen Fraktionierungsschritten erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie.

3.2.4.6. Immunfärbung *in situ*

Standardprotokoll Immunfärbung

HEK 293-Zellen werden durch PEI-Transfektion mit den entsprechenden Konstrukten auf Alzianblau-beschichtete Deckgläschen transfiziert. Nach 24 h werden die Deckgläschen aus den Kulturschalen genommen, kurz in 1x PBS gewaschen, und für 15 min in 3,5% Paraformaldehyd in 1x PBS fixiert.

Vorbehandlung:

Nach jedem der folgenden Schritte werden die Zellen in 1x PBS gewaschen. Mit 100 µl 100 mM Tris [pH 7,4] für 10 min wird die Fixierung abgestoppt. Nach einem Waschschrift mit 100 mM Tris [pH 7,4] zur Neutralisierung werden die Zellen mit 1x PBS und 0,5% Triton X100 für 10 min permeabilisiert und anschließend noch einmal in 1x PBS gewaschen.

Immunfärbung:

Sämtliche Inkubationen wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Unspezifische Bindestellen werden für 1 h in 1x PBS + 3% BSA bei RT geblockt. Nach einer kurzen Waschung in 1x PBS werden die Zellen mit dem primären Antikörper (entsprechende Verdünnung in 1x PBS) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation werden die Zellen 20-mal in 1x PBS gewaschen. Die Bindung des sekundären Antikörper wird nun

für weitere 30 min bei 37 °C ermöglicht, bevor der ungebundene sekundäre Antikörper durch 20-mal Waschen in 1x PBS entfernt wird.

Die Zellen werden in 1x PBS + 40% Glycerin + 10% DABCO auf Objektträgern eingebettet.

Replikationsmessung durch Bromdesoxyuridin (BrdU)

Für die Immunfärbung replizierter DNA wird eine 10 cm Kulturschale zu 70% konfluenten HEK 293-Zellen nach Transfektion mit SAFG29A oder SAF-A/GFP für 24 h unter den üblichen Kulturbedingungen weiter gezogen. Dann wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 auf eine 10 cm Schale mit Deckgläschen umgesetzt und weitere 24 h kultiviert. Das Medium wird gewechselt und mit 10 µM BrdU/10 ml Medium versehen. Die weitere Kultivierung der Zellen für 18 h ermöglicht den Einbau des BrdU in replizierte DNA. Am dritten Tag nach Transfektion werden die Zellen in 1x PBS gewaschen und für 15 min mit 3,5% Paraformaldehyd in 1x PBS fixiert.

Die Vorbehandlung erfolgt wie eben beschrieben, außer dass nach dem Abstoppen der Formaldehydfixierung ein zusätzlicher Schritt eingefügt wird: Die Deckgläschen werden zur Äquillibrierung auf die folgende Behandlung kurz in 2 M HCl getaucht und anschließend für 20 min mit 100 µl 2 M HCl bei RT inkubiert.

Nach der Vorbehandlung werden alle weiteren Schritte in einer feuchten Kammer und bei Raumtemperatur durchgeführt.

Unspezifische Bindestellen werden für 1 h in 1x PBS + 3% BSA geblockt. Nach einer kurzen Waschung in 1x PBS werden die Zellen mit dem primären Antikörper gegen BrdU (1:20 in 1x PBS) für 30 min inkubiert. Nach der Inkubation der Antikörper werden die Zellen 20-mal in 1x PBS gewaschen. Nach der Inkubation mit sekundären Antikörpern (anti-mouse Alexa 568 1:300 in 1x PBS) für weitere 30 min werden die Zellen 20-mal gewaschen und in 1x PBS + 40% Glycerin + 10% DABCO auf Objektträgern eingebettet.

3.2.5. Mikroskopische Methoden

3.2.5.1. Herstellung von Präparaten für die Mikroskopie

Für die Analyse der Zellen an einem Fluoreszenz- oder konfokalen Laser-Mikroskop, werden transient transfizierte oder stabile HEK 293-Zellen auf Deckgläschen für 24-48 h kultiviert. Anschließend werden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und für 15 min in 3,5% Paraformaldehyd in 1x PBS fixiert. Nach einem Waschschrift in 1x PBS werden die

Zellen im Falle einer DNA-Färbung für 10 min mit 1x PBS + 0,5% Triton X100 bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 1x PBS erfolgt die DNA-Färbung mit TO-PRO[®]-3 iodide (1:1000 in 1x PBS) oder Sytox-Green (0,125 µM in 1x PBS) für 10 min bei RT. Nach einem letzten Waschschrift mit 1x PBS wurden die Zellen auf einem Objektträger mit 1,8 µl Einbettungsmedium eingedeckt. Im Falle einer DNA-Färbung mit Höchst 33258 wurden die Zellen nach Permeabilisierung direkt in dem Einbettungsmedium mit dem Farbstoff eingedeckt. Nach kurzem Trocknen werden die Deckgläser mit farblosem Nagellack versiegelt.

Einbettungsmedien:

PPD	100 mM Tris/HCl [pH 9], 40% (v/v) Glycerin, 1 mg/ml PPD
DABCO	100 mM Tris/HCl [pH 7,5], 90% (v/v) Glycerin, 10% (w/v) DABCO
Höchst	1x PBS, 40% Glycerin, 10 µg/ml Höchst 33258, 10% (w/v) DABCO

3.2.5.2. Fluoreszenzmikroskopie

Einige der fluoreszenzmikroskopischen Bilder der Zellfraktionierungen und transient transfizierter Zellen wurden bei 630facher Vergrößerung an einem Epifluoreszenz-Mikroskop (Leica DMRA) aufgenommen. Die Aufnahmen von EGFP wurden mit einem Anregungslicht von 488 nm gemacht, Aufnahmen von DsRed mit 568 nm und die von Hoechst 33258 bei 325 nm. Die Darstellung und Aufnahme der Zellen im Phasenkontrast waren an diesem Mikroskop ebenfalls möglich. Die meisten Aufnahmen und fluoreszenzmikroskopischen Analysen wurden jedoch am konfokalen Lasermikroskop Meta 510 von Zeiss erstellt, die Aufnahmebedingungen für dieses Mikroskop werden im Folgenden detailliert aufgeführt.

3.2.5.3. Arbeiten mit dem konfokalen Mikroskop

Die konfokale Mikroskopie dient zur Untersuchung optischer Schnitte durch ein räumliches Objekt. Dies wird durch die Lochblende (pinhole) erreicht, die sich im Brennpunkt des Mikroskops, konfokal zum beleuchteten Punkt im Präparat, befindet und nur exakt fokussiertes Licht passieren lässt. Durch das Ausblenden nicht fokussierten Lichtes können Signale ober- bzw. unterhalb der gewünschten Schärfebene den Detektor nicht erreichen und tragen nicht zur Bildentstehung bei. Das konfokale Mikroskop LSM Meta 510 von der Firma Zeiss wurde für Aufnahmen von Zellen mit fluoreszierenden Proteinen und für FRAP-Analysen verwendet.

3.2.5.4. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen am konfokalen Mikroskop

Mit dem LSM Meta 510 wurden fixierte Zellen auf Objektträgern und lebende Zellen aufgenommen. Die Präparate der fixierten Zellen wurden, wie in Kapitel 3.2.3.7. beschrieben, hergestellt. Für die Mikroskopie mit lebenden Zellen wurden HEK 293-Zellen auf 35 mM Kulturschalen mit Glasboden in 2 ml Medium kultiviert. Zur DNA-Färbung in lebenden Zellen wurden 5 μ M des membrangängigen Farbstoffs Draq5 zum Medium der Zellen gegeben. Nach einer 2-5-minütigen Inkubation bei 37 °C im Brutschrank konnten die Zellen mit der DNA-Färbung analysiert werden. Die Temperatur der Zellen wurde während der Versuche am Mikroskop durch einen beheizbaren Kreutztisch auf 37 °C gehalten.

Für die Aufnahme konfokaler Bilder mit dem LSM Meta 510 wurden die in Tab. 9 genannten Einstellungen entsprechend dem zu untersuchenden fluoreszierenden Protein DsRed oder GFP gewählt. Die Aufnahmebedingungen für die DNA-Farbstoffe Draq5 oder ToPRO-3 im Infrarot-Bereich sind ebenfalls aufgeführt.

Die Antikörper-gekoppelten Farbstoffe Alexa Fluor 488 und Alexa Fluor 568 wurden mit den Einstellungen für GFP bzw. DsRed aufgenommen.

Parameter	Einstellung
Auflösung	512 × 512
Aufnahme	LP505 (GFP) LP560 (DsRed, ToPRO-3, Draq5)
Laser	Argon/2 458, 477, 488, 514 nm (GFP) HeNe 1 543 nm (DsRed) HeNe 2 633 nm (ToPRO-3, Draq5)
Scanspeed	9
Grund-Laserleistung (Argon)	25-30%
Konfokale Blende (Pinhole)	1 Airy
Objektiv	Plan-Apochromat 63× /1,4 Oil
Vergrößerung (Zoom)	5 oder 6
Wellenlänge zur Anregung	488 nm (GFP) Leistung: 0,5-10%, 543 nm (DsRed) Leistung: 1-10% 633 nm (ToPRO, Draq5): 10-30%
Datentiefe	12 Bit

Tab. 9: Einstellungen zur Aufnahme konfokaler Bilder

Die Leistungen des Lasers bei den Aufnahmen wurde der Fluoreszenzstärke der Zellen angepasst, um das Ausbleichen der Fluorochrome zu vermindern. Die Vergrößerung wurde dem interessierenden Objekt angepasst und ist in den Aufnahmen durch einen Größenbalken angegeben.

3.2.5.5. Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP)

FRAP-Experimente ermöglichen die Untersuchung dynamischer Prozesse in der lebenden Zelle. Nach dem irreversiblen Bleichen einer definierten Region in der Zelle mit hoher Laserintensität kann der Rückstrom nicht-geblichener fluoreszierender Proteine in diesen Bereich verfolgt werden. Zur Auswertung der Experimente wird die Intensität der Fluoreszenz gegen die Zeit aufgetragen (siehe Abb. 13). Die gewonnenen Daten liefern Informationen über die Mobilität des Proteins in der Zelle und erlauben die Bestimmung der mobilen Fraktion (MF) sowie der Diffusionszeit.

Kulturbedingungen

Für FRAP-Untersuchungen wurden HEK 293-Zellen zwei Tage vor Messung 1:5 auf 35 mm Kulturschalen mit Glasboden umgesetzt und in 2 ml Medium kultiviert. Die Zellen sollten für die Versuche eine hohe Konfluenz haben, jedoch nicht mehr als 85%. Die Temperatur der Zellen wurde während der Versuche auf 37 °C gehalten, damit die Versuchsbedingungen den Kulturbedingungen entsprechen.

Aufnahmebedingungen

Für die Aufnahme von FRAP-Experimenten wurde zunächst über den visuellen Mikroskop-Modus eine typische Zelle ausgesucht. Diese wurde über den LSM-Modus aufgenommen und bei 5fachem Zoom untersucht. Dazu wurde ein Bereich definierter Größe im Zellkern ausgewählt, der geblichen werden sollte. In Tab. 10 sind die Einstellungen aufgeführt, die zum Bleichen eines ausgewählten Bereichs und für die anschließende Bildaufnahme zur Verfolgung des Rückströmens der Proteine verwendet wurden. Die genannten Parameter gelten für Proteine, die mit EGFP oder DsRed fusioniert sind.

Parameter	Einstellung
Zeitverzögerung der Aufnahmen	0 ms
Anzahl der Bilder	300-400
Anzahl der Bilder vor dem Bleichen	3
Auflösung	128 × 128
Filter	LP505 (GFP) LP560 (DsRed)
Iterationen	80
Laser	Argon/2 458, 477, 488, 514 nm (GFP) HeNe1 543 nm (DsRed)
Scangeschwindigkeit	maximal (12)
Grund-Laserleistung (Argon)	85%
Konfokale Blende (Pinhole)	maximal geöffnet
Objektiv	Plan-Apochromat 63×/1,4 Oil
Geblichener Bereich	Höhe: 10 Pixel/Breite: variabel
Vergrößerung (Zoom)	5
Wellenlängen zum Bleichen	458, 477, 488, 514 nm Leistung: 100% (GFP) 488, 514, 543 nm Leistung: 100% (DsRed)
Wellenlänge zur Aufnahme	488 nm Leistung: 1% (GFP) 543 nm Leistung: 10% (DsRed)
Datentiefe	8 Bit

Tabelle 10: Einstellungen am konfokalen Mikroskop für FRAP-Experimente

Auswertung der Daten

Die Daten der FRAP-Experimente wurden mit Hilfe des Programms ImageJ ausgewertet. Die Bilderserie von 300-400 Bildern pro Zelle wurde mit dem Plug-In ‚LSM-Reader‘ eingelesen. Mit den Tools von ImageJ können Regionen (ROI) festgelegt werden, in denen die Intensität der Fluoreszenz bestimmt werden soll. Dazu wurden jeweils gleich große Bereiche in der geblichenen und der nicht-geblichenen Region ausgewählt (Abb. 12). In diesen Bereichen kann das Programm ImageJ die mittlere Intensität in allen Bildern bestimmen und die Daten in eine Texttabelle ausgeben. Über den ‚LSM-Reader‘ können zusätzlich die Zeitpunkte der Bildaufnahmen in Form einer Texttabelle erfasst werden.

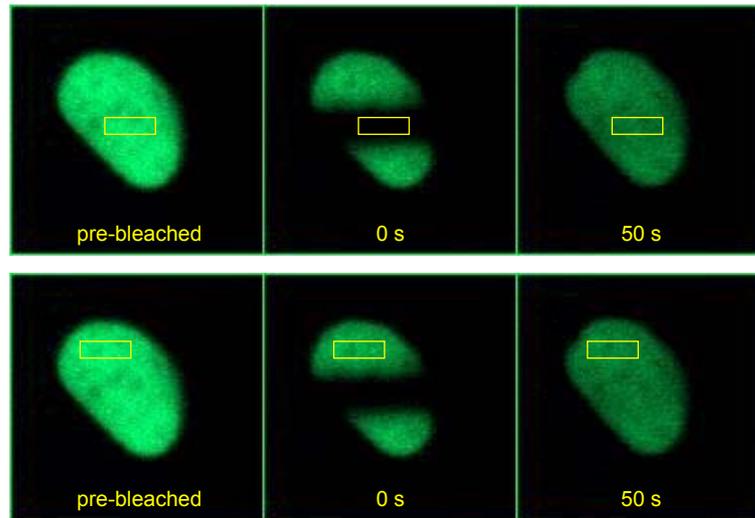


Abb. 12: Beispiel für die Auswertung von Zellen mit dem Programm ImageJ

Es werden zwei Bereiche festgelegt, einer in der geblichenen (obere Reihe), einer in der nicht-geblichenen Region des Zellkerns (untere Reihe). Das Programm misst die Fluoreszenz-Intensität automatisch in allen 400 Bildern. Die Daten werden in Form einer Texttabelle ausgegeben.

Normalisierung der Kurven und Darstellung der Daten

Die Daten der FRAP-Experimente wurden als Tabelle aus ImageJ exportiert und in MS Excel weiterverarbeitet.

Das gemessene Fluoreszenzsignal in einer ROI wird angeglichen auf die Veränderungen der totalen Fluoreszenz, was in der folgenden Formel umgesetzt wird (Kim et al., 2002):

$$I_{\text{rel}} = (T_t/T_o) / (I_{t0}/I_0)$$

Dabei ist T_t die Fluoreszenzintensität im geblichenen Bereich zu einem bestimmten Zeitpunkt t , T_o die Fluoreszenzintensität im nicht-geblichenen Bereich zu einem bestimmten Zeitpunkt t , I_{t0} die durchschnittliche Intensität in der geblichenen Region während der ‚pre-bleached‘-Phase und I_0 die durchschnittliche Intensität in der nicht-geblichenen Region während der ‚pre-bleached‘-Phase. Durch die Division I_{t0}/I_0 wird ein Korrekturfaktor angegeben, der die unterschiedlichen Intensitäten der ROIs im In- und out-Bereich angleicht. Die Zeit wird im Programm Excel in Sekunden nach dem Bleichen angegeben. Die Diffusionszeit $t_{1/2}$ ergibt sich aus der Hälfte der Fluoreszenzintensität in der geblichenen Region, die zum letzten Zeitpunkt gemessen wurde und wird in Sekunden abgelesen.

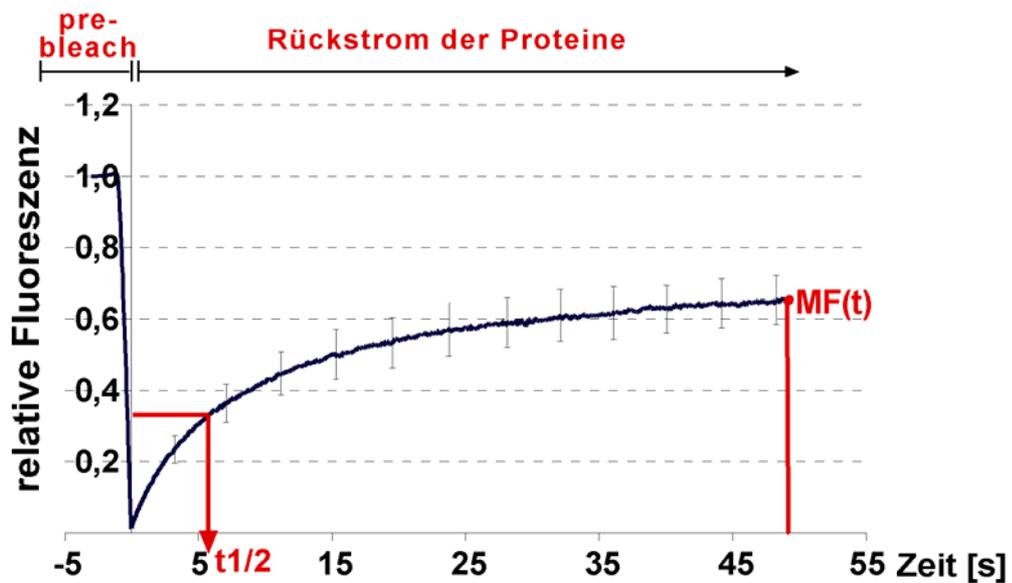


Abb. 13: Diagramm ausgewerteter FRAP-Daten

Dargestellt ist die exemplarische Auswertung der FRAP-Daten von 15 vermessenen Zellkernen. Die Kurve stellt die Mittelwerte aller Daten dar, mit den daraus resultierenden Standardabweichungen, die in den Fehlerbalken ausgedrückt werden. $t_{1/2}$ bezeichnet die Diffusionszeit, nach der die Hälfte des Proteins in den geblichenen Bereich zurückgeflossen ist, $MF(t)$ die mobile Fraktion zum letzten gemessenen Zeitpunkt.

Die Definition der mobilen Fraktion, und daraus resultierend auch der immobilen Fraktion, ergibt sich ebenfalls aus der Fluoreszenzintensität des letzten gemessenen Zeitpunkts. Die Werte werden in Prozent angegeben, bezogen auf eine 100% mobile Fraktion, die sich bei einer relativen Intensität von 1,0 am Ende der Messung ergeben würde.

4. Ergebnisse

4.1. Mutationsanalyse der konservierten SAF-Box

Die DNA-bindende Domäne des ‚Scaffold Attachment Factor A‘ (SAF-A) bindet spezifisch an architektonische Sequenzen im Genom, die so genannte SAR-DNA. Die dafür verantwortliche Domäne wird als SAF-Box bezeichnet und findet sich in diversen Proteinen eukaryotischer Organismen. Durch den Vergleich der SAF-Boxen unterschiedlichen Ursprungs konnten einige hochkonservierte Aminosäurepositionen identifiziert werden (Kipp et al., 2000). In den folgenden Versuchen sollte experimentell untersucht werden, welche dieser konservierten Aminosäuren für die DNA-Bindung der SAF-Box benötigt werden. Dazu wurde über Punktmutationen untersucht, welche Auswirkung ein Aminosäure-Austausch auf die Funktionalität der SAF-Box hat. Eine Punktmutationsanalyse der SAF-Box ermöglichte gleichzeitig die Überprüfung der potentiellen, zweiseitigen NLS 2 ($_{9}$ KKLKVSELKEELKRR₂₄), die innerhalb der SAF-Box-Aminosäuresequenz vorhergesagt wurde. Durch den Austausch basischer Aminosäuren kann die Funktionalität dieses Signals überprüft werden.

4.1.1. Klonierung der SAF-Box in eukaryotische Expressionsvektoren

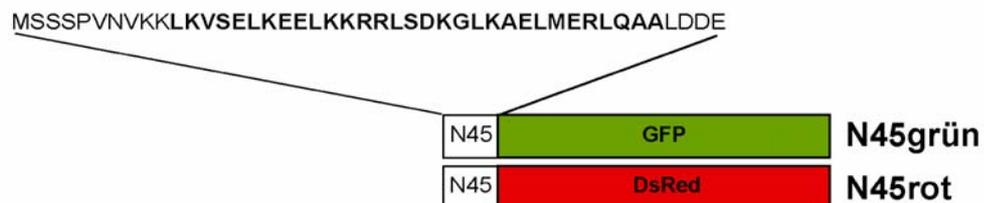
Zur Punktmutationsanalyse der SAF-Box wurden zunächst die ersten 45 Aminosäuren von SAF-A mit der SAF-Box (AS11-41) in einen eukaryotischen Expressionsvektor kloniert, so dass Fusionsproteine mit GFP oder DsRed entstehen (Abb. 14a).

Abb. 14b zeigt das typische Lokalisationsmuster der beiden Proteine in den Zellen. N45rot lokalisiert ausschließlich im Zellkern, während ein Teil des GFP-Fusionsproteins N45grün auch im Cytoplasma detektiert werden kann. Die Untersuchung mitotischer Zellen zeigt, dass N45grün nicht an Chromosomen bindet, während N45rot deutlich an den Chromosomen lokalisiert ist. Da beide Proteine die DNA-bindende Domäne des SAF-A aufweisen, muss dieser Unterschied durch das fusionierte Fluoreszenzprotein zustande kommen. Für die SAF-Box wurde gezeigt, dass eine spezifische, starke Bindung an DNA nur durch eine Multimerisierung mehrerer SAF-A-Moleküle möglich ist (Kipp et al., 2000). DsRed hat, im Gegensatz zu GFP, die Eigenschaft zu tetramersieren (Baird et al., 2000). Diese Tetramerisierung scheint hier die Multimerisierung des SAF-A zu imitieren und so die deutliche Bindung des N45rot an mitotische Chromosomen zu ermöglichen.

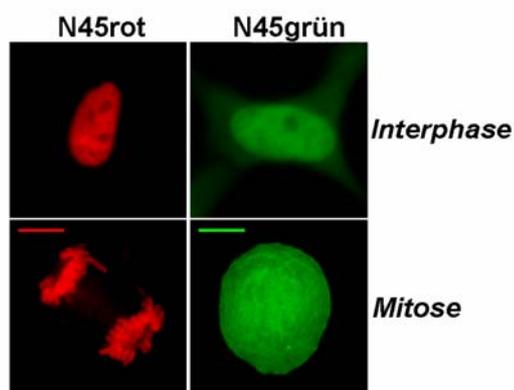
Die Expression beider Fusionsproteine wurde über SDS-Page und einen Westernblot analysiert (Abb. 14c). Der Expressionslevel beider Proteine ist vergleichbar und der SAF-Box-spezifische Antikörper K593 erkennt N45rot und N45grün bei einer Größe von ~36kDa.

Von beiden Konstrukten wurden durch G418-Selektion über 4-6 Wochen stabil exprimierende Zelllinien etabliert. Die folgenden Punktmutationen im Bereich der SAF-Box wurden allerdings nur bei N45rot eingeführt, weil die DNA-Bindung bei diesem Protein aufgrund der Tetramerisierung des DsRed gut zu beobachten ist.

a)



b)



c)

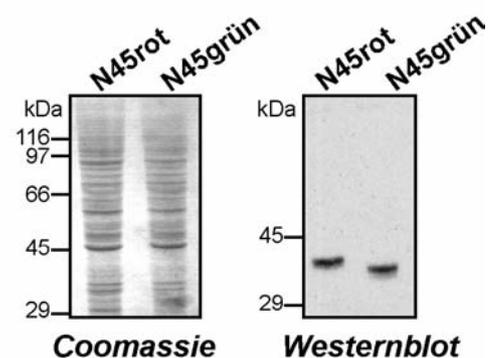


Abb. 14: Klonierung und Expression von N45rot und N45grün

a) Schematische Darstellung der Klonierung der ersten 45 Aminosäuren von SAF-A in die Vektoren EGFP-N1 und DsRed-N1.

b) HEK 293-Zellen wurden mit den Vektoren N45rot/grün transient transfiziert und nach 48 h fluoreszenzmikroskopisch analysiert (Balken: 10 µm).

c) Ganzzellextrakte von N45rot/grün transfizierten HEK 293-Zellen wurden auf 10% SDS-Gelen aufgetrennt und Coomassie gefärbt oder auf eine PVDF-Membran transferiert und mit K593 (1:1000) immungefärbt.

4.1.2. Einführung von Punktmutationen in N45rot

Die Mutationsanalyse der SAF-Box ermöglicht es durch gezielten Aminosäureaustausch zu bestimmen, welche der konservierten Aminosäuren für die DNA-Bindung des SAF-A benötigt werden. Außerdem erlauben die Punktmutationen die Überprüfung, welche der basischen Aminosäuren an dem potentiellen, zweiteiligen Kernlokalisationsignal NLS 2 ($_9$ KKLKVSELKEELKKRR $_{24}$) beteiligt sind. Durch eine ‚site-directed‘-Mutagenese-PCR wurden elf verschiedene Mutanten von N45rot hergestellt, bei denen entweder eine, zwei oder in einem Fall drei Aminosäuren der Originalsequenz durch Alanin ersetzt wurden.

a)

WT: MSSSPVNV**KKLKVSELKEELKKRR**LSDKGLKAELMERLQAA

K9/10A: MSSSPVNV**AA**LKVSELKEELKKRRLSDKGLKAELMERLQAA

K12A: MSSSPVNV**KKLAV**SELKEELKKRRLSDKGLKAELMERLQAA

K17A: MSSSPVNV**KKLKVSELAEEL**KKRRLSDKGLKAELMERLQAA

K22A: MSSSPVNV**KKLKVSELKEELKARR**LSDKGLKAELMERLQAA

K22R23A: MSSSPVNV**KKLKVSELKEELKAA**RLSDKGLKAELMERLQAA

K9/10/22A: MSSSPVNV**AA**LKVSELKEEL**KARR**LSDKGLKAELMERLQAA

G29A: MSSSPVNV**KKLKVSELKEELKKRR**LSDK**AL**KAELMERLQAA

K31A: MSSSPVNV**KKLKVSELKEELKKRR**LSDKGL**AA**EELMERLQAA

L34A: MSSSPVNV**KKLKVSELKEELKKRR**LSDKGLKAE**A**EMERLQAA

R37A: MSSSPVNV**KKLKVSELKEELKKRR**LSDKGLKAELME**AL**QAA

L38A: MSSSPVNV**KKLKVSELKEELKKRR**LSDKGLKAELME**RA**QAA

b)

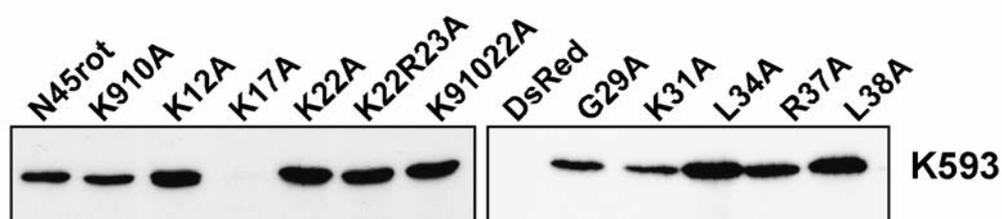


Abb. 15: Punktmutationen in N45rot

a) Schematische Darstellung der über PCR eingeführten Punktmutationen in den ersten 45 Aminosäuren von SAF-A. Der Bereich mit eventuell an der Kernlokalisierung beteiligten Aminosäuren ist blau markiert; im Wildtyp konservierte Aminosäuren werden fett schwarz markiert; die rot markierten Alanine zeigen die Position der ausgetauschten Aminosäuren an. Alle dargestellten Proteine sind carboxyterminal fusioniert an DsRed.

b) Identische Mengen von Ganzzelextrakten stabil exprimierender HEK 293-Zellen wurden auf einem 10% SDS-Gel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit dem SAF-Box-spezifischen Antikörper K593 (1:1000) inkubiert.

Sämtliche eingeführten Mutationen sind in Abb. 15a aufgeführt. Die mutierten Vektoren wurden durch Sequenzierung auf den tatsächlichen Austausch der Nukleotide überprüft. Anschließend wurde die DNA in HEK 293-Zellen transfiziert und die transiente Expression der Proteine über Fluoreszenzmikroskopie geprüft. Durch eine Selektion mit G418 über 4-6 Wochen wurden von sämtlichen Mutanten stabile Zelllinien etabliert.

Zur Überprüfung der Proteinexpression wurden in einem Westernblot identische Mengen Ganzzellextrakt aus stabil exprimierenden Zellen analysiert (Abb. 15b). Wie hier deutlich zu sehen ist, werden alle SAF-Box-Proteine bis auf K17A vom Antikörper erkannt. Bei der Mutante K17A scheint durch den Aminosäureaustausch ein Epitop des Antikörpers getroffen zu sein, so dass dieses Protein vom Antikörper gegen die SAF-Box nicht erkannt werden kann. DsRed wurde ausschließlich als Kontrolle verwendet und enthält keine SAF-Box-Sequenz, weswegen es von K593 nicht erkannt wird.

4.1.3. Subzelluläre Lokalisation der mutierten SAF-Box-Proteine

Um das Expressionsmuster und die Lokalisation der mutierten SAF-Box-Proteine in der Zelle beobachten zu können, wurden sämtliche stabilen Zelllinien fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

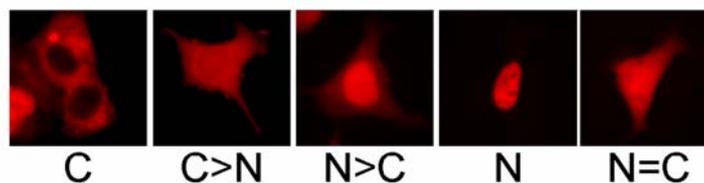
N45rot (Wildtyp) und die Mutante K22A lokalisieren ausschließlich im Zellkern, während alle anderen Proteine diverse Lokalisationsmuster aufweisen, die sich teilweise von Zelle zu Zelle unterscheiden (Abb. 16a). Bei einzelnen Zelllinien konnte zwar eine eindeutige Tendenz für ein Zellkompartiment beobachtet werden, zum Beispiel eine überwiegend cytoplasmatische Lokalisation der Proteine, aber auch in diesen Fällen wurden einzelne Zellen gefunden, die eine nukleäre Lokalisation des Proteins aufwiesen.

Um auszuschließen, dass diese unterschiedlichen Lokalisationsmuster während der Selektion (z.B. über den Integrationsort des Vektors im Genom) entstanden sind, wurde eine Zellsortierung durchgeführt, um Einzelzellklone zu erhalten. Für die folgenden Versuche wurden Zellklone ausgewählt, die eine von untransfizierten Zellen nicht unterscheidbare Generationszeit aufweisen und deren Fluoreszenzstärke in einem mittleren Bereich liegt, um Effekte überexprimierender Zellen auszuschließen. Die für die folgenden Versuche ausgewählten Zellklone werden in Abb. 16b aufgeführt.

Die sortierten Subklone zeigten jeweils wieder die unterschiedlichen Phänotypen, die bereits vor der Sortierung zu beobachten waren. Das heißt, die unterschiedliche Lokalisation der mutierten Proteine in der Zelle beruht, da hier Zellklone analysiert wurden, nicht auf genetischer Diversität in der transfizierten Population, sondern stellt den normalen Phänotyp der jeweiligen Zelllinie dar. Um die tatsächliche Lokalisation der

einzelnen Zelllinien besser beschreiben zu können, wurden die unterschiedlichen Lokalisationsmuster statistisch erfasst. Dazu wurden von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der einzelnen Zelllinien 150-180 Zellen bezüglich ihres Phänotyps ausgezählt. In der Übersicht Abb. 16b sind die Anteile der ausgezählten Zellen mit den entsprechenden Phänotypen dargestellt. Die häufigsten Lokalisationsmuster jeder Zelllinie wurden zusammengefasst, so dass sich der in der letzten Spalte beschriebene Phänotyp realistisch darstellt.

a)



b)

Konstrukt	Klon	C [%]	C>N [%]	N>C [%]	N [%]	N=C [%]	
N45rot	G6	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	N
K9/10A	G4	0,0	17,5	5,2	0,0	64,9	N=C
K12A	F11	15,9	24,6	28,9	0,0	30,4	C>N
K17A	E4	0,0	0,0	76,5	5,9	16,9	N>C
K22A	E11	0,0	0,0	0,0	90,5	9,5	N
K22R23A	B6/2	5,0	3,3	38,8	36,4	15,5	N>C
K9/10/22A	D10	20,9	20,9	7,6	0,0	42,8	N=C
G29A	B5	0,0	5,3	26,8	47,2	20,8	N
K31A	G5	10,3	12,0	40,0	0,0	37,7	N>C
L34A	C3	3,0	7,7	23,8	52,4	13,1	N
R37A	D8	1,3	8,7	36,2	0,0	53,7	N=C
L38A	E9	0,0	2,3	19,2	76,2	2,3	N
DsRed	B11	0,0	37,3	0,0	0,0	62,6	N=C

Abb. 16: Typische Lokalisation der mutierten SAF-Box-Proteine

a) Exemplarische Darstellung typischer Lokalisationsmuster mutierter SAF-Box-Proteine in HEK 293-Zellen. C: Zellkern ist ausgespart; C>N: Protein lokalisiert überwiegend im Cytoplasma; N>C: Protein befindet sich überwiegend im Zellkern; N: nukleäre Lokalisation; N=C: gleichmäßige Verteilung Kern/Cytoplasma.

b) Übersichtstabelle über typische Lokalisationsmuster aller mutierten SAF-Box-Proteine in stabilen, sortierten HEK 293-Zellen. 150-180 Zellen/Zelllinie wurden ausgezählt, die Anzahl der Zellen mit entsprechendem Phänotyp in Prozent angegeben. In der rechten Spalte (fett gedruckt) findet sich die Auswertung, wobei die häufigsten Phänotypen zusammengefasst wurden.

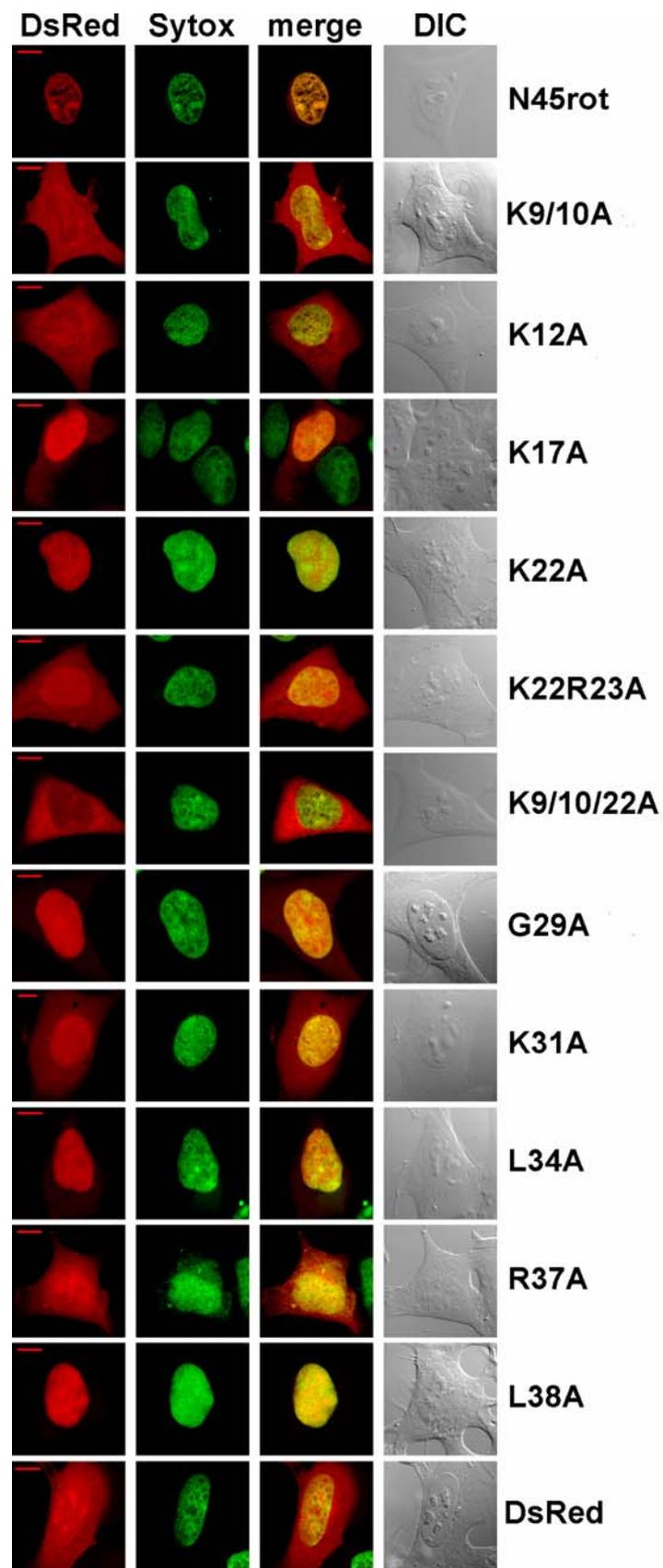


Abb. 17: Typische Lokalisation aller mutierter SAF-Box-Proteine

Stabil exprimierende, sortierte Zellen aller mutierten SAF-Box-Proteine wurden nach 24 h Wachstum auf Deckgläschen zur DNA-Färbung mit Sytox-Green inkubiert und mit dem konfokalen Mikroskop analysiert. Die dargestellten Zellen zeigen das typische Lokalisationsmuster der mutierten Proteine, des Wildtyps und des DsRed. Die angegebenen Größenbalken entsprechen 10 µm.

In Abb. 17 sind beispielhaft einzelne Zellen jeder stabilen, sortierten Zelllinie dargestellt, die die typische Lokalisation der mutierten Proteine zeigen. Die Aufnahmen zeigen einen konfokalen Schnitt durch fixierte Zellen, die zuvor mit dem DNA-Farbstoff Sytox-Green behandelt wurden.

Folgende Ergebnisse lassen sich bezüglich der potentiell zweiteiligen NLS 2 aus den Experimenten entnehmen: In den Aufnahmen der Abb. 17 wird deutlich, dass durch die Mutation an Lysin 9 und 10 die Kernlokalisierung des Proteins vermindert und im Fall des Lysin 12 zerstört wird. Die Aminosäuren Lysin 22 und Arginin 23 der zweiten basischen Region scheinen weniger an der Kernlokalisierung beteiligt zu sein, da die mutierten Proteine K22A und K22R23A weiterhin überwiegend im Zellkern lokalisiert sind. Ob ein zweiteiliges Kernlokalisierungssignal innerhalb der SAF-Box tatsächlich ausgeschlossen werden kann, soll in einem weiteren Experiment überprüft werden.

4.1.4. Analyse der potentiell zweiteiligen NLS

Die Kernlokalisierung des N45rot scheint nach den bisherigen Ergebnissen nicht auf einem zweiteiligen Signal zu beruhen. Im nächsten Versuch sollte geklärt werden, ob die basischen Aminosäuren 21-24 an der Kernlokalisierung beteiligt sind.

Dazu wurden über eine PCR die Aminosäuren 21-24 aus N45rot deletiert (siehe Abb. 18a). Der dabei entstandene Vektor N45 Δ aa21-24 wurde zur Kontrolle sequenziert und zur Analyse der Expression und Lokalisation des Proteins transient in HEK 293-Zellen transfiziert. Um N45 Δ aa21-24 konstitutiv in 293-Zellen zu exprimieren, wurden transient transfizierte Zellen für 4-6 Wochen einer G418-Selektion unterzogen.

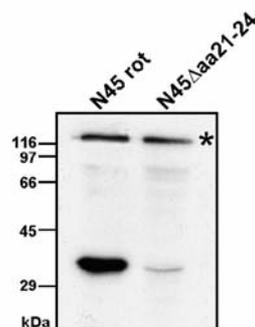
Die Expression des Proteins in stabil transfizierten Zellen wurde im Vergleich zum Wildtyp in einem Westernblot überprüft. Wie in Abb. 18b ersichtlich ist, wird auch N45 Δ aa21-24 vom SAF-Box-spezifischen Antikörper K593 erkannt, wenn auch wesentlich schwächer als der Wildtyp. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass eine geringere Expression des Proteins dafür nicht verantwortlich ist. Es ist wahrscheinlicher, dass der Antikörper K593 ein Epitop wegen der vier deletierten Aminosäuren nicht mehr ausreichend erkennen kann.

Den typischen Phänotyp N45 Δ aa21-24 stabil exprimierender HEK 293-Zellen zeigen die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abb. 18c. In Interphasezellen ist deutlich eine Anreicherung des Proteins im Zellkern zu sehen. Bei den Aufnahmen mitotischer Zellen sieht man, dass N45 Δ aa21-24 im Gegensatz zu N45rot nicht mehr an kondensierte Chromosomen binden kann.

a)

MSSSPVNVK~~KLK~~VSELKEEL**KKRR**LSDKGLKAELMERLQAALDDE WT N45rot
 MSSSPVNVK~~KLK~~VSELKEELLSDKGLKAELMERLQAALDDE N45 Δ aa21-24

b)



d)

Mutante	Lokalisation	[%]
N45 Δ aa21-24	C	1,1
	C>N	7,3
	N>C	38,5
	N	39,1
	N=C	14,0

c)

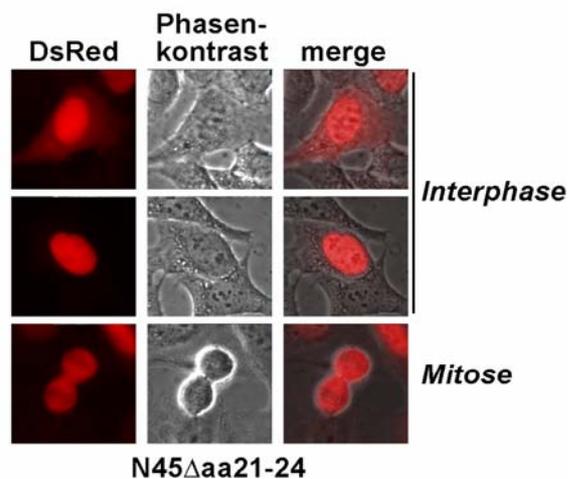


Abb. 18: Untersuchung der Mutante N45 Δ aa21-24

a) Schematische Darstellung der Deletion der Aminosäuren 21-24 aus N45rot. Beide Proteine sind am Carboxyterminus fusioniert mit DsRed.

b) Gleiche Mengen der Gesamtzellextrakte von konstitutiv N45rot und N45 Δ aa21-24 exprimierender HEK 293-Zellen wurden über eine 10% SDS-Page aufgetrennt und die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Erkennung der Proteine erfolgte mit dem SAF-Box-spezifischen Antikörper K593. Der Stern markiert die Position des endogenen SAF-A.

c) Die dargestellten Fluoreszenzaufnahmen N45 Δ aa21-24 stabil exprimierender HEK 293-Zellen zeigen die typische Lokalisation des Proteins in Interphasezellen und während der Zellteilung (Vergrößerung 630fach).

d) Übersichtstabelle der typische Lokalisationsmuster N45 Δ aa21-24 stabil exprimierender HEK 293-Zellen. 150 Zellen wurden ausgezählt; die Anzahl der Zellen mit entsprechendem Phänotyp sind in Prozent angegeben.

Auch N45 Δ aa21-24 zeigt ein von Zelle zu Zelle leicht unterschiedliches Lokalisationsmuster, allerdings bestätigte eine Auszählung die überwiegende Lokalisation des Proteins im Zellkern (Abb. 18d).

Dies zeigt, dass die Aminosäuren 21-24 nicht für die Kernlokalisierung notwendig sind. In den nächsten Versuchen soll nun überprüft werden, ob der erste kurze Abschnitt basischer Aminosäuren innerhalb der SAF-Box-Sequenz bereits ein funktionelles Kernlokalisierungssignal darstellt.

4.1.5. Überprüfung der Funktionalität der putativen NLS in SAF-A

Die Relevanz der basischen Aminosäuren 9, 10 und 12 für die Akkumulation des kompletten SAF-A im Zellkern wurde im folgenden Versuch überprüft. Dazu wurde über eine PCR die Sequenz ${}_{241}\text{KKRGVVKRPR}_{249}$ aus SAF-A/GFP deletiert, die einem vorhergesagten Kernlokalisierungssignal (NLS 1) entspricht (Kiledjian & Dreyfuss, 1992). Das resultierende Protein besitzt dann zur Kernlokalisierung nur noch die potentielle NLS 2 innerhalb der SAF-Box und ermöglicht dadurch auch die Überprüfung der Funktionalität der potentiellen NLS 1. Aus dem Vektor Δ N45/GFP, dem die SAF-Box fehlt, wurde als Kontrolle ebenfalls die NLS 1 deletiert, so dass das resultierende Protein überhaupt nicht im Kern lokalisiert sein sollte.

Die Klonierung ist schematisch in Abb. 19a dargestellt. Die Expression der Δ NLS/GFP-Fusionsproteine wurde in einen Westernblot analysiert. Wie in Abb. 19b zu sehen ist, werden beide Proteine mit der entsprechenden Größe vom α -GFP Antikörper detektiert. Der SAF-A-spezifische Antikörper dagegen zeigt nur das endogene SAF-A deutlich, die GFP-Fusionsproteine wurden erst bei sehr langer Exposition eines Filmes sichtbar.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Δ NLS-Konstrukte, transient transfiziert in HEK 293-Zellen, zeigen eindeutig eine cytoplasmatische Lokalisation beider Proteine in Interphase-Zellen (Abb. 19c). Während der Mitose kann SAF-A Δ NLS an mitotische Chromosomen binden, wobei es so aussieht, als wäre das Protein den Chromosomen aufgelagert, was dem Verhalten des SAF-A während der Zellteilung entspricht. Δ N45 Δ NLS bindet erwartungsgemäß nicht an kondensierte Chromosomen. Da bei diesem Protein beide möglichen Kernlokalisierungssignale deletiert wurden, überrascht die ausschließlich cytoplasmatische Lokalisation nicht. Der Ausschluss des SAF-A Δ NLS vom Kern zeigt aber deutlich, dass die potentielle NLS 2 innerhalb der SAF-Box nicht ausreicht, um das komplette SAF-A im Zellkern zu lokalisieren.

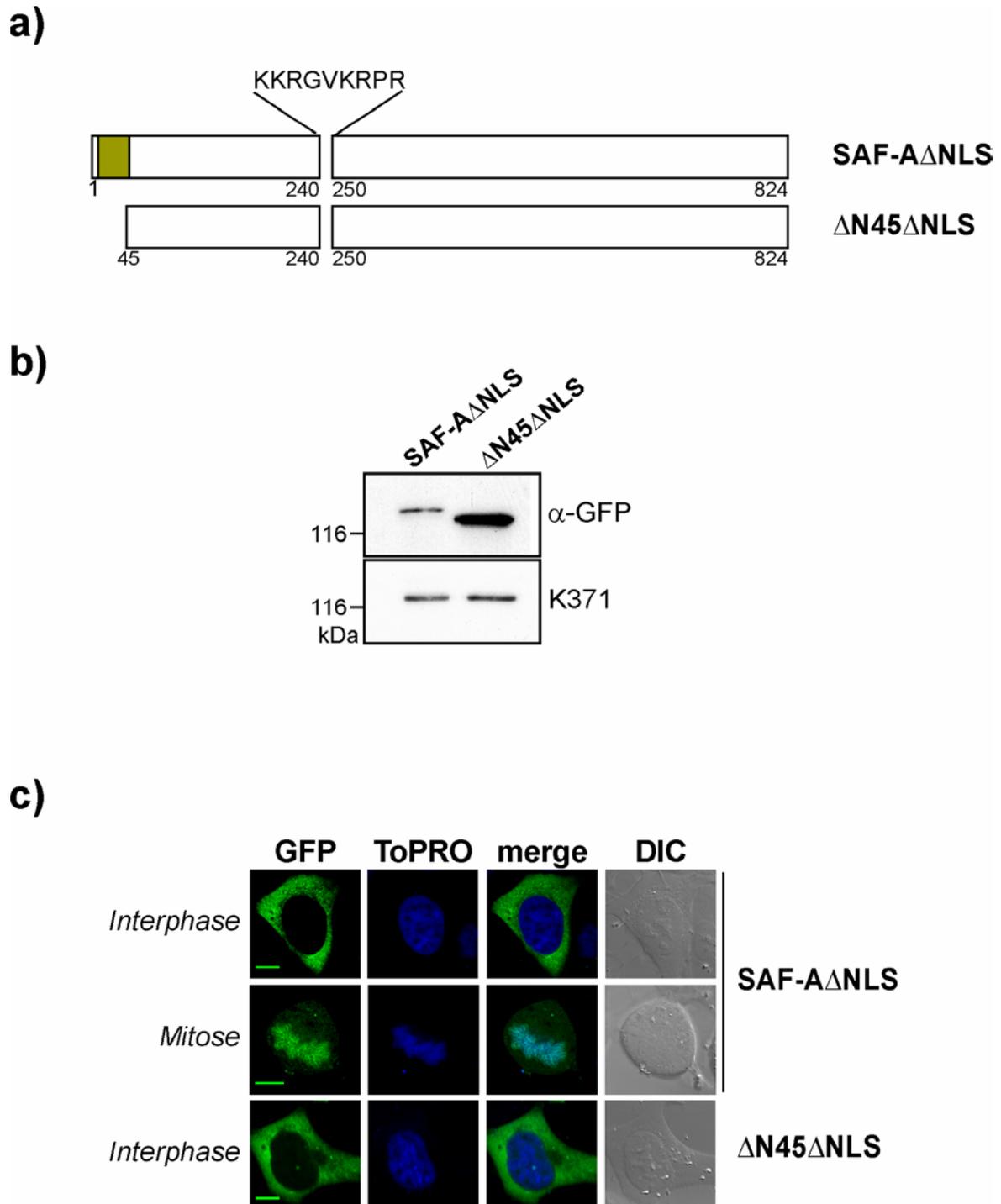


Abb. 19: Untersuchung der Δ NLS-Mutanten

a) Schematische Darstellung der mutierten Proteine SAF-A Δ NLS und Δ N45 Δ NLS. Beide Proteine sind am Carboxyterminus fusioniert mit GFP. Der Bereich der SAF-Box ist grün unterlegt, die deletierten Aminosäuren sind im Einzelnen angegeben.

b) Gleiche Mengen Gesamtzellextrakt von SAF-A Δ NLS und Δ N45 Δ NLS transient transfizierter HEK 293-Zellen wurden über eine 10% SDS-Page aufgetrennt und nach Transfer auf eine PVDF-Membran mit dem SAF-A-spezifischen Antikörper K371 oder α -GFP Antikörpern inkubiert. Der obere Teil desselben Western zeigt die mutierten GFP-Fusionsproteine, der untere Teil endogenes SAF-A.

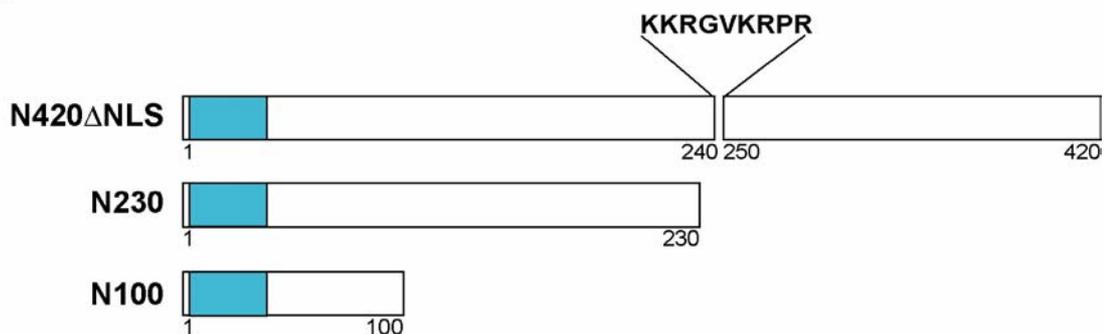
c) Fluoreszenzmikroskopie transient transfizierter HEK 293-Zellen. Die Zellen wurden auf Deckgläschen gezogen und 48 h nach Transfektion mit dem DNA-Farbstoff ToPRO-3 gefärbt und im konfokalen Mikroskop analysiert. Die angegebenen Größenbalken entsprechen 10 μ m.

Die Ergebnisse liefern außerdem erstmals einen Beweis für die Funktionalität der NLS 1 ($_{241}\text{KKRGVKRPR}_{249}$) in SAF-A. Durch die Deletion dieser Sequenz wurde SAF-A vom Zellkern ausgeschlossen, d.h. diese neun Aminosäuren stellen das funktionelle Kernlokalisierungssignal von SAF-A dar.

4.1.6. Analyse verkürzter aminoterminaler SAF-A-Konstrukte

N45rot lokalisiert ausschließlich im Zellkern, während die potentielle NLS 2 nicht ausreicht, um das gesamte SAF-A im Zellkern zu akkumulieren. In einem letzten Versuch sollte die Frage untersucht werden, ob die potentielle NLS 2 aus sterischen Gründen in SAF-A nicht erkannt werden kann, und ob dies in verkürzten Proteinen des SAF-A wieder möglich ist.

a)



b)

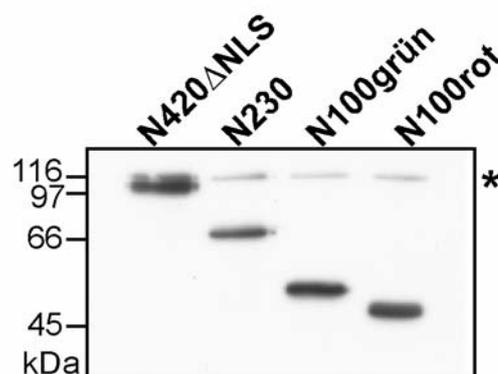


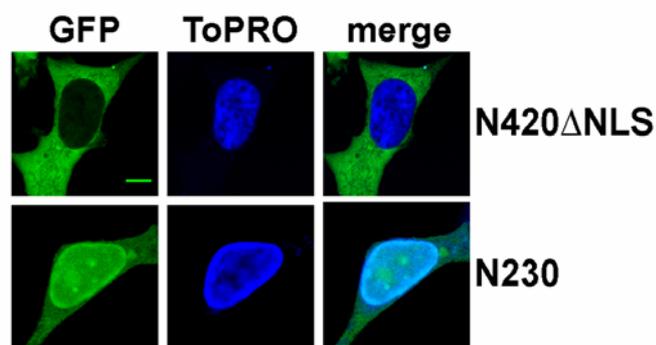
Abb. 20: Verkürzte aminoterminaler SAF-A-Konstrukte

a) Schematische Darstellung der verschiedenen aminoterminalen SAF-A-Konstrukte. Alle drei Konstrukte sind am Carboxyterminus fusioniert mit GFP; N100 wurde zusätzlich an DsRed fusioniert. Der Bereich der SAF-Box ist blau markiert.

b) Gleiche Mengen Gesamtzellextrakt von N420 Δ NLS, N230 und N100grün/rot transient transfizierter HEK 293-Zellen wurden über SDS-Page aufgetrennt und nach Transfer auf eine PVDF-Membran mit dem SAF-Box-spezifischen Antikörper K593 inkubiert. Der Westernblot zeigt die vier Fusionsproteine und endogenes SAF-A (markiert durch einen Stern).

Dazu wurden GFP/DsRed-Konstrukte hergestellt, die verschiedenen lange Bereiche des Aminoterminus von SAF-A enthalten. Die entsprechenden Fragmente wurden über PCR amplifiziert und sind in Abb. 20a schematisch dargestellt. Zunächst wurden die beiden längeren Fragmente N420 und N230 mit GFP, in späteren Experimenten wurde N100 mit GFP oder DsRed fusioniert.

a)



b)

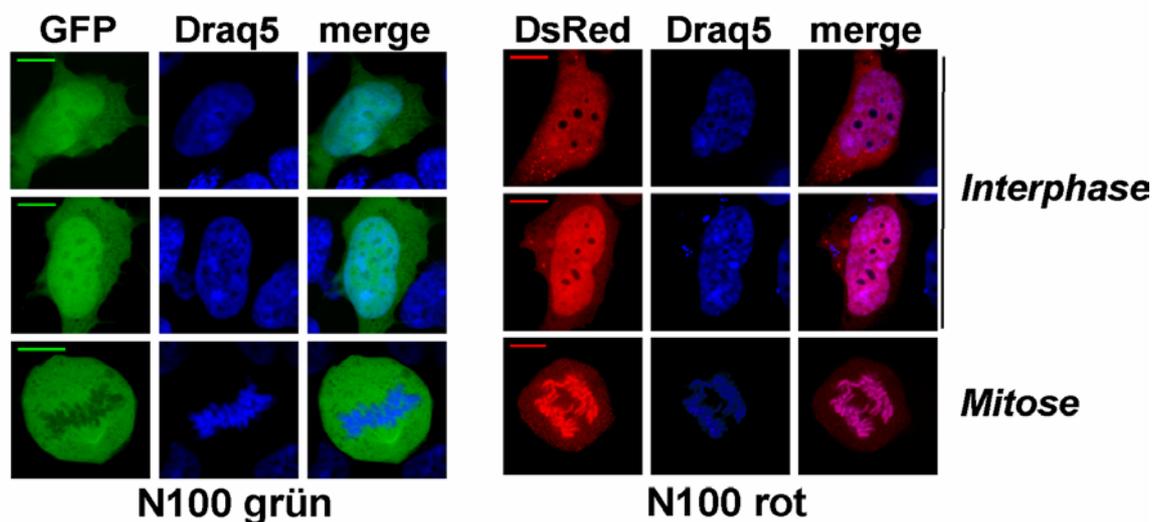


Abb. 21: Fluoreszenzaufnahmen aminoterminaler SAF-A-Konstrukte

Fluoreszenzmikroskopie transient mit N420 Δ NLS, N230 und N100rot/grün transfizierter HEK 293-Zellen. Die angegebenen Größenbalken entsprechen 10 μ m.

a) Die Zellen wurden auf Deckgläschen gezogen und 48 h nach Transfektion zur DNA-Färbung mit ToPRO-3 versehen und im konfokalen Mikroskop analysiert.

b) Die Zellen wurden auf Zellkulturschalen mit Glasboden gezogen, so dass sie lebend und mit Draq5 (membrangängiger DNA-Farbstoff) gefärbt unter dem konfokalen Mikroskop analysiert und fotografiert werden konnten.

Die Expression der vier Fusionsproteine wurde über einen Westernblot analysiert. Wie in Abb. 20b zu sehen ist, konnten hier alle Proteine bei der errechneten Größe vom SAF-Box-spezifischen Antikörper K593 detektiert werden. Das Signal des endogenen SAF-A zeigt, dass in jeder Spur identische Mengen der Ganzzellextrakte aufgetragen wurden.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen transient transfizierter HEK 293-Zellen in Abb. 21a zeigen für N420 Δ NLS eine eindeutig cytoplasmatische Lokalisation. Der Phänotyp entspricht dem des gesamten SAF-A mit deletierter NLS 1. Das heißt, das um etwa 420 Aminosäuren verkürzte Protein zeigt keine erhöhte Präferenz für den Zellkern. Das weiter verkürzte Fusionsprotein N230 dagegen akkumuliert, bis auf einen geringen Teil des Proteins, deutlich im Zellkern.

Die typischen Lokalisationsmuster der Proteine N100rot/grün in transient transfizierten HEK 293-Zellen zeigt Abb. 21b. Die Aufnahmen zeigen lebende Zellen nach DNA-Färbung. N100grün ist deutlich erkennbar im Zellkern angereichert, während N100rot in manchen Zellen auch im Cytoplasma lokalisiert. Um eine genauere Aussage zur Lokalisation dieser beiden Proteine treffen zu können, wurden von transient transfizierten Zellen über G418-Selektion in 6 Wochen stabile Zelllinien etabliert. Die Lokalisation der Proteine unterschied sich teilweise in stabil exprimierenden Zellen gegenüber der transienten Expression. N100rot lokalisiert stabil exprimiert in den meisten Zellen im Cytoplasma, während N100grün in allen Zellen deutlich im Zellkern akkumuliert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass einige der Aminosäuren in der SAF-Box-Sequenz eine Akkumulation verkürzter SAF-A-Proteine im Zellkern hervorrufen können, wenn diese nicht größer als 230 Aminosäuren sind.

4.1.7. Bindung mutierten SAF-Box-Proteine an mitotische Chromosomen

Die spezifische DNA-Bindung des SAF-A erfordert neben dem Vorhandensein der SAF-Box eine Multimerisierung der Proteine. Durch die Fusion der ersten 45 Aminosäuren des SAF-A an DsRed kann die Multimerisierung durch die Tetramerisierung des DsRed (Baird et al., 2000) imitiert werden. Dadurch ist es möglich, die DNA-Bindung der mutierten Proteine *in vivo* zu beobachten.

In einem ersten Versuch wurden mitotische Zellen stabil transfizierter HEK 293-Zellen, welche die mutierten SAF-Box-Proteine exprimieren, fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Abb. 22 zeigt die Lokalisation der elf mutierten Proteine und des Wildtyps während der Zellteilung. Die Bindung des Wildtyps an die kondensierten Chromosomen ist in jeder Phase der Mitose zu beobachten.

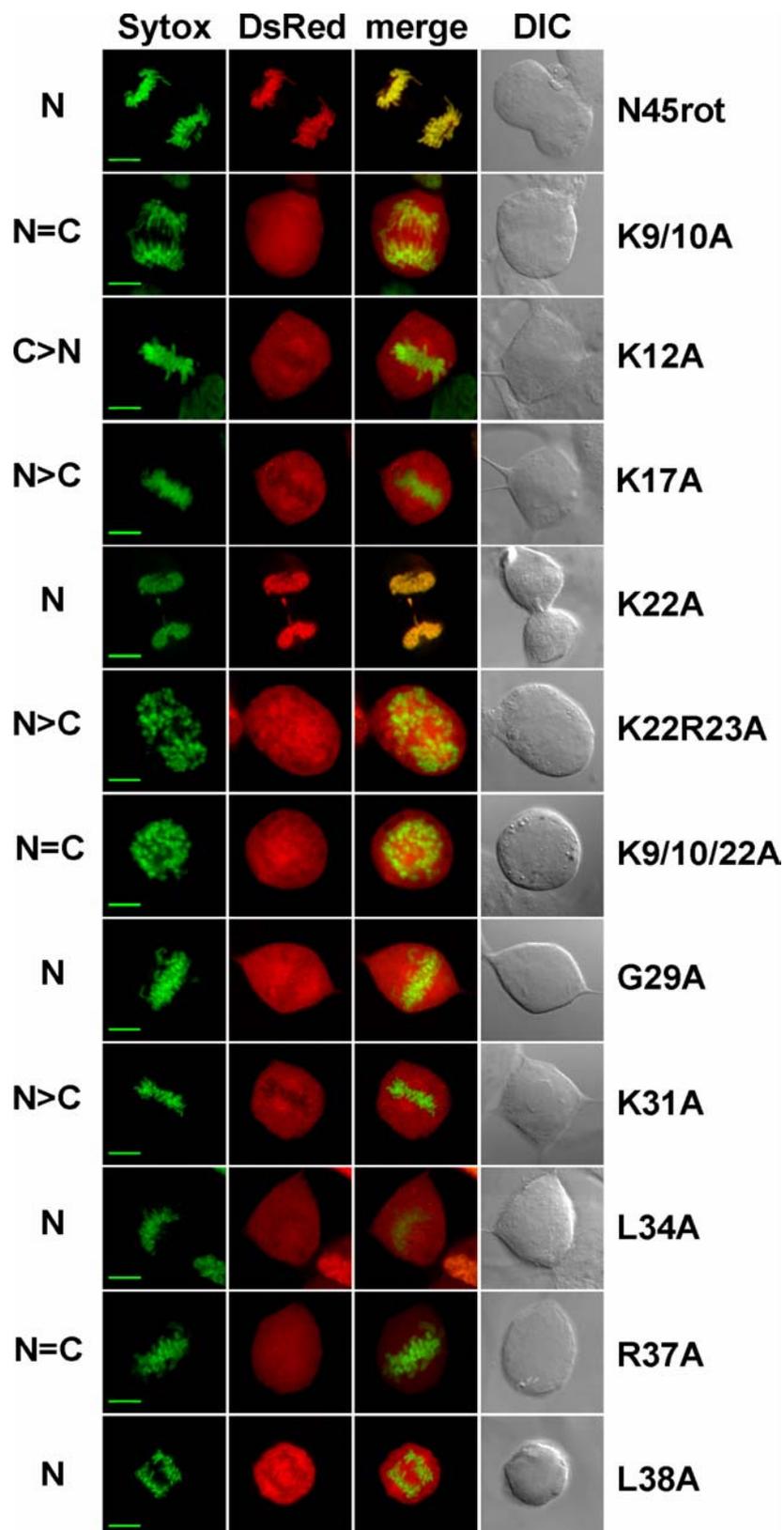


Abb. 22: Bindung der mutierten SAF-Box-Proteine an mitotische Chromosomen

Stabil exprimierende, sortierte HEK 293-Zellen der mutierten SAF-Box-Proteine wurden nach 24 h Wachstum auf Deckgläschen zur DNA-Färbung mit Sytox-Green behandelt und mit dem konfokalen Mikroskop analysiert. Die Aufnahmen zeigen die typische Lokalisation der mutierten SAF-Box-Proteine und des Wildtyps während der Zellteilung. Links neben den Bildern ist die subzelluläre Verteilung der jeweiligen Mutante in Interphasezellen angegeben. Die angegebenen Größenbalken entsprechen 10 μm .

Die Mutante K22A bindet ebenfalls an mitotische Chromosomen, allerdings nur bei Zellen in einer späten Ana- oder Telophase. In früheren mitotischen Phasen lokalisiert das Protein überwiegend im Cytoplasma. Die Aufnahmen mitotischer Zellen der Mutante K9/10A zeigen, dass die Chromosomen weder ausgespart sind (wie zum Beispiel bei K17A) noch dass Protein an die Chromosomen bindet (wie bei N45rot). Die verbleibenden neun mutierten SAF-Box-Proteine haben durch die Mutation die Fähigkeit an DNA zu binden verloren. Dies wird deutlich, da die kondensierten Chromosomen vom Protein ausgespart sind.

Die subzelluläre Lokalisation der einzelnen Mutanten ist in Abb. 22 links angegeben. Der Vergleich der Lokalisation der mutierten SAF-Box-Proteine in Interphasezellen mit Zellen während der Mitose zeigt eindeutig, dass die Lokalisation der Proteine im Zellkern unabhängig von der DNA-Bindung ist, da einige Mutanten, die im Zellkern lokalisiert sind, nicht an DNA binden können (zum Beispiel L34A oder G29A).

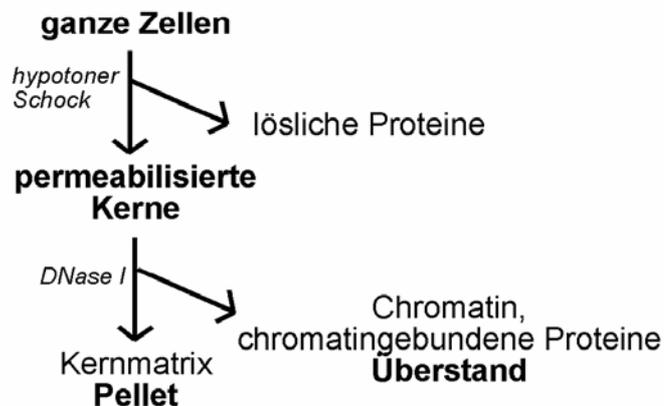
4.1.8. Protein-Chromatin-Bindungsassay

In den vorausgegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass N45rot *in vivo* an mitotische Chromosomen bindet. K22A bindet in späten mitotischen Phasen und K9/10A sehr schwach an mitotische Chromosomen. Um die DNA-Bindung dieser Proteine in einem biochemischen Versuchsansatz nachzuweisen, wurde ein Protein-Chromatin-Bindungsassay durchgeführt. In Abb. 23a ist die biochemische Fraktionierung der Kerne schematisch dargestellt, die nach Inkubation mit DNase in einer Fraktion mit Chromatin und Chromatin-gebundenen Proteinen sowie in einer Fraktion mit unlöslichen Kernbestandteilen (Kernmatrix) resultiert.

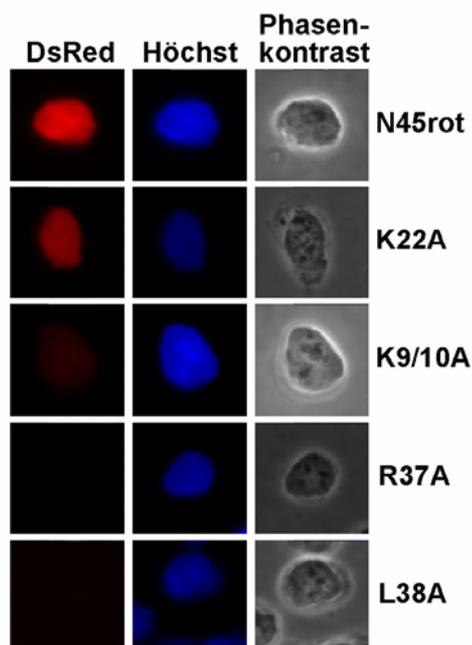
Für diesen Versuch wurden die stabil transfizierten HEK 293-Zelllinien der mutierten SAF-Box-Proteine verwendet. Nachdem im ersten Schritt die Zellkerne isoliert und durch hypotonen Schock permeabilisiert wurden, wurden Proben der Kerne fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Alle Proteine bis auf N45rot und K22A und K9/10A waren nach Permeabilisierung der Zellkerne fluoreszenzmikroskopisch nicht mehr zu erfassen. Für K9/10A konnte wieder ein intermediäres Verhalten beobachtet werden. Unter denselben fluoreszenzmikroskopischen Bedingungen wie für die anderen Zellen konnte hier, nach Permeabilisierung der Kerne, nur noch eine schwache Fluoreszenz in den Zellkernen detektiert werden.

Dies zeigt, dass der Wildtyp und die Mutante K22A als einzige der 13 untersuchten Proteine (11 mutierte SAF-Box-Proteine, N45rot und DsRed) deutlich – höchstwahrscheinlich an DNA – im Zellkern gebunden sind.

a)



b)



c)

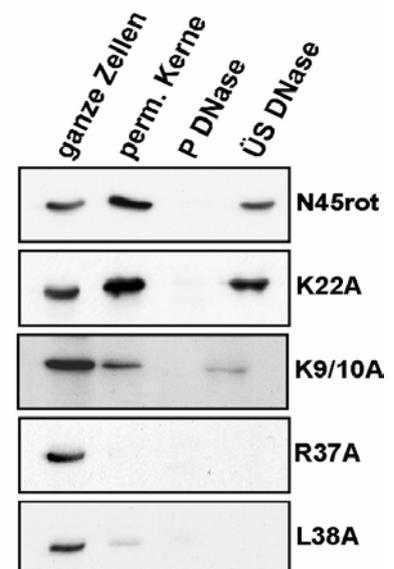


Abb. 23: Chromatin-Protein-Bindungsassay mutierter SAF-Box-Proteine

a) Schematische Darstellung der biochemischen Fraktionierungsmethode

b) Aufnahmen von isolierten, permeabilisierten Zellkernen stabil exprimierender HEK 293-Zellen. Die Bilder wurden an einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMRA-Mikroskop) nach vorausgegangener DNA-Färbung mit Hoechst 33258 aufgenommen (Vergrößerung: 630fach).

c) Identische Mengen (1% bezogen auf die Ausgangsmenge) der vier Fraktionen des Chromatin-Bindungsassays mit stabil transfizierten HEK 293-Zellen wurden auf einem 10% SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Detektiert wurden die Proteine von dem SAF-Box-spezifischen Antikörper K593.

Die Aufnahmen der permeabilisierten Zellkerne, die für den DNase-Verdau weiterverwendet wurden, sind in Abb. 23b dargestellt. Ausgewählt wurden Zellen, die N45rot, K22A und K9/10A exprimieren, da diese Proteine noch in permeabilisierten Kernen zu detektieren sind. Zur Kontrolle wurden parallel Mutanten mit deutlicher Lokalisation im Zellkern (L38A) und mit teilweise cytoplasmatischer Lokalisation (R37A) untersucht. Durch den DNase-Verdau wurden Proteine, die mit DNA assoziieren, abgelöst und konnten nach Zentrifugation der Probe von unlöslichen Kernbestandteilen abgetrennt werden. Beide Fraktionen wurden mit einer Probe des gesamten Zelllysats und einer Probe der permeabilisierten Kerne über einen Westernblot analysiert. Der Wildtyp und die Mutante K22A konnten im Überstand nach DNase-Verdau nachgewiesen werden, d.h. sie sind an Chromatin gebunden (Abb. 23c). Die Mutante K9/10A kann ebenso in diesem Überstand detektiert werden, jedoch ist die Menge des Proteins, wie in der Probe der permeabilisierten Kerne, wesentlich geringer als bei N45rot und K22A. Die Kontrollproteine R37A und L38A waren schon in den Fraktion der permeabilisierten Kerne nicht mehr nachzuweisen. Dies zeigt, dass diese Proteine frei im Zellkern vorliegen.

4.1.9. Chromatinfractionierung einiger ausgewählter SAF-Box-Mutanten

Bislang konnte gezeigt werden, dass nur N45rot und K22A eine deutliche DNA-Bindung aufweisen. Da K22A bei der Bindung mitotischer Chromosomen ein verändertes Verhalten im Vergleich zu N45rot aufweist, soll in diesem Versuch geklärt werden, ob dem eine unterschiedliche Präferenz für bestimmte Chromatinfractionen zugrunde liegt. Um festzustellen, welche Proteine mit transkriptionell aktivem (S1-Fraktion) und welche mit inaktivem Chromatin (S2-Fraktion) assoziieren, wurde eine Fraktionierungsmethode ausgewählt, die auf einem Verdau mit *Micrococcus* Nuklease und anschließender Extraktion mit EDTA beruht (Reyes et al., 1997; Rose & Garrard, 1984).

Zunächst wurden Zellkerne von Zellen permeabilisiert, die stabil N45rot, K9/10A, K12A und K22A exprimieren. Anschließend wurden die Kerne für 1, 2 oder 4 Minuten mit *Micrococcus* Nuklease behandelt und abzentrifugiert. Der Überstand (S1) enthält viel mononucleosomale DNA und die damit assoziierten Proteine. Das Pellet wurde in 2 mM EDTA resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Mit dem Überstand (S2) erhält man nucleosomale DNA, weitgehend ohne mononucleosomale Partikel. Fest am Kerngerüst assoziierte DNA unterschiedlicher Größe und die daran gebundenen Proteine befinden sich im Pellet (P).

In Abb. 24a sieht man exemplarisch ein Agarosegel der Chromatinfractionierung von K22A, auf dem identische Mengen aller neun Fraktionen aufgetrennt wurden. Die Fraktionen enthalten die DNA-Fragmente erwarteter Größe und zeigen das typische Bild dieser Fraktionierungsmethode.

Die Fraktionen S1, S2 und P wurden in einem Westernblot mit dem SAF-Box-spezifischen Antikörper K593 analysiert (Abb. 24b). Die Auswertung der Ergebnisse zeigt keine eindeutige Bevorzugung transkriptionell aktiver DNA für den Wildtyp oder K22A. Auch die schwach an DNA bindende Mutante K9/10A ist in allen Fraktionen vorhanden, wenn auch in wesentlich geringerer Menge. K12A verlässt schon nach Permeabilisierung den Zellkern und wurde als Negativ-Kontrolle der Chromatinfractionierung unterzogen. Das endogene SAF-A ist bei diesen Fraktionierungen in den S1-Fraktionen angereichert, also an transkriptionell aktiver DNA.

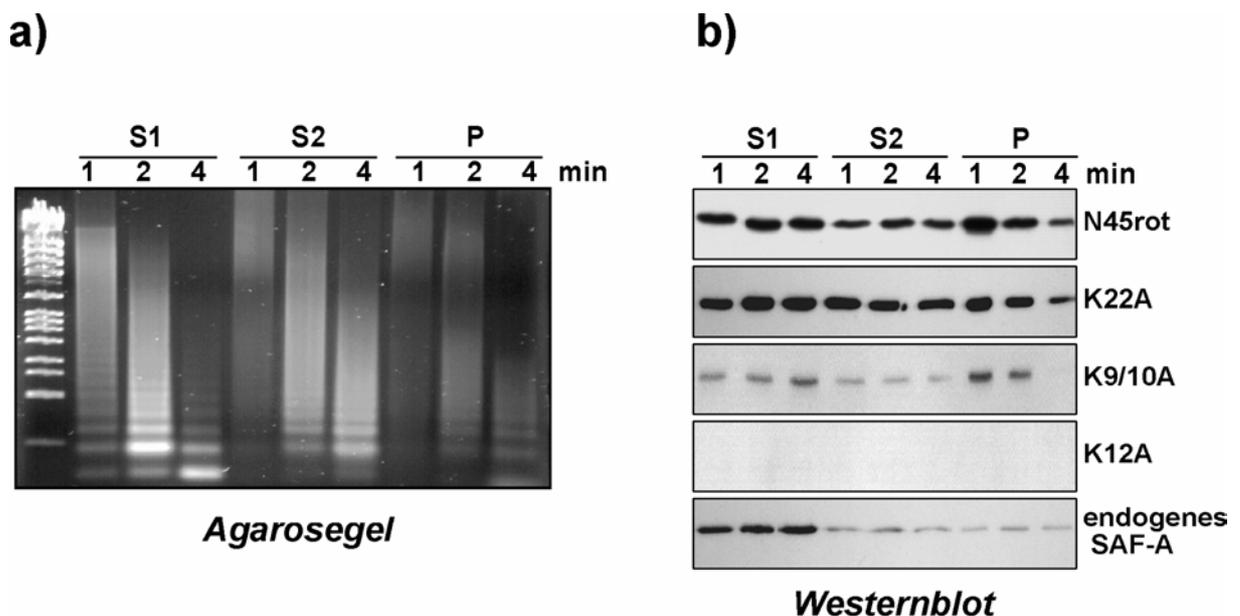


Abb. 24: Chromatinfractionierung

Von stabil exprimierenden HEK 293-Zellen der abgebildeten Zelllinien wurden Zellkerne isoliert. Nach Permeabilisierung wurden die Kerne mit 300 U Micrococcus Nuklease für die angegebene Zeit inkubiert und durch Zentrifugation in Überstand (S1) und Pellet getrennt. Das Pellet wurde in EDTA gelöst und abzentrifugiert, um den zweiten Überstand (S2) und das Pellet (P) zu erhalten.

a) Die DNA-Fractionen wurden in identischen Mengen auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt und Ethidiumbromid gefärbt. Dargestellt ist das Agarosegel mit den DNA-Fractionen der Mutante K22A.

b) Identische Volumen jeder Fraktion wurden nach Wessel-Flügge-Fällung auf einem 10% SDS-Gel aufgetrennt und nach Transfer auf eine PVDF-Membran mit dem SAF-Box-spezifischen Antikörper K593 (1:1000) detektiert.

4.1.10. Mobilitätsmessung *in vivo*

Im folgenden Experiment wurde eine Methode zur Messung der Mobilität von Proteinen in lebenden Zellen, ‚Fluorescence Recovery after Photobleaching‘ (FRAP), angewendet. Dabei werden mit einem konfokalen Lasermikroskop fluoreszierende Proteine in einem definierten Bereich einer Zelle oder eines Zellkerns mit starker Lasereinstrahlung irreversibel geblichen. Der anschließende Rückstrom fluoreszierender Proteine von der nicht-geblichenen in die geblichene Region wird über einen definierten Zeitraum in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen festgehalten. Die Auswertung der Aufnahmen durch die Bestimmung der mittleren Intensität der Fluoreszenz wird von Computerprogrammen wie ImageJ ermöglicht. Zur Visualisierung der Daten wird die relative Intensität der Fluoreszenz gegen die Zeit aufgetragen. Zwei Parameter können anhand der Kurve bestimmt werden: die Diffusionszeit ($t_{1/2}$) und die mobile Fraktion (MF). Die mobile Fraktion kann 100% sein, wenn das Protein in gelöster Form vorliegt oder nur sehr schwach an immobile Zellkernbestandteile bindet.

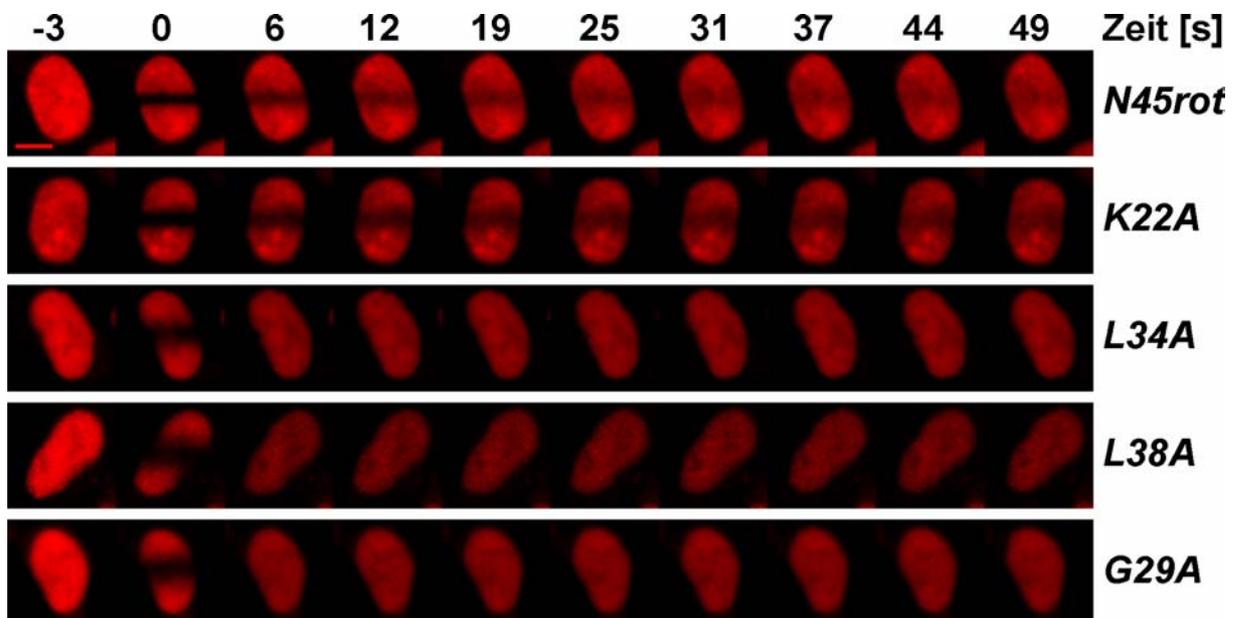
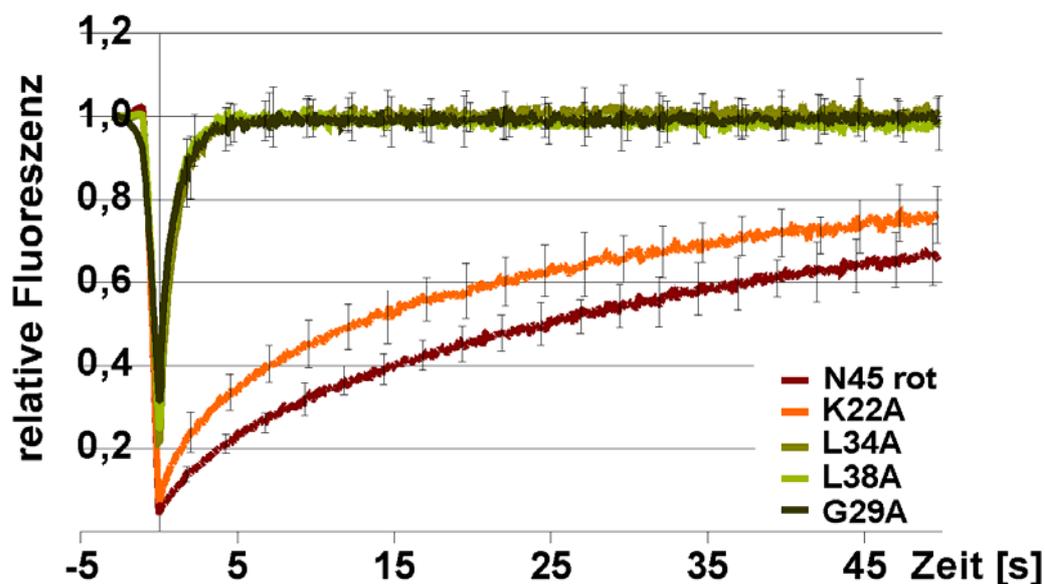


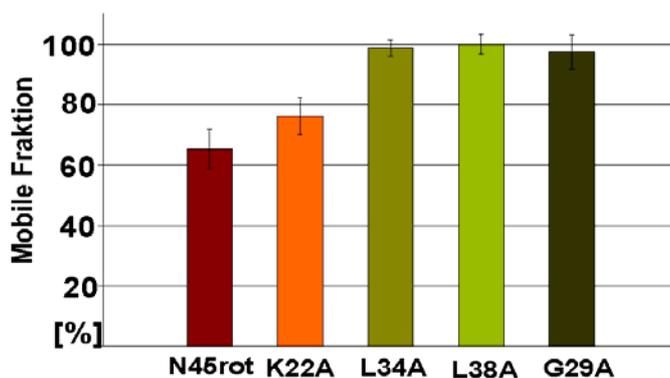
Abb. 25: FRAP-Analysen mutierter SAF-Box-Proteine

Die Abbildung zeigt fluoreszenzmikroskopisch aufgenommene Zellkerne stabil N45rot, K22A, L34A, L38A und G29A exprimierender HEK 293-Zellen. Dargestellt sind repräsentative Zellkerne vor dem Bleichen (Zeitpunkt -3), der Zellkern direkt nach dem Bleichen (Zeitpunkt 0) und der Rückstrom fluoreszierender Proteine in die geblichene Region. Die Größe der aufgenommenen Zellkerne ist durch einen Balken angegeben (10 µm).

a)



b)



c)

Protein	t1/2 [s]
N45rot	9,93
K22A	6,53
G29A	0,25
L34A	0,25
L38A	0,37

Abb. 26: Auswertung der FRAP-Daten mutierter SAF-Box-Proteine

a) Rückstrom-Kurven von fünf mutierten SAF-Box-Proteinen. Gezeigt werden normierte Kurven der Proteine, denen die Mittelwerte von 15 repräsentativen Zellkernen zugrunde liegen. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

b) Darstellung der mobilen Fraktionen der fünf untersuchten Proteine. Zum letzten gemessenen Zeitpunkt (49 Sekunden) wurden die mobilen Fraktionen definiert und auf 100% normiert. Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichung von 15 analysierten Zellkernen/Protein.

c) Tabellarische Darstellung der gemessenen Zeit zum Rückstrom der Hälfte des Proteins ($t_{1/2}$).

In den durchgeführten FRAP-Experimenten wurden sämtliche mutierten SAF-Box-Proteine untersucht, die deutlich im Zellkern lokalisieren. Die Experimente wurden mit den im Methodenteil beschriebenen Parametern für DsRed durchgeführt und die Daten anschließend ausgewertet.

In Abb. 25 sind die fünf mutierten Proteine zu sehen, die für dieses Experiment verwendet wurden. Dargestellt ist ein Zellkern jeweils vor dem Bleich-Impuls, direkt nach dem Bleichen und das Rückströmen der Proteine in die geblichene Region zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Wie bereits an diesen Aufnahmen zu sehen ist, ist der geblichene Bereich des Wildtyp-Proteins und der Mutante K22A auch nach 49 Sekunden noch deutlich zu erkennen, d.h. der Austausch von fluoreszierenden und geblichenen Proteinen ist hier langsamer als bei den anderen drei Mutanten L34A, L38A und G29A. Bei dem Vergleich der Zellen zum Zeitpunkt vor dem Bleichen (-3) mit dem Zeitpunkt direkt nach Bleichen (0) wird deutlich, dass bei diesen Messungen ein deutlicher Verlust der totalen Fluoreszenz durch den Bleichvorgang eintritt.

Die Auswertung der Daten zeigt den Verlauf des Rückstroms der Proteine im Mittel für alle durchgeführten Messungen (Abb. 25a). Dabei wurde die Intensität im geblichenen Bereich und die im nicht-geblichenen Bereich normiert.

Deutlich zu sehen ist, dass die Proteine ohne DNA-Bindung eine höhere Mobilität aufweisen als die Proteine N45rot und K22A. Die mobile Fraktion der Proteine G29A, L34A und L38A beträgt 100%, was bedeutet, dass diese Proteine im Zellkern gelöst vorliegen (Abb. 26b). Die Diffusionszeiten dieser mobilen Proteine liegen zwischen 0,25 und 0,37 Sekunden, d.h. sie sind ungefähr 40 bzw. 27 mal schneller als das Wildtyp-Protein. Für K22A ist die Diffusionszeit etwas geringer als für den Wildtyp, was auch in einer leicht erhöhten Mobilität zum Ausdruck kommt.

4.2. Auswirkung einer Punktmutation in Gesamt-SAF-A

Durch die oben beschriebenen Punktmutationen innerhalb der SAF-Box wird in fast allen Fällen die Fähigkeit zur DNA-Bindung aufgehoben. Welche Auswirkungen eine Mutation in der SAF-Box auf die Funktion des kompletten SAF-A hat, wurde im folgenden Teilprojekt näher untersucht. Dazu wurde eine Punktmutation an einer in der SAF-Box hochkonservierten Aminosäure in Gesamt-SAF-A eingeführt.

4.2.1. Klonierung und Analyse der Mutante SAFG29A

Das Glycin an Position 29 der SAF-Box ist eine hochkonservierte Aminosäure, wie Aminosäuresequenzvergleiche diverser eukaryotischer SAF-Box-Proteine zeigen (siehe Einleitung). Über eine ‚site-directed‘-Mutagenese-PCR wurde dieses Glycin gegen ein Alanin ausgetauscht. Das kodierte Protein entspricht daher dem kompletten SAF-A/GFP mit einer einzigen Punktmutation.

Transient mit SAFG29A und SAF-A/GFP transfizierte HEK 293-Zellen werden in Abb. 27a dargestellt. SAFG29A ist, wie SAF-A/GFP, ein ausschließlich im Zellkern lokalisiertes Protein. Auffällig bei der Lokalisation des SAFG29A ist, dass in Bereichen, in denen das Protein akkumuliert, keine DNA detektiert werden kann. Diese Lokalisation unterscheidet sich deutlich vom Wildtyp-Protein, das mit Chromatin exakt kolokalisiert. Um die Lokalisation des SAFG29A in stabil exprimierenden Zellen analysieren zu können, wurden transient transfizierte Zellen mit G418 selektioniert. Während der Selektion konnte beobachtet werden, dass SAFG29A nicht gut toleriert wird, da nur schwach exprimierende Zellen erfolgreich vermehrt werden konnten. Um die Ausbeute an fluoreszierenden Zellen zu erhöhen und eine homogene Zellpopulation zu erhalten, wurde mit dieser stabilen Zelllinie eine Massensortierung durchgeführt. Dabei wurden Zellen mit einer mittleren Fluoreszenzstärke aus der Gesamtpopulation aussortiert.

Abb. 27b zeigt die Lokalisation von SAFG29A in stabil exprimierenden HEK 293-Zellen. Die subnukleäre Verteilung des mutierten Proteins unterscheidet sich leicht von den transient exprimierenden Zellen, aber auch hier ist deutlich erkennbar, dass sich die Lokalisation der DNA mit der des SAFG29A gegenseitig ausschließt. Bei den konstitutiv SAFG29A exprimierenden Zellen konnten zwei Lokalisationsmuster detektiert werden, wobei der seltenere Phänotyp (8% der analysierten Zellen) wahrscheinlich durch eine stärkere Expression der Proteine zustande kommt. Bei diesem Phänotyp zeigt das Protein, wie bei transient exprimiertem SAFG29A, eine dreidimensionale Struktur, die ähnlich einem Schwamm den Zellkern durchspannt. Dagegen konnte in den meisten stabil exprimierenden HEK 293-Zellen eine homogenere Verteilung des SAFG29A beobachtet werden. Während der Mitose bindet SAF-A/GFP mit dem für SAF-A typischen Verhalten an kondensierte Chromosomen (Abb. 27c). Bei der Mutante SAFG29A ist der Bereich der kondensierten Chromosomen vom Protein ausgespart. SAFG29A kann demnach durch die Mutation am Glycin 29 nicht mehr an mitotische Chromosomen binden, dies entspricht den Beobachtungen an der isolierten SAF-Box.

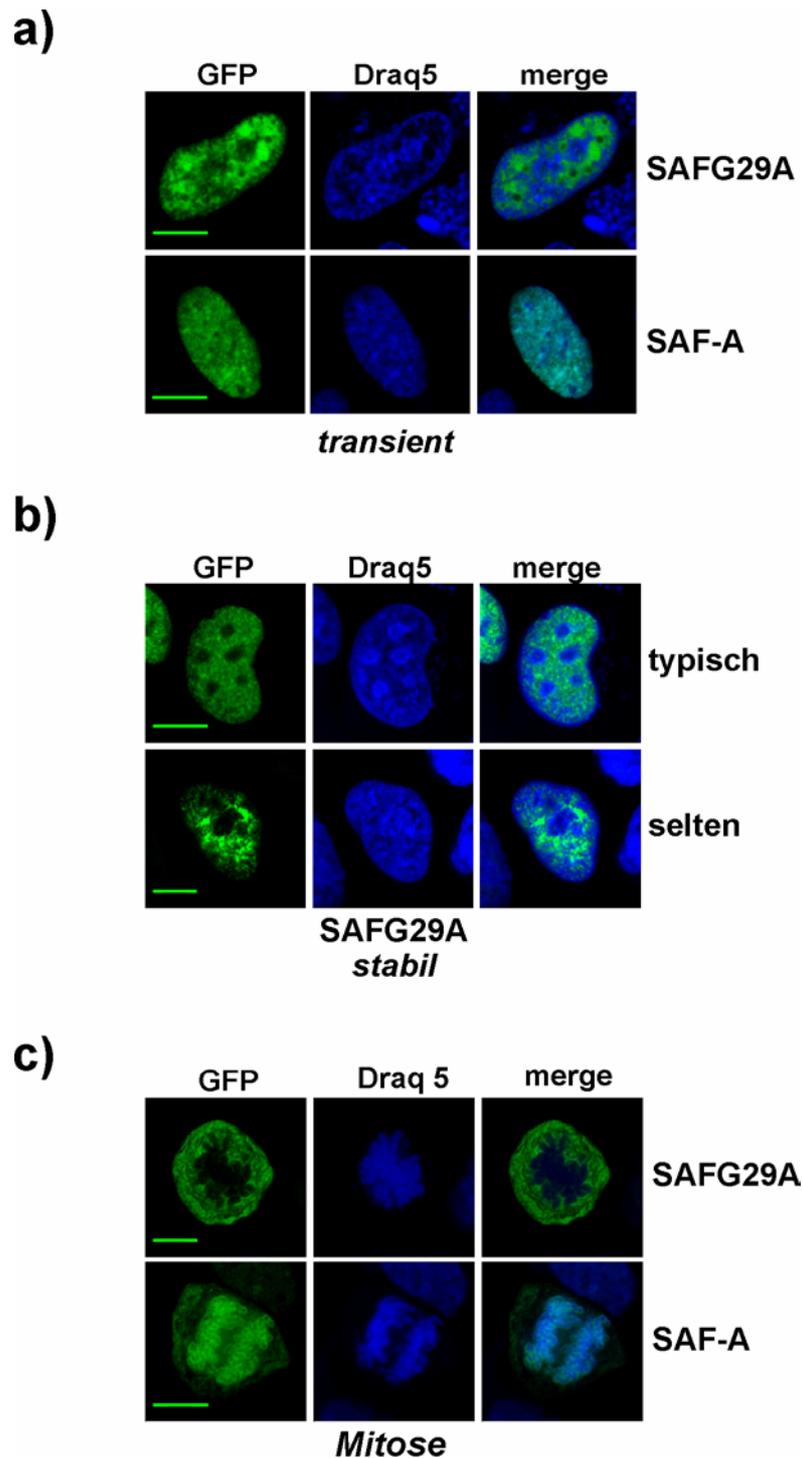


Abb. 27: Typische Lokalisation des SAFG29A in HEK 293-Zellen

a) HEK 293-Zellen wurden transient mit SAFG29A und SAF-A transfiziert und nach 48 h lebend fluoreszenzmikroskopisch untersucht und fotografiert. Die DNA wurde mit Draq5 gefärbt.

b) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen konstitutiv SAFG29A exprimierender 293-Zellen. Die DNA wurde mit Draq5 gefärbt. Die typische Lokalisation des SAFG29A wird in den oberen Bildern angegeben. Die unteren Aufnahmen zeigen eine alternative Lokalisation bei etwa 8% der Zellen.

c) Aufnahmen stabil SAFG29A und SAF-A exprimierender 293-Zellen während der Mitose. Dargestellt sind die GFP-fusionierten Proteine und die über Draq5 gefärbte DNA sowie eine Überlagerung beider Aufnahmen. Der angegebene Balken entspricht 10 µm.

4.2.2. Einfluss der SAF-Box auf die Mobilität des SAF-A

Die Lokalisation von SAFG29A ähnelt stark derjenigen des Konstruktes Δ N45, dem die gesamte SAF-Box fehlt. Im Folgenden soll untersucht werden, ob SAFG29A mit Δ N45 vergleichbar ist und wie sich die Mobilität der Proteine durch das Fehlen der SAF-Box oder durch eine defekte SAF-Box verändert. Dazu wurden HEK 293-Zellen, die konstitutiv SAF-A, SAFG29A und Δ N45 exprimieren einer FRAP-Analyse unterzogen.

Der typische Verlauf eines FRAP-Experimentes für das jeweilige Protein ist in Abb. 28 gezeigt. Die Aufnahmen zeigen deutlich, dass der Rückstrom des Wildtyp SAF-A in den geblichenen Bereich wesentlich langsamer verläuft als bei den SAF-Box-mutierten oder -deletierten Proteinen. Der geblichene Zellkernbereich ist bei diesen beiden Proteinen auch nach 49 Sekunden noch zu erkennen, aber wesentlich mehr Protein als beim Wildtyp ist in den Bereich zurückgekehrt.

Eine quantitative Erfassung dieser Ergebnisse zeigt Abb. 29a. Die Proteine SAFG29A und Δ N45, die beide nicht mehr an mitotische Chromosomen binden können, zeigen hier eine deutlich erhöhte Mobilität im Vergleich zu Wildtyp SAF-A. Da sich die Fehlerbalken teilweise überschneiden, kann man zumindest im späten Zeitraum der Messung davon ausgehen, dass die mutierten Proteine eine ähnliche Mobilität aufweisen. Am Endpunkt der Messung sind nur 28% (+/- 4,5) von SAF-A, aber 54% (+/- 4,9) von SAFG29A bzw. 65% (+/- 7,2) von Δ N45 in den geblichenen Bereich zurückgekehrt (Abb. 29b).

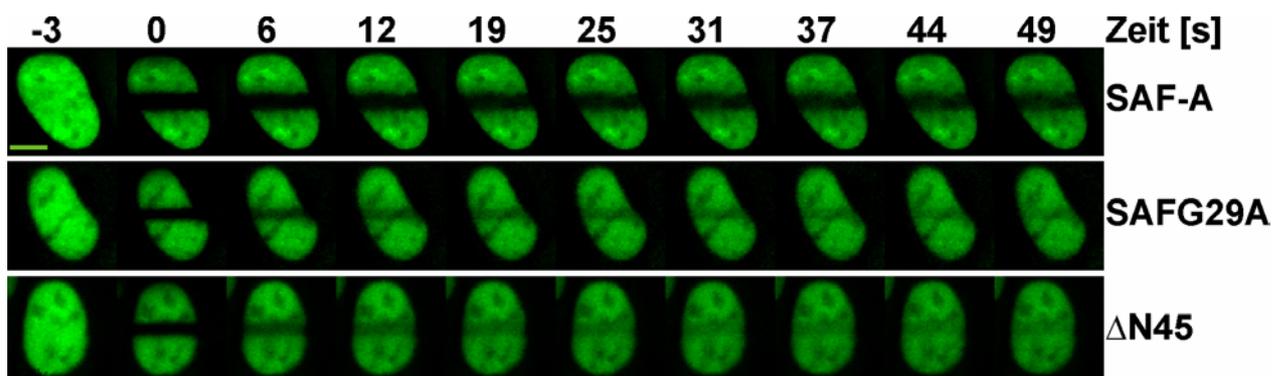
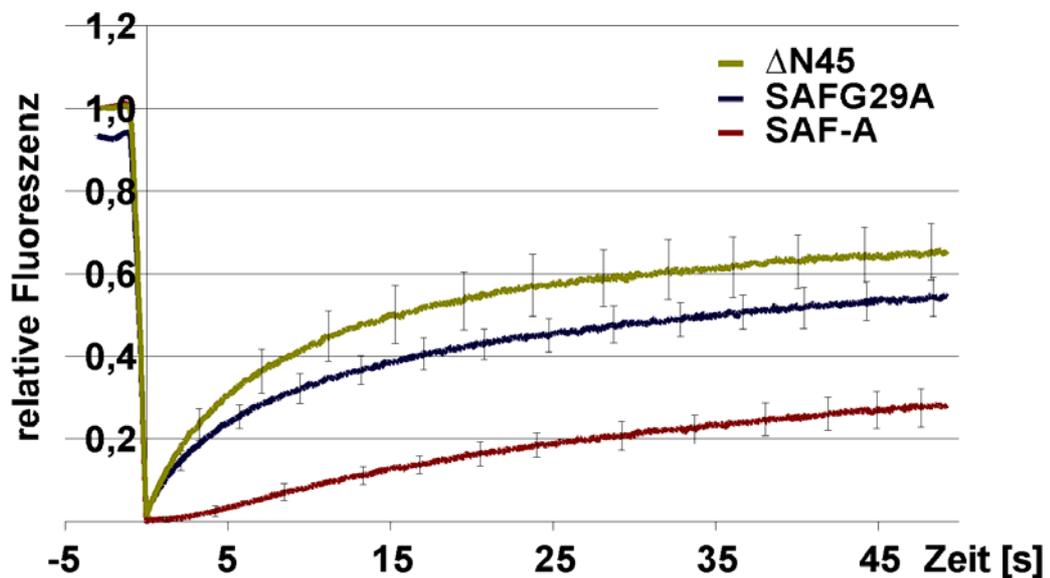


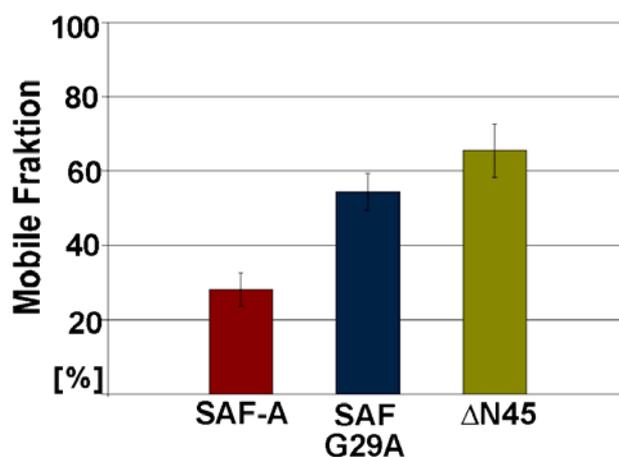
Abb. 28: Rückstrom der Proteine nach Bleichen einer definierten Region

Die Abbildung zeigt fluoreszenzmikroskopisch aufgenommene Zellkerne stabil SAF-A, SAFG29A und Δ N45 exprimierender HEK 293-Zellen. Dargestellt sind repräsentative Zellkerne vor dem Bleichen (Zeitpunkt -3), der Zellkern direkt nach dem Bleichen (Zeitpunkt 0) und der Rückstrom fluoreszierender Proteine in die geblichene Region. Die Größe der aufgenommenen Zellkerne ist durch einen Balken angegeben (10 μ m).

a)



b)



c)

Protein	t1/2 [s]
SAF-A	17,42
SAFG29A	6,47
ΔN45	5,72

Abb. 29: Auswirkungen der DNA-Bindung auf die Mobilität von SAF-A

a) Graphische Darstellung des Rückstroms der fluoreszierenden Proteine in den geblichenen Bereich gegen die Zeit. Den normierten Kurven der Proteine SAF-A, SAFG29A und Δ N45 liegen die Mittelwerte von je 15 repräsentativen Zellkernen zugrunde. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen.

b) Darstellung der mobilen Fraktionen der fünf untersuchten Proteine. Zum letzten gemessenen Zeitpunkt (~50 s) wurden die mobilen Fraktionen definiert, gemittelt und auf 100% normiert. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung von je 15 repräsentativen Zellkernen.

c) Tabelle der gemessenen Zeit zum Rückstrom der Hälfte des Proteins ($t_{1/2}$).

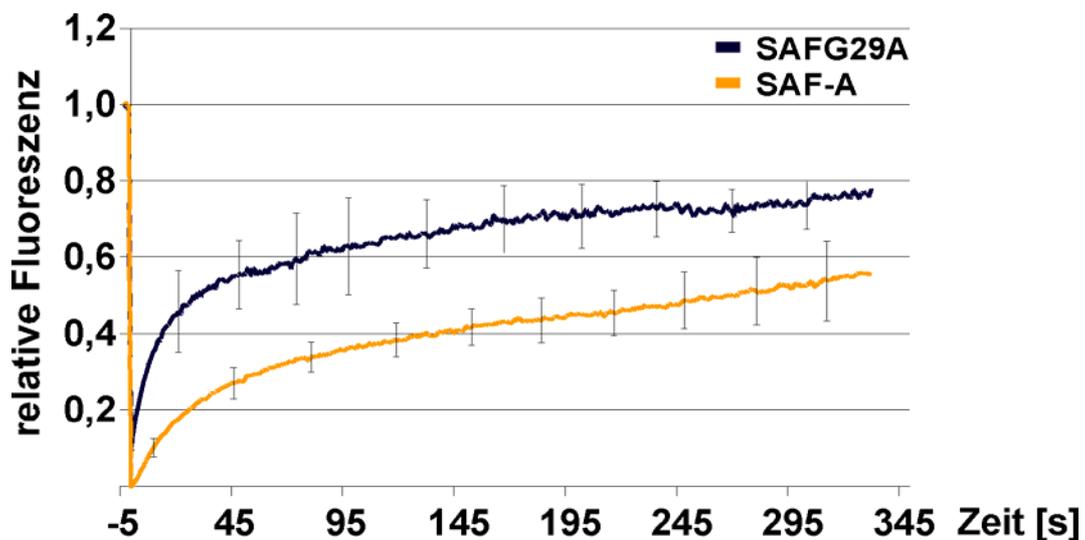


Abb. 30: Langzeitmessung des Rückstroms geblichener SAF-A und SAFG29A Proteine
 Graphische Darstellung des Rückstroms der fluoreszierenden Proteine in den geblichenen Bereich gegen die Zeit. Den normierten Kurven der Proteine SAF-A und SAFG29A liegen die Mittelwerte von je 10 repräsentativen Zellkernen zugrunde. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

Aus den Kurven wird ersichtlich, dass noch kein Ausgleich zwischen dem geblichenen Bereich und dem nicht geblichenen Bereich stattgefunden hat, da die Kurven kein Plateau erreichen. Daher wurde für SAFG29A und SAF-A/GFP eine Langzeitmessung über einen Zeitraum von 335 Sekunden durchgeführt (Abb. 30).

Die erhaltenen Kurven stellen vermutlich die Überlagerung einer klassischen Rückstromkurve mit einem linearen Anstieg über die Zeit dar. Die Anwesenheit von zwei Proteinpopulationen erklärt die Kurven. SAF-A und SAFG29A enthalten eine mobile Fraktion, sowie eine größere Fraktion, die transient an Strukturen gebunden und dadurch zeitweise immobil ist (siehe Diskussion Kapitel 5.3.1.). Die höhere Mobilität des SAFG29A ist insgesamt, allerdings auch bei dieser Langzeitmessung deutlich erkennbar. Die FRAP-Experimente zeigen, dass SAF-A ein immobiles Protein ist und die SAF-Box durch Bindung an DNA an dieser Immobilität beteiligt ist.

4.2.3. Zellfraktionierung SAFG29A transfizierter Zellen

Das letzte Experiment zeigte, dass SAFG29A im Zellkern lebender Zellen zu ~46% immobil ist. Da eine Bindung an Chromatin ausgeschlossen werden kann, war das Ziel dieses Versuches herauszufinden, an welcher Struktur innerhalb des Zellkerns SAFG29A hauptsächlich gebunden ist.

Dazu wurden HEK 293-Zellen transient mit SAFG29A transfiziert und auf Deckgläschen kultiviert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen einer klassischen *in situ* Zellfraktionierung zur Präparation eines Kerngerüsts unterzogen.

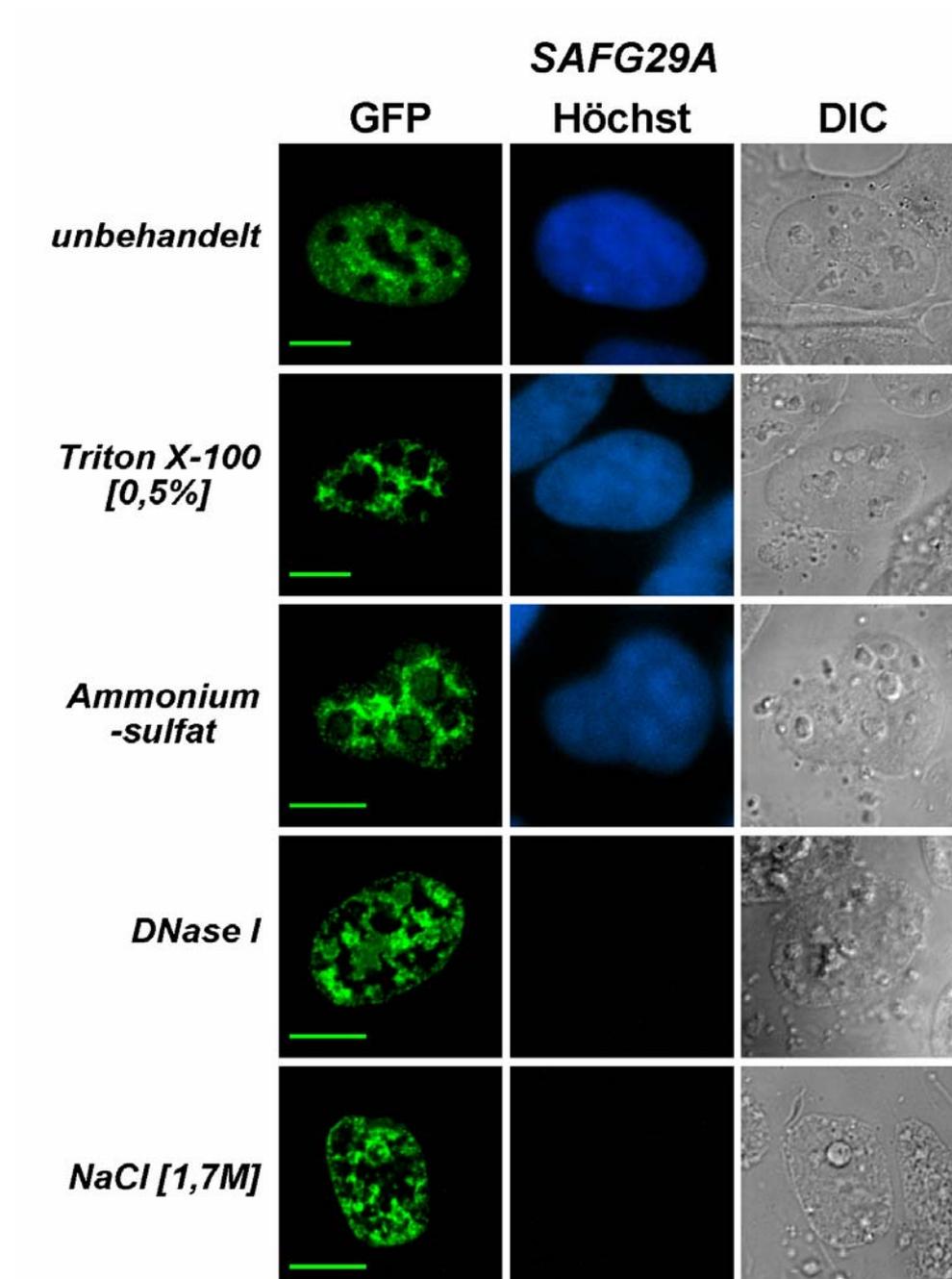


Abb. 31: Zellfraktionierung von SAFG29A transfizierten HEK 293-Zellen

Mit SAFG29A transient transfizierte HEK 293-Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und 48 h nach Transfektion fraktioniert. Die Fraktionierungsschritte (von oben nach unten) wurden, wie in Methoden beschrieben, ausgeführt und die Zellen anschließend konfokal fluoreszenzmikroskopisch analysiert und aufgenommen. Die DNA wurde mit Höchst 33258 gefärbt. Der Balken entspricht 10 μm .

Im Verlauf dieser Fraktionierung werden nach Permeabilisierung der Zellmembran und Fällung mit Ammoniumsulfat zunächst lösliche Proteine extrahiert. Im nächsten Schritt wurden durch einen Verdau mit DNase und anschließender Ammoniumsulfatfällung DNA-bindende Proteine entfernt. Die folgende Behandlung der Zellen mit 1,7 M NaCl lässt nur salzstabil an Kernmatrixstrukturen gebundene Proteine zurück. Nach jedem Fraktionierungsschritt wurden die Zellen eingebettet und konfokal fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Die Aufnahmen in Abb. 31 zeigen die typische Verteilung des SAFG29A in HEK 293-Zellen nach den aufeinander folgenden Fraktionierungsschritten. Die unbehandelte Zelle zeigt den typischen Phänotyp SAFG29A exprimierender HEK 293-Zellen: Bereiche mit stark gefärbtem Chromatin sind frei von SAFG29A. Beim ersten Fraktionierungsschritt geht relativ wenig Protein verloren. In den darauf folgenden Fraktionierungsschritten, der Behandlung mit DNase und der Hochsalzextraktion, verändert sich die ausgebildete Struktur wenig. SAFG29A bleibt im Zellkern mit einer schwammartigen, dreidimensionalen Struktur gebunden. Um die Puffer und Versuchsbedingungen zu überprüfen, wurden parallel zu diesem Versuch transfizierte HEK 293-Zellen fraktioniert, die lösliche oder Kernmatrix-gebundene Proteine exprimieren. Zur Kontrolle des DNase-Verdau im dritten Fraktionierungsschritt wurde die DNA der Zellen nach jedem Schritt mit Höchst 33258 gefärbt (Abb. 31, mittlere Spalte). Das beschriebene Experiment zur Matrixpräparation wurde mehrfach wiederholt, um präparative Artefakte auszuschließen.

4.2.4. Vergleich der Expression von SAFG29A in transient und stabil transfizierten HEK 293-Zellen

Bei der Etablierung stabil SAFG29A exprimierender Zelllinien war auffällig, dass nur Zellen mit schwacher Expression des mutierten Proteins die Selektion überlebten. Zur Quantifizierung wurde die Expression des SAFG29A in transient und stabil exprimierenden Zellen verglichen. Dazu wurden Gesamtproteinextrakte über eine 10% SDS-Page aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die GFP-fusionierten Proteine wurden über den α -GFP Antikörper detektiert, das endogene SAF-A mit dem SAF-A-spezifischen Antikörper K371. Abb. 32a zeigt den Westernblot für transient mit SAFG29A und SAF-A transfizierte HEK 293-Zellen. Die GFP-fusionierten Proteine werden stark exprimiert und zeigen mengenmäßig kaum Unterschiede zum endogenen SAF-A. Beim Westernblot mit stabil transfizierten SAF-A/GFP und SAFG29A werden dagegen deutliche Unterschiede sichtbar (Abb. 32b). In diesem Versuch wurden abnehmende Mengen der Gesamtproteinextrakte konstitutiv SAFG29A und SAF-A/GFP

exprimierender 293-Zellen aufgetragen. SAFG29A und Wildtyp SAF-A/GFP sind mit dem SAF-A-spezifischen Antikörper K371 bei kurzer Exposition nicht zu detektieren, während endogenes SAF-A deutlich sichtbar ist. Auch die Detektion über den α -GFP Antikörper zeigte erst bei einer Exposition von 40 min erkennbare Banden von GFP-fusioniertem Protein. Die Daten zeigen, dass die Menge an exprimiertem GFP-Fusionsprotein im Vergleich zu endogenem SAF-A sehr gering ist.

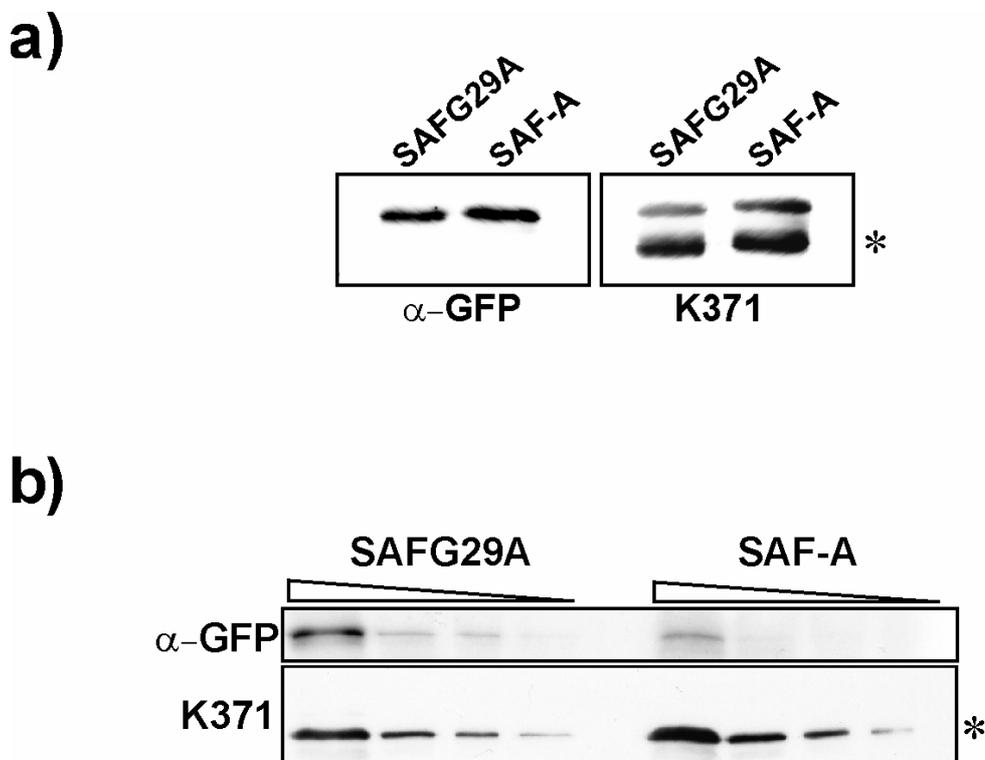


Abb. 32: Proteingehalt transient und stabil exprimierender HEK 293-Zellen

a) HEK 293-Zellen wurden transient mit SAFG29A und SAF-A/GFP transfiziert. Nach 48 h in Kultur wurden die Zellen geerntet. Gleiche Mengen der Gesamtproteinextrakte wurden nach 10% SDS-Page auf eine PVDF-Membran transferiert und mit α -GFP Antikörper zur Detektion der Fusionsproteine oder mit dem SAF-A-spezifischen Antikörper K371 gefärbt.

b) Gesamtproteinextrakte stabil SAFG29A und SAF-A/GFP exprimierender HEK 293-Zellen wurden in abnehmenden Mengen auf einem 10% SDS-Gel aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wurde die Membran mit dem SAF-A-spezifischen Antikörper K371 oder mit α -GFP Antikörpern gefärbt. Die Expositionszeit der dargestellten Filme betrug bei der GFP-Färbung 40 min, während die Expositionszeit bei der Färbung mit K371 lediglich 3 min betrug. Der Stern (*) markiert endogenes SAF-A.

Eine konstitutive Expression der Proteine ist bei einer geringen Proteinmenge möglich, stärker exprimierende Zellen sterben offenbar während der Selektion ab. Die Analyse der Proteinmenge in transient bzw. stabil transfizierten Zellen stimmen mit den Beobachtungen bei der Etablierung der stabilen Zelllinien überein. Nur wenig SAFG29A (und auch SAF-A/GFP) wird von HEK 293-Zellen toleriert. Für SAFG29A konnte des Weiteren beobachtet werden, dass auch die stabilen Zelllinien bei längerer Kultivierung immer weniger grün fluoreszierende Zellen aufweisen. Dies bedeutet, dass auch die schwach exprimierenden Zellen gegenüber untransfizierten Zellen im Nachteil sind, so dass sie mit der Zeit von ihnen verdrängt werden.

Die Auswirkung der Expression dieser Proteine auf der Ebene der Replikation sollte in einem weiteren Experiment genauer analysiert werden.

4.2.5. Auswirkung der SAFG29A-Expression auf die Replikation

Replizierte DNA lässt sich über Bromdesoxyuridin (BrdU) nachweisen, das statt Thymin in die DNA eingebaut wird. Mit Hilfe dieser Methode soll die Auswirkung einer SAFG29A-Expression in HEK 293-Zellen auf die Replikation analysiert werden. Für diesen Versuch wurden HEK 293-Zellen mit SAFG29A und SAF-A/GFP als Kontrolle transfiziert und nach 50 h mit 1 μ M/ml BrdU im Medium weiterkultiviert.

Die Aufnahmen in Abb. 33 zeigen für SAF-A/GFP eine Kollokalisierung des Proteins mit replizierter DNA. Das heißt, die Expression des SAF-A/GFP scheint die Zelle und ihre normalen Abläufe nicht zu beeinträchtigen, sie wächst und kann sich teilen. Bei SAFG29A dagegen scheint die Zelle nur noch dann replizieren zu können, wenn das Protein schwach exprimiert wird. Bei einer erhöhten Proteinmenge, dem typischen Phänotyp SAFG29A exprimierender HEK 293-Zellen, schließen sich Replikation und SAFG29A räumlich aus. Eine normale Replikation der gesamten DNA findet nicht mehr statt. Sehr deutlich wird die Auswirkung des Proteins auf die Replikation bei überexprimierenden Zellen. Hier konnte keine BrdU-markierte DNA mehr detektiert werden.

Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen bei der Etablierung stabiler Zelllinien, dort konnten ebenfalls nur Zellen selektiert werden, die SAFG29A schwach exprimieren.

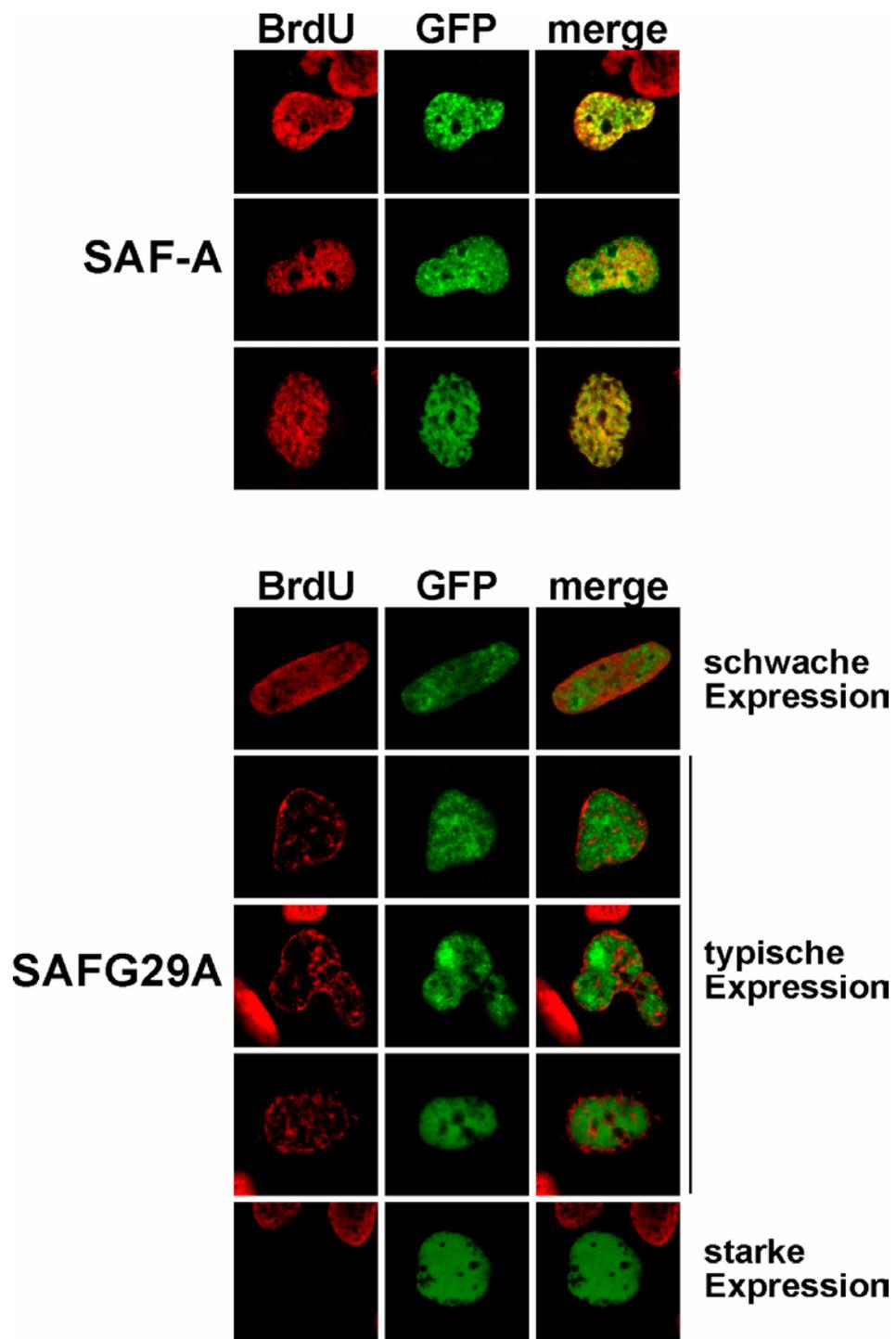


Abb. 33: Replikationsanalyse bei SAFG29A und SAF-A transfizierten Zellen

Dargestellt sind transient mit SAFG29A und SAF-A transfizierte HEK 293-Zellen. Nach Einbau von Bromdesoxyuridin (1 μ M/ml) in replizierte DNA wurde diese über einen Antikörper gegen BrdU (mouse α -BrdU 1:25) detektiert und durch den sekundären Antikörper (α -mouse Alexa 568 1:300) sichtbar gemacht.

4.3. Charakterisierung funktionaler Bereiche im Carboxyterminus von SAF-A

4.3.1. Lokalisierung und Charakterisierung der Multimerisierungsdomäne von hSAF-A

In den folgenden Experimenten soll die Domäne identifiziert werden, die für die Multimerisierung des SAF-A verantwortlich ist. Zu diesem Zweck sollen verschiedene Konstrukte von SAF-A exprimiert werden und über Immunpräzipitationen auf ihre Bindung an das endogene SAF-A überprüft werden.

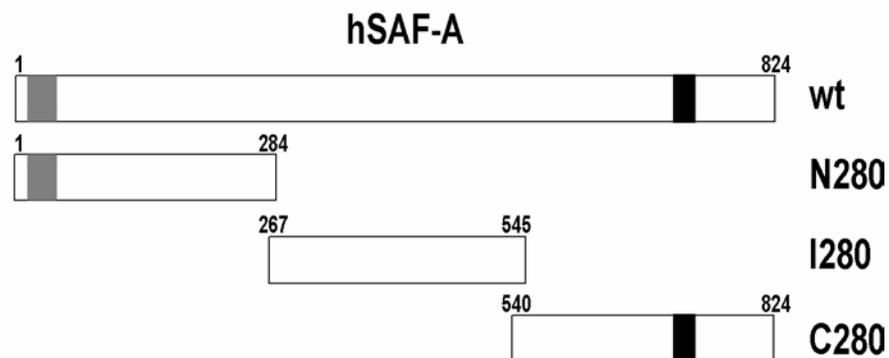
4.3.1.1. Lokalisierung der Multimerisierungsdomäne

Die Konstrukte N280, I280 und C280 (Ostendorp, 2001) stellen drei große Teilbereiche des humanen SAF-A dar, die zusammen das gesamte Protein abdecken (Abb. 34a). In einem ersten Versuch soll nun über Immunpräzipitationen geklärt werden, innerhalb welcher dieser Bereiche eine Interaktion mit endogenem SAF-A möglich ist. Dazu wurden HEK 293-Zellen mit den entsprechenden Expressionsvektoren transient transfiziert. Nach 48 h Wachstum wurden Ganzzellextrakte hergestellt und die exprimierten Proteine mit α -GFP Antikörpern gefällt.

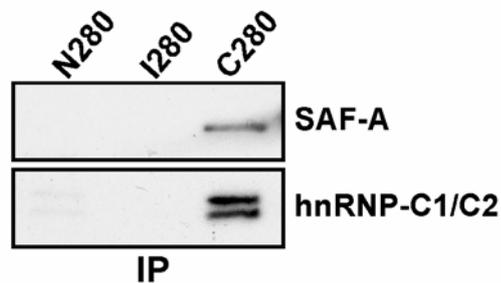
In Abb. 34b sieht man die Analyse der Immunfällungen mit den drei Teilkonstrukten. Dabei wird deutlich, dass endogenes SAF-A nur mit dem Konstrukt C280 copräzipitiert werden kann. Erwartungsgemäß werden mit SAF-A auch andere hnRNP-Proteine copräzipitiert, für die die Interaktion mit SAF-A schon bekannt ist (Abb. 34c).

Die Wechselwirkung des carboxyterminalen Konstrukts mit endogenem SAF-A wurde in einem weiteren Experiment bestätigt. Dazu wurde endogenes SAF-A mit einem monoklonalen Antikörper gegen SAF-A gefällt, und die Copräzipitation von C280 nachgewiesen (Abb. 35a). Zur Bestätigung der Wechselwirkung der hnRNP-Proteine mit C280 wurde eine weitere Immunfällung durchgeführt. Dazu wurden zur Immunpräzipitation C280 transient transfizierte 293-Zelllysate mit monoklonalen Antikörpern gegen hnRNP-C1/C2 inkubiert, die zuvor auch schon für die Färbungen dieser Proteine verwendet wurden. Auch in diesem Versuch konnte ein Komplex aus endogenem SAF-A, hnRNP-C1/C2 und C280/GFP gefällt werden (Abb. 35b).

a)



b)



c)

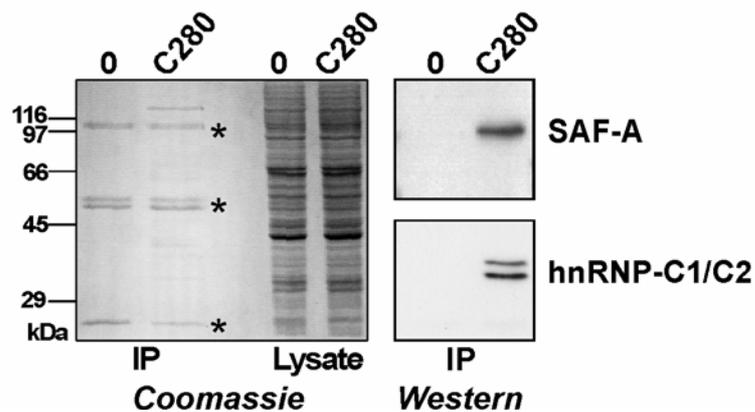


Abb. 34: Eingrenzung der SAF-A-Interaktionsdomäne (1)

a) Schematische Darstellung der SAF-A-Teilkonstrukte. Alle Konstrukte sind am Carboxyterminus an GFP fusioniert. Grau unterlegt wurde die SAF-Box, schwarz die RGG-Box

b) HEK 293-Zellen wurden mit den drei SAF-A-Teilkonstrukten transfiziert. Nach 48 h wurde der Zellextrakt mit α -GFP Antikörper (5 μ g/Ansatz) immungefällt. Je ein Drittel der gesamten IPs wurde über 10% SDS-Page aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit dem SAF-A-spezifischen Antikörper K371 oder dem hnRNP-C1/C2 Antikörper immungefärbt.

c) HEK 293-Zellen wurden mit C280 transfiziert und nach 48 h wurde der Zellextrakt mit α -GFP Antikörper (5 μ g/Ansatz) immungefällt. Ein Zellextrakt untransfizierter 293-Zellen wurde ebenfalls immungefällt (0). Im linken Teil sieht man die IPs (2/3 der IP) und Lysate (1% des Ausgangsmaterials) auf einem 10% SDS-Gel aufgetrennt und Coomassie gefärbt. Sterne markieren die Antikörperketten der α -GFP Antikörper. Je ein Drittel der gesamten IPs wurde über einen Westernblot mit K371 oder Antikörpern gegen hnRNP-C1/C2 analysiert.

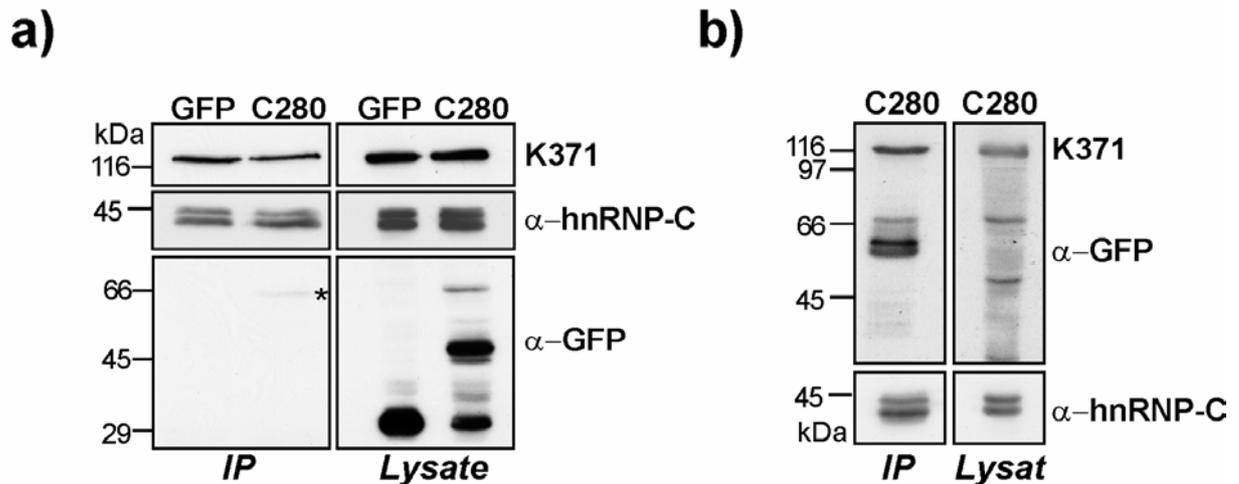


Abb. 35: Eingrenzung der SAF-A-Interaktionsdomäne (2)

a) Immunpräzipitation mit monoklonalem SAF-A Antikörpern (7C8). HEK 293-Zellen wurden transient mit C280 und GFP transfiziert. Nach 48 h wurden die Gesamtzellextrakte mit dem monoklonalen SAF-A Antikörper 7C8 immungefällt. Dazu wurde 1 ml Hybridoma-ÜS mit 40 μ l α -IgG-rat-Sepharose gekoppelt und zum Zelllysat gegeben. Über SDS-Page und Westernblot wurde je ein Drittel der gesamten IP analysiert; von den Lysaten wurde 1% der Ausgangsmenge verwendet. Der SAF-A-spezifische Antikörper K371, der Antikörper gegen hnRNP-C1/C2 und der α -GFP Antikörper wurden zur Detektion verwendet. Der Stern (*) markiert die aufgrund der geringen Ausgangsmenge in den Lysaten schwache C280 Bande.

b) Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen hnRNP-C1/C2. HEK 293-Zellen wurden transient mit C280 transfiziert. Nach 48 h Wachstum wurden die Gesamtzellextrakte mit α -hnRNP-C1/C2 Antikörpern (1:1000) immungefällt. Über SDS-Page und Westernblot wurde je ein Drittel der gesamten IP analysiert; von dem Lysat wurde 1% der Ausgangsmenge verwendet. Die obere Hälfte der Membran wurde mit dem SAF-A-spezifischen Antikörper K371, die untere mit α -GFP Antikörpern immungefärbt. Die Membran wurde anschließend mit dem Antikörper gegen hnRNP-C1/C2 nachgefärbt.

Diese Ergebnisse zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sich die Fähigkeit zur Proteinwechselwirkung von SAF-A auf das carboxyterminale Drittel des Proteins eingrenzen lässt. In einem weiteren Versuch soll überprüft werden, ob die Interaktion der hnRNP-Proteine mit C280 auch *in situ* in Zellen beobachtet werden kann.

4.3.1.2. Vergleich der Lokalisationsmuster von hnRNP-C1/C2 und C280

Die Methode der indirekten Immunfluoreszenz ermöglicht den spezifischen Nachweis eines Proteins und die Visualisierung seines Lokalisationsmusters in der Zelle. Zur Immunfärbung der hnRNP-Proteine C1 und C2 in den Zellen wurde der monoklonale hnRNP-C1/C2 Antikörper verwendet. Dazu wurden HEK 293-Zellen mit C280/GFP auf Deckgläschen transfiziert. Als Kontrolle wurden parallel nicht-transfizierte Zellen auf Deckgläschen kultiviert, um danach endogenes SAF-A zu färben. Abb. 36 zeigt konfokale Aufnahmen der hnRNP-C1/C2-Immunfärbung in 293-Zellen.

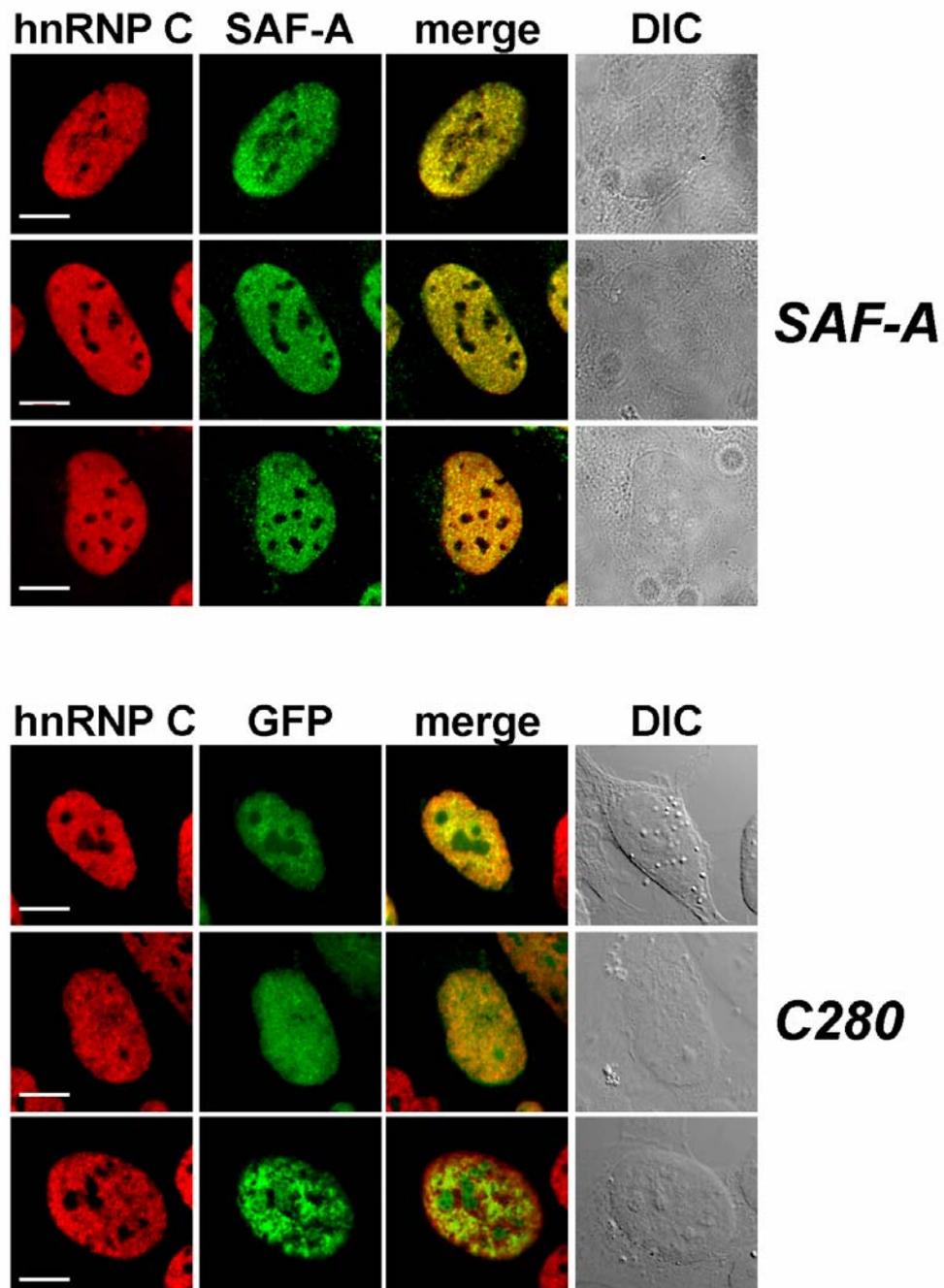


Abb. 36: Immunfärbung des hnRNP-C1/C2

Transient mit C280 transfizierte HEK 293-Zellen sowie untransfizierte Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und 48 h nach Transfektion immungefärbt. Die Antikörper gegen hnRNP-C1/C2 wurden wie die Antikörper gegen endogenes SAF-A (K371) in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet. Die sekundären Antikörper (Alexa rot mouse, Alexa grün rabbit) wurden 1:300 verdünnt. Anschließend wurden die Zellen konfokal fluoreszenzmikroskopisch analysiert und aufgenommen. Die Balken entsprechen 10 μm .

Wie erwartet überlappen die Lokalisationsmuster von endogenem SAF-A und hnRNP-C1/C2, wie in der Überlagerung dargestellt wird (Abb. 36 oben). Sowohl SAF-A wie auch die hnRNP-Proteine sind über den gesamten Zellkern verteilt, lediglich die Nukleoli werden ausgespart. In C280/GFP transfizierten Zellen zeigen die hnRNPs dasselbe Lokalisationsmuster wie in untransfizierten Zellen. Entsprechend dem SAF-A zeigt auch C280 in schwächer exprimierenden Zellen überwiegend eine Kolo-kalisation mit hnRNP-C1/C2 (Abb. 36 unten).

Wie in den vorangegangenen Versuchen gezeigt werden konnte, bindet C280/GFP an SAF-A und an hnRNP-Proteine. Es bleibt jedoch die Frage, ob die Interaktion des C280 mit SAF-A auf dem Vorhandensein von RNA beruht und innerhalb von hnRNP-Partikeln stattfindet, oder ob die Proteine direkt interagieren.

4.3.1.3. RNA-Abhängigkeit der C280/SAF-A-Wechselwirkung

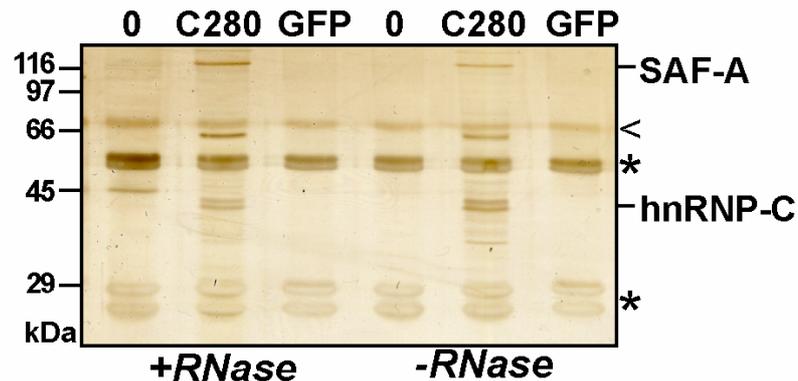
Die RNA-bindende Domäne von SAF-A, die RGG-Box, liegt im carboxyterminalen Drittel des Proteins (siehe Abb. 34a). Das heißt, die in den vorausgegangenen Versuchen beobachtete Interaktion von C280 und SAF-A könnte auf einer Bindung beider Proteine an RNA beruhen. Im folgenden Versuch sollte diese Möglichkeit näher untersucht werden. Dazu wurden HEK 293-Zellen transient mit C280 und GFP transfiziert. Zur Kontrolle wurden auch transfizierte 293-Zellen verwendet. Die Hälfte eines Zelllysates wurde dann mit 1 mg RNase für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor der GFP-Antikörper zur Immunfällung zugegeben wurde.

Das silbergefärbte Proteingel (Abb. 37a) zeigt deutlich, dass endogenes SAF-A sowohl im RNase-behandelten wie auch im unbehandelten Zelllysate mit C280 copräzipitiert. Außerdem sieht man, dass SAF-A in diesen Immunfällungen in gleichen Mengen copräzipitiert wie C280. Die Bindung des SAF-A an C280-GFP scheint RNA-unabhängig zu sein. Die Bindung der hnRNP-Proteine scheint dagegen beeinträchtigt zu sein, da weniger und schwächere Banden in den RNase-behandelten Zelllysaten zu sehen sind. Der Westernblot dieser Immunfällungen bestätigt diese Beobachtungen (Abb. 37b). Die Menge des mit C280/GFP copräzipitierten SAF-A wird durch die RNase-Behandlung nicht beeinträchtigt. Die Proteine hnRNP-C1/C2 sind dagegen nach RNase-Behandlung eindeutig reduziert, d.h. bei der Bindung dieser Proteine an C280/SAF-A scheint RNA beteiligt zu sein.

Zusammenfassend konnte in diesem Versuch gezeigt werden, dass es sich bei der Bindung von endogenem SAF-A an C280/GFP um eine direkte, RNA-unabhängige Interaktion handelt. Im nächsten Versuch sollte untersucht werden, ob sich die

Interaktionsdomäne innerhalb der carboxyterminalen 280 Aminosäuren des SAF-A weiter einengen lässt.

a)



b)

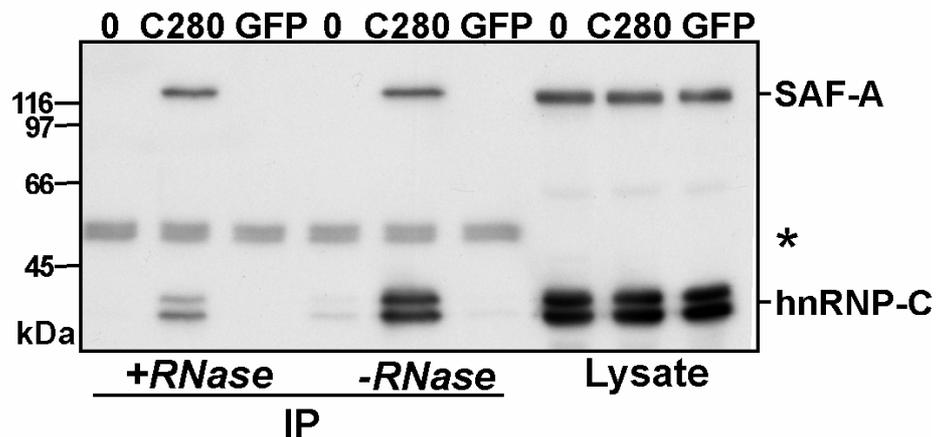


Abb. 37: RNA-Abhängigkeit der C280/SAF-A-Wechselwirkung

HEK 293-Zellen wurden transient mit C280 und GFP transfiziert; nach Zellyse wurde die Hälfte jedes Ansatzes für 10 min mit 1 mg RNase verdaut. Anschließend wurden die Ganzzellextrakte mit 2,5 µg α -GFP Antikörper gefällt.

a) SDS-Page mit anschließender Silberfärbung. 1/6 der gesamten IPs wurden in einem 10% SDS-Gel aufgetrennt. Die Sterne (*) markieren die Banden der Antikörperketten des α -GFP Antikörpers, die Pfeilspitze (<) markiert Kreatinverunreinigungen.

b) Immunpräzipitation nach RNase-Behandlung. Nach 10% SDS-Page, bei der für jeden Ansatz die Hälfte der jeweiligen IP und 1% der entsprechenden Lysate aufgetragen wurde, wurden der obere Teil der Membran mit dem SAF-A-spezifischen Antikörper K371, die untere Hälfte mit Antikörpern gegen hnRNP-C1/C2 immungefärbt. Der Stern (*) markiert die Antikörperketten des α -GFP Antikörpers.

4.3.1.4. Eingrenzung der SAF-A Multimerisierungsdomäne

In diesen Versuchen wurden carboxyterminal verkürzte Konstrukte des C280 verwendet, um die Interaktionsdomäne zwischen zwei SAF-Molekülen einzugrenzen. Dazu wurden mittels PCR verkürzte carboxyterminale Fragmente hergestellt, die in den Vektor EGFP/NLS (mit SV40NLS) ligiert wurden (siehe Abb. 38a). Die Aufnahmen in Abb. 37b zeigen den typischen Phänotyp von HEK 293-Zellen, die transient die carboxyterminalen Teilproteine exprimieren. C280, CC140 und C84 lokalisieren wie erwartet im Zellkern (Abb. 37b A), wobei keines dieser Proteine homogen im Zellkern verteilt ist. C280 zeigt schwammähnliche Strukturen, die dreidimensional den Zellkern durchspannen. Vergleichbare Strukturen weist CC140 bei einer Teilpopulation der Zellen auf, während die meisten Zellen stark fluoreszierende Nukleoli bei ansonsten homogener Färbung des Nukleoplasma aufweisen. C84 zeigt in den meisten Zellkernen eine ungeordnete Anfärbung mit zum Teil schwammartigen Strukturen, die aber nicht so stark ausgeprägt sind wie bei C280. Die 64 Aminosäuren langen carboxyterminalen Proteine C64 Δ h und C64 Δ v sowie C280 Δ h20 sind trotz SV40NLS homogen in der ganzen Zelle verteilt (Abb. 38b B). Analysen der Proteine in einem Westernblot zeigen, dass bei diesen Proteinen ein extrem starker Abbau stattgefunden hat (Daten nicht gezeigt).

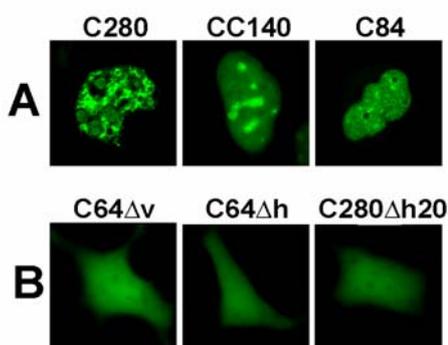
Die Immunfällungen der Proteine C280, CC140, C84, C64 Δ und GFP werden in Abb. 38c dargestellt. Sie wurden mit Zelllysaten transient transfizierter HEK 293-Zellen und 5 μ g α -GFP Antikörper/Zelllysate durchgeführt. Der Westernblot der Immunfällungen zeigt, dass endogenes SAF-A mit C280, CC140 und C84 copräzipitiert. Bei der Fällung des C280 ist deutlich zu sehen, dass endogenes SAF-A in äquivalenten Mengen zu C280 copräzipitiert. Die Menge des copräzipitierten SAF-A scheint in der Immunfällung des C84 geringer zu sein als bei C280 und CC140. In weiteren Immunfällungen mit C84 konnte dies allerdings nicht bestätigt werden. Die Immunfällung des C64 Δ v weist kein copräzipitiertes endogenes SAF-A auf. In der GFP-Färbung dieser Fällung konnte aber auch kein C64 Δ v mehr nachgewiesen werden. Bei Immunpräzipitationen mit C64 Δ h und C280 Δ h20 transfizierten Zellen wurde ein entsprechendes Verhalten wie bei C64 Δ v beobachtet (starke Degradation und kein copräzipitiertes SAF-A). Die eingesetzte Ausgangsmenge für die Immunfällungen ist vergleichbar, wie durch die Färbung des endogenen SAF-A und der hnRNPs in den Lysaten gezeigt wird.

Die Multimerisierungsdomäne des SAF-A konnte damit auf die letzten 84 Aminosäuren eingegrenzt werden. Eine weitere Einengung ist wegen der Instabilität noch kürzerer carboxyterminaler Teilstücke von SAF-A zu diesem Zeitpunkt nicht möglich.

a)



b)



c)

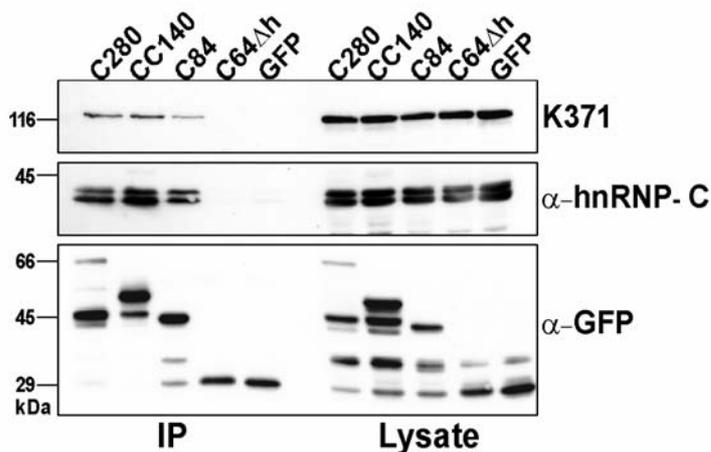


Abb. 38: Eingrenzung der Multimerisierungsdomäne

a) Schematische Darstellung der verkürzten carboxyterminalen SAF-A-Konstrukte. Alle Konstrukte enthalten eine SV40 NLS.

b) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von transient transfizierten HEK 293-Zellen. (A) C280, CC140 und C84 exprimierende 293-Zellen. Abgebildet sind die Zellkerne, da diese Proteine ausschließlich im Zellkern lokalisieren (konfokale Aufnahmen; Zeiss LSM 510). (B) Dargestellt sind die carboxyterminalen SAF-A-Konstrukte C64 Δ v, C64 Δ h und C280 Δ h20 in transient exprimierenden 293-Zellen. Die Zellen wurden mit einem Epi-Fluoreszenzmikroskop (Leica DMRA-Mikroskop) aufgenommen (Vergrößerung 400fach).

c) 293-Zellen wurden mit C280, CC140, C84, C64 Δ h und GFP transfiziert, nach 48 h Wachstum wurde der Zellextrakt mit α -GFP AK (5 μ g/Ansatz) immungefällt. Zwei Drittel der gesamten IP wurde über einen Westernblot mit SAF-A-spezifischem Antikörper K371 oder α -hnRNP-C1/C2 Antikörper oder α -GFP Antikörper analysiert. Von den Lysaten wurde 1% der Ausgangsmenge aufgetragen.

4.3.2. Differenzierung der Kernmatrix-Bindedomäne von der Multimerisierungsdomäne des hSAF-A

Der Kernmatrix wird von vielen Autoren eine wichtige Rolle bei der Zellkernarchitektur zugeschrieben. Mit biochemischen Methoden können lösliche Proteine und das Chromatin aus dem Kern extrahiert werden, wobei die Kernmatrix bzw. das Kerngerüst als unlösliche Substanz zurückbleibt.

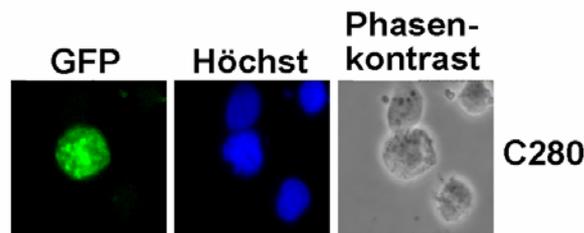
Für C280 konnte, ebenso wie für SAF-A, in unserem Labor gezeigt werden, dass es salzstabil an Kernmatrixstrukturen bindet. Das verkürzte Fragment CC210 bindet ebenfalls unter Hochsalzbedingungen an die Kernmatrix, CC140 dagegen nur noch sehr schwach und nicht mehr salzstabil (Hermann, 2000). Damit konnte die Fähigkeit des SAF-A zur salzstabilen Bindung an das Kerngerüst auf die aminoterminalen 210 Aminosäuren des C280 lokalisiert werden. Die Multimerisierungsdomäne des SAF-A konnte im Rahmen dieser Arbeit auf die carboxyterminalen 84 Aminosäuren eingegrenzt werden. In den nächsten Experimenten wurde versucht, diese beiden Ergebnisse miteinander in Verbindung zu bringen, und eventuell die an der Bindung an die Kernmatrix beteiligten Domänen innerhalb der letzten 280 Aminosäuren von SAF-A genauer zu definieren.

4.3.2.1 Chromatinfractionierung C280

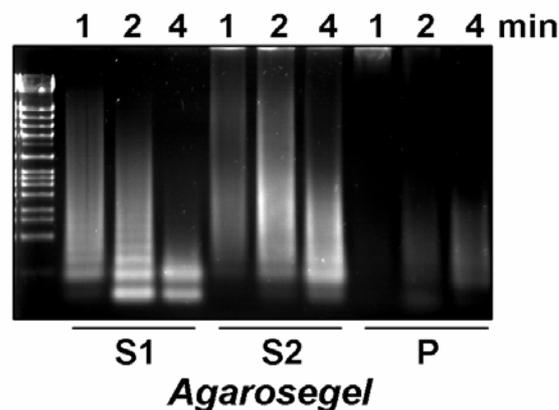
In einem ersten Experiment wurden die Ergebnisse der Matrixpräparation des C280 in Zellen durch eine Chromatinfractionierung überprüft. Die differenzierte Extraktion von Micrococcus Nuclease behandelten Zellen erlaubt die Trennung zwischen aktivem und inaktivem Chromatin (Rose und Garrard, 1984). Über diese Methode ist es möglich, fest assoziierten DNA-Strukturen, wie sie an Kernmatrixbereichen vorkommen, mit den daran gebundenen Proteinen, zu isolieren.

Zwei Platten HEK 293-Zellen (2×10^7 Zellen) wurden mit C280 transient transfiziert und 48 h kultiviert. Die Zellkerne wurden isoliert und durch hypotonen Schock für ungebundene Proteine permeabilisiert. Abb. 39a zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der permeabilisierten Kerne. C280 ist erwartungsgemäß nicht löslich, sondern bleibt nach Permeabilisierung im Zellkern gebunden. Die Zellkerne wurden im Folgenden für 1, 2 oder 4 Minuten mit Micrococcus Nuklease behandelt, um danach die drei unterschiedlichen Chromatinfractionen zu isolieren. In Abb. 38b sind gleiche Mengen aller neun Fraktionen auf einem Agarosegel aufgetrennt worden.

I



II a)



b)

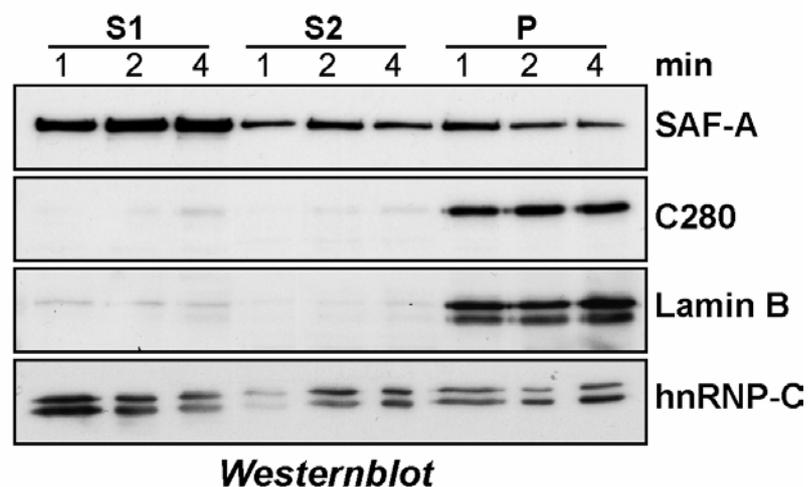


Abb. 39: Chromatinfractionierung C280

I) Aufnahmen von isolierten, permeabilisierten Zellkernen C280 exprimierender HEK 293-Zellen. Die Bilder wurden an einem Epi-Fluoreszenzmikroskop (Leica DMRA-Mikroskop) nach vorausgegangener Färbung mit Hoechst 33258 aufgenommen (Vergrößerung 630fach).

II) Die permeabilisierten Zellkerne wurden mit 300 U Micrococcus Nuklease für 1, 2 und 4 min inkubiert und durch Zentrifugation in Überstand (S1) und Pellet getrennt. Das Pellet wurde in EDTA gelöst und abzentrifugiert, um den Überstand (S2) und die Pellet (P) Fraktionen zu erhalten.

a) Die DNA-Fractionen S1, S2 und P wurden in gleichen Mengen auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt und Ethidiumbromid gefärbt.

b) Äquivalente Volumen jeder Fraktion wurden auf einem 10% SDS-Gel aufgetrennt und nach Transfer auf eine PVDF-Membran mit α -GFP Antikörper, SAF-A-spezifischem Antikörper K371, α -hnRNP-C1/C2 Antikörpern oder α -LaminB Antikörpern inkubiert.

Die Fraktionen enthalten die DNA-Fragmente erwarteter Größe und zeigen das typische Bild dieser Fraktionierungsmethode (vergl. Abb. 24). Gleiche Volumina der Fraktionen S1, S2 und P wurden nach Proteinfällung in einem Westernblot analysiert (Abb. 39c). C280 ist ausschließlich in den P-Fraktionen der Fraktionierung angereichert, die fest assoziierte Matrix-DNA enthält. Das endogene SAF-A ist bei diesen Fraktionierungen überwiegend in den S1-Fraktionen, also auch an transkriptionell aktiver DNA zu finden. Entsprechend dem SAF-A konnten auch die endogenen hnRNP-Proteine C1/C2 in jeder Fraktion, mit einer leichten Bevorzugung der S1-Fraktionen, detektiert werden. Ein Antikörper gegen Lamin B, einer Hauptkomponente der Kernlamina, wurde verwendet, um sicher zu stellen, dass die S1- und S2-Fraktionen nicht mit P-Fraktionen verunreinigt sind. Wie erwartet befindet sich Lamin B ausschließlich in den P-Fraktionen.

Dieser Versuch bestätigt also die Lokalisation des C280 an Kernmatrixstrukturen. Ob das verkürzte carboxyterminale C84 ebenso stark am Kerngerüst gebunden ist, soll im nächsten Versuch analysiert werden.

4.3.2.2. Zellfraktionierung C84 transfizierter Zellen

Zur Überprüfung, ob und an welche Kernstrukturen C84 gebunden ist, wurden mit C84/GFP transient transfizierte HEK 293-Zellen auf Deckgläschen kultiviert und nach 48 h einer klassischen *in situ* Matrixpräparation unterzogen. Dabei wurden die löslichen Proteine nach Permeabilisierung der Zellmembran mit Ammoniumsulfat extrahiert. Im nächsten Schritt wurden durch einen DNase-Verdau und anschließender Ammoniumsulfatfällung DNA-bindende Proteine entfernt. Die folgende Behandlung der Zellen mit 1,7 M NaCl lässt nur salzstabil an Kernmatrixstrukturen gebundene Proteine zurück. Die Zellen auf den Deckgläschen wurden nach jedem Fraktionierungsschritt eingebettet und fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

Die Aufnahmen in Abb. 40 zeigen, dass die anfänglich relativ homogene Verteilung des C84 nach jedem Fraktionierungsschritt mehr und mehr verloren geht. Dafür zeigen sich immer deutlicher ausgebildete Strukturen, die nach Hochsalz-Extraktion in einer schwammartigen Struktur enden, die den Zellkern durchspannt. Von C84 bleibt ein großer Teil nach der Behandlung mit 1,7 M NaCl im Zellkern gebunden, liegt demnach nicht an Chromatin gebunden oder löslich im Cytoplasma vor. Dieses Experiment wurde mehrfach mit denselben Ergebnissen wiederholt. Zusätzlich wurden parallel C280, das an Kernmatrixstrukturen bindet und N280, das schon nach TritonX-100-Behandlung den Zellkern verlässt, einer Fraktionierung unterzogen, um die Puffer und Versuchsbedingungen zu überprüfen.

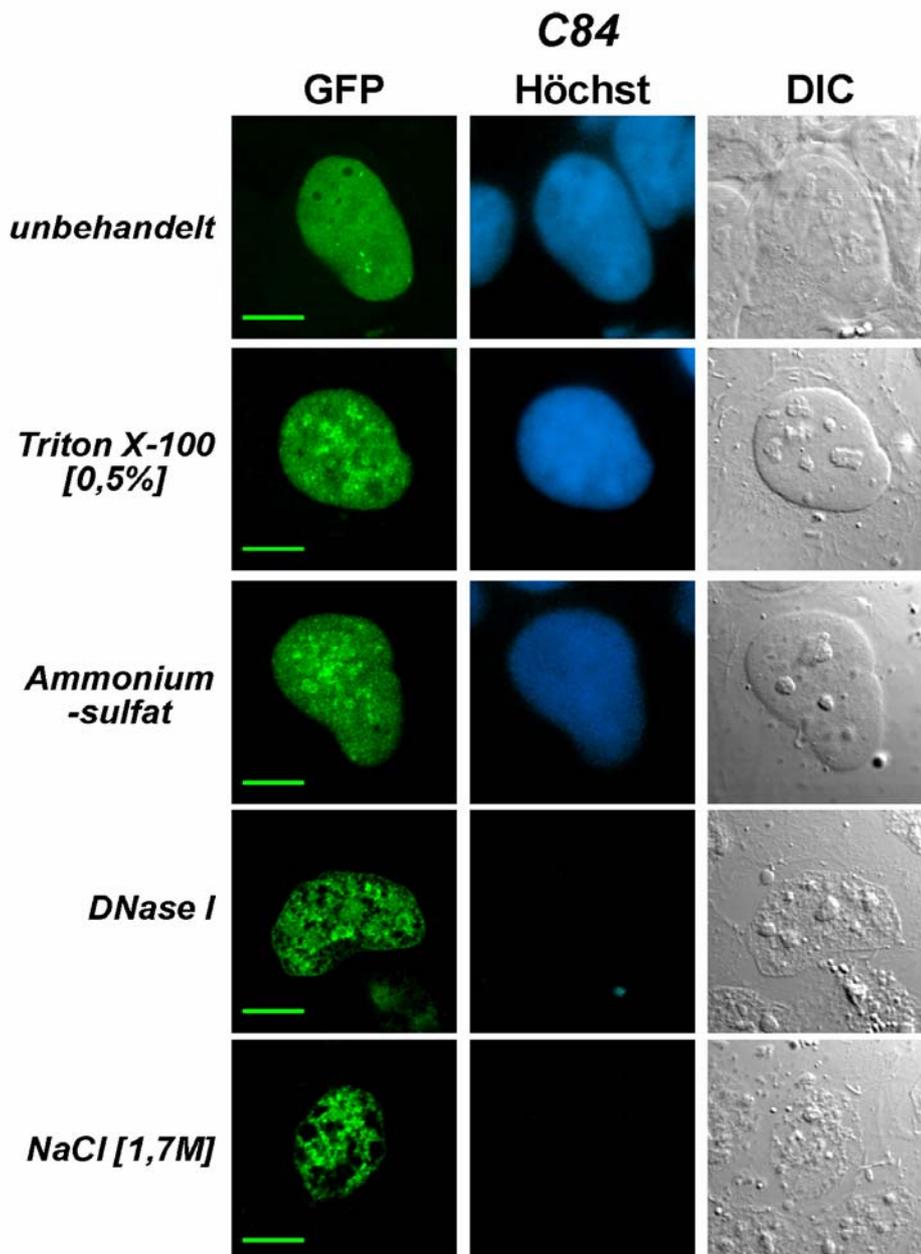


Abb. 40: Kernfraktionierung von C84 transfizierten HEK 293-Zellen

Mit C84/GFP transient transfizierte HEK 293-Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und 48 h nach Transfektion fraktioniert. Die Fraktionierungsschritte (von oben nach unten) wurden, wie im Methodenteil beschrieben, ausgeführt und die Zellen anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die DNA wurde mit Höchst 33258 gefärbt. Die Balken entsprechen 10 µm.

4.3.2.3. FRAP-Analysen der carboxyterminalen Teilbereiche des SAF-A

Die Mobilität von Proteinen im Zellkern wird hauptsächlich bestimmt durch ihre Eigenschaft, an DNA- oder Protein-Strukturen zu binden. Dabei kann es sich um eine dauerhafte Bindung handeln (z.B. Lamin B an der Kernhülle), oder um eine Bindung, die wieder gelöst werden kann (z.B. Transkriptionsfaktoren, die zeitweilig an DNA binden). Im Gegensatz dazu stehen frei diffundierende Proteine, wie z.B. GFP.

Im folgenden Versuch soll die Mobilität der Proteine C280, CC140 und C84 in der lebenden Zelle über FRAP-Analysen untersucht werden. Transient mit den drei Konstrukten transfizierte HEK 293-Zellen wurden auf Kulturschalen mit Glasboden kultiviert und vermessen. Der Rückstrom der Proteine nach dem Bleichen wurde in 400 Aufnahmen über einen Zeitraum von etwa 50 Sekunden festgehalten. In Abb. 41 sind beispielhaft Zellkerne mit den drei carboxyterminalen Teil-Proteinen zu sehen, die ein für diesen Versuch typisches Verhalten in FRAP-Experimenten aufweisen.

Bereits bei Betrachtung dieser Bilder wird deutlich, dass der Rückstrom des C280 in den geblichenen Bereich wesentlich mehr Zeit benötigt, als dies bei den anderen beiden Proteinen der Fall ist. So ist der geblichene Bereich im Zellkern der C280 exprimierenden Zelle noch nach 49 Sekunden zu erkennen, während die anderen beiden Proteine bereits nach 19 Sekunden wieder homogen im Zellkern verteilt sind. Des Weiteren zeigen die Aufnahmen, dass bestimmte, vor dem Bleichen stark fluoreszierende Kernstrukturen wie Nukleoli auch nach dem Rückfluss der Proteine wieder sichtbar sind. Die mobileren Proteine CC140 und C84 weisen zum Endpunkt dieser Messungen dieselbe Verteilung im Zellkern auf wie vor dem Bleichen.

Eine quantitative Auswertung der Daten zeigt Abb. 42a. Die Mobilität der carboxyterminalen SAF-A-Teilbereiche nimmt mit der Abnahme der Größe zu. C280 ist, entsprechend der Vorversuche, auch hier als weitgehend immobiles Protein beschreibbar.

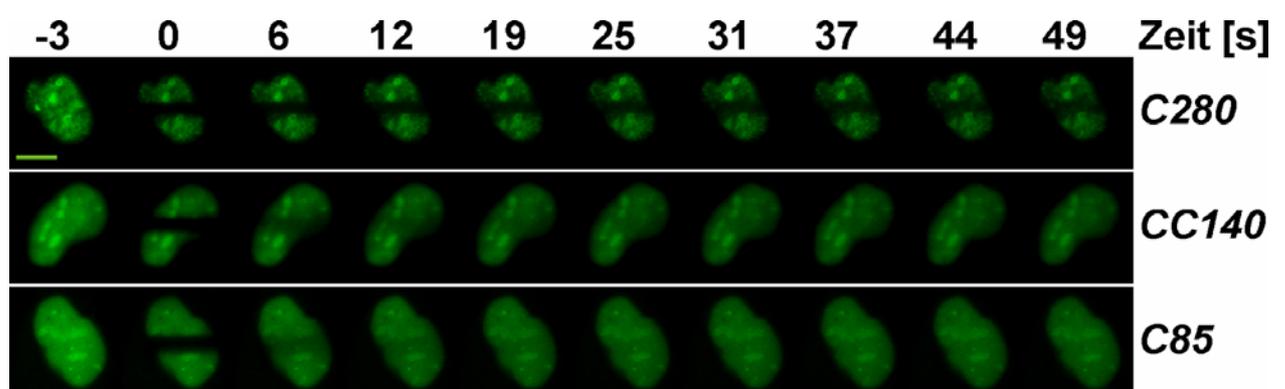
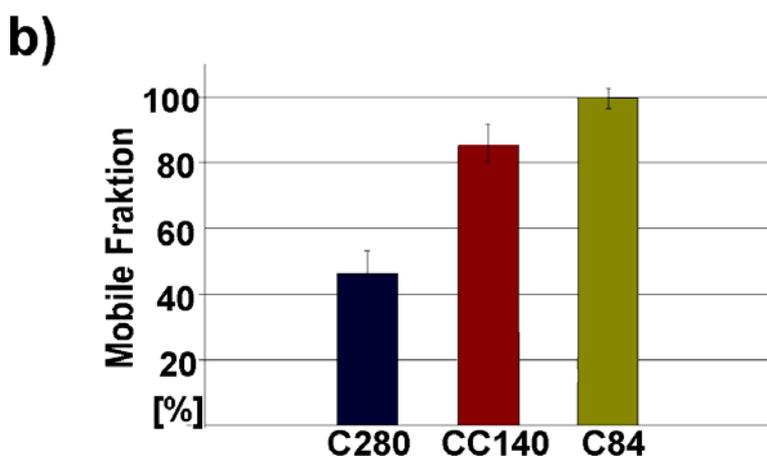
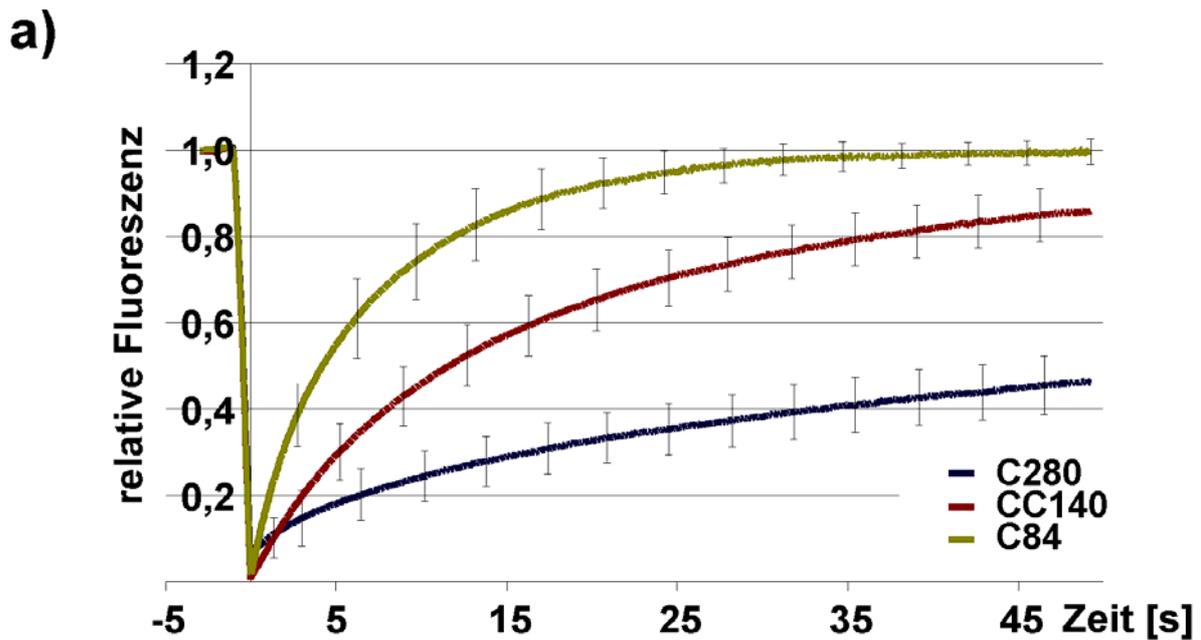


Abb. 41: Rückstrom der Proteine nach Bleichen einer definierten Region

Dargestellt sind Zellkerne transient C280, CC140 und C84 exprimierender HEK 293-Zellen. Dargestellt sind repräsentative Zellkerne vor dem Bleichen (Zeitpunkt -3), der Zellkern direkt nach dem Bleichen (Zeitpunkt 0) und der Rückstrom fluoreszierender Proteine in die geblichene Region über einen Zeitraum von 49 s. Die Größe der aufgenommenen Zellkerne ist durch einen Balken angegeben (10 μm).



c)

Protein	t _{1/2} [s]
C280	12,0
CC140	9,0
C84	4,3

Abb. 42: *In vivo* Mobilität carboxyterminaler Teilproteine von SAF-A

a) Graphische Darstellung des Rückstroms der fluoreszierenden Proteine C280, CC140 und C84 in den geblichenen Bereich gegen die Zeit. Gezeigt werden normierte Kurven, denen die Mittelwerte von je 12 repräsentativen Zellkernen zweier unabhängiger Experimente zugrunde liegen. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

b) Darstellung der mobilen Fraktionen der untersuchten Proteine C280, CC140 und C84. Zum letzten gemessenen Zeitpunkt (49 s) wurden die mobilen Fraktionen definiert und auf 100% normiert. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung von je 12 repräsentativen Zellkernen aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten.

c) Tabelle der gemessenen Zeit zum Rückstrom der Hälfte des Proteins (t_{1/2}).

CC140 ist wesentlich mobiler als C280 (siehe Abb. 42b), dies geht einher mit der Beobachtung bei den Matrixpräparationen, bei denen CC140 im Vergleich mit C280 nur noch schwach an das Kerngerüst binden kann (Herrmann, 2002). C84 ist mit einer mobilen Fraktion von 100% das beweglichste der drei untersuchten Proteine, obwohl es in den Zellfraktionierungen an Kerngerüststrukturen gebunden ist. Ein Vergleich der Diffusionszeit mit einem ungebundenen Protein wie L34A (Abb. 26c), das bereits nach 0,25 Sekunden zur Hälfte in den geblichenen Bereich zurückgeflossen ist, zeigt aber, dass C84 um den Faktor 17 langsamer ist als das ungebundene Protein.

5. Diskussion

Die Vorstellung von der Struktur und Organisation des Interphasezellkerns hat sich in den letzten zwanzig Jahren deutlich verändert. Wurde früher angenommen, dass der Zellkern eine homogene, große Zellstruktur darstellt, die abgesehen von den Nukleoli kaum strukturiert ist (Abney et al., 1997), wird heute immer deutlicher, dass der Interphasezellkern viele nukleäre Substrukturen und Funktionen aufweist, die spezifischen nukleären Subdomänen zugeordnet werden können (Spector, 1993; Lamond & Earnshaw, 1998; Misteli, 2001; Matera, 1999). Die Ergebnisse verschiedener Forschungsgruppen deuten darauf hin, dass die Kompartimentierung des Interphasezellkerns ein wichtiges Element bei der Regulation der Genexpression ist. Der prominenteste Bestandteil des Zellkerns, das Chromatin, ist so organisiert, dass jedes Chromosom eine eigene, abgrenzte Domäne besetzt, ein so genanntes Territorium (Cremer & Cremer, 2001). Diese übergeordnete Chromatinorganisation und die transkriptionelle Aktivität konnten in einen direkten Zusammenhang gebracht werden, da aktive und inaktive Gene überwiegend an der Oberfläche von Chromosomenterritorien gefunden wurden, wogegen nichtkodierende Sequenzen vorwiegend in deren Inneren liegen (Kurz et al., 1996; Verschure et al., 1999). Die Lage aktiver Genloci an der Oberfläche von Chromosomenterritorien ermöglicht die Abgabe neu synthetisierter RNA in den Interchromatinbereich, einen DNA-freien Raum zwischen den Chromosomenterritorien. Zur Kompartimentierung des Zellkerns gehört nicht zuletzt die wachsende Anzahl subnukleärer Domänen, die keine oder kaum DNA enthalten, aber anscheinend auf verschiedene Art an der Expression spezifischer Genklassen beteiligt sind (Verschure et al., 2002). Die molekularen Grundlagen für diese Kompartimentierung des Interphasezellkerns sind zu einem Großteil noch unklar und Gegenstand intensiver Forschungen. Die räumliche Trennung der subnukleären Domänen wird möglicherweise durch Anheftung an eine größere Struktur vermittelt, die den gesamten Zellkern durchspannt. Dieses Netzwerk, das vermutlich aus Proteinen und RNA besteht, kann durch die Extraktion löslicher Proteine und enzymatischer Entfernung des Chromatins isoliert werden und wird als Kernmatrix oder Kerngerüst bezeichnet (Fackelmayer, 2000). Eine Verbindung zwischen dem Kerngerüst und den Chromosomenterritorien wird durch die Arbeiten von Ma et al. (1999) erkennbar: Nach enzymatischer Zerstörung der RNA mit geringen Mengen RNase wird das Kerngerüst zerstört, und die sonst klar getrennten Chromosomenterritorien lösen sich auf. Die Chromatindomänen werden demnach an Kerngerüststrukturen immobilisiert, die dadurch an der räumlichen

Chromatinorganisation im Zellkern beteiligt wären. Wie aber wirken die molekularen Mechanismen, die eine solche Verankerung des Chromatins erlauben? Die Entdeckung von SAR/MAR-Elementen, als Kernmatrix assoziierte DNA-Bereiche (Mirkovitch et al., 1984), führte zu einer Modellvorstellung, wie die Verbindung zwischen Chromatindomänen und dem Kerngerüst bewerkstelligt werden könnte. Demnach ist das eukaryotische Chromatin in großen, voneinander unabhängigen Schleifen organisiert, die an ihrer Basis über SAR/MAR-Elemente an der Kernmatrix verankert sind (Heng et al., 2001). SAR/MAR-Elemente liegen fast immer außerhalb von proteinkodierenden Bereichen, aber oft in Nähe von regulatorischen Elementen wie Enhancern oder Promotoren (Gasser & Lämml, 1986; Blasquez et al., 1989). Die genauen Funktionen von SAR/MAR-Elementen sind noch nicht bekannt. Da sie einen stimulierenden Effekt auf die Aktivität benachbarter Gene zeigen, spielen sie möglicherweise eine Rolle bei der Transkription, werden aber auch mit der Replikation des Genoms, DNA-Reparatur und Rekombination in Verbindung gebracht (Fackelmayer, 2000). Die artenüberschreitende Erkennung der SAR-Elemente spricht für eine lebenswichtige Aufgabe der Elemente für alle eukaryotischen Zellen.

Die Charakterisierung SAR/MAR-bindender Proteine (siehe Einleitung) ermöglicht es, nähere Informationen über die mögliche Funktion der Elemente und über deren Beteiligung an der Organisation des Chromatins zu erhalten. Der Forschungsgegenstand dieser Arbeit, das humane Kernprotein ‚Scaffold Attachment Factor-A‘ (SAF-A), bindet mit einer konservierten DNA-bindenden Domäne, der so genannten SAF-Box, an SAR/MAR-DNA. Da es außerdem eines der zehn häufigsten Proteine in klassischen Kernmatrixpräparationen ist (Mattern et al., 1996) und mit einer Anzahl von ungefähr 2 Millionen Molekülen im Zellkern vorliegt (Fackelmayer & Richter, 1994b), stellt es zur Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Chromatinstruktur und Kernmatrix einen vielversprechenden Kandidaten dar. In dieser Arbeit wurden verschiedene Aspekte zur Domänenstruktur des humanen SAF-A und dessen Funktion bei der Chromatinorganisation untersucht. Dabei wurde speziell auf die konservierte SAR/MAR/DNA-bindende Domäne und damit verbunden auf den DNA-Bindungsmodus des SAF-A fokussiert, sowie auf die Assoziation des SAF-A mit Kerngerüststrukturen.

5.1. Sequenzanalyse der konservierten DNA-bindenden Domäne des SAF-A

SAF-A bindet durch eine evolutionär konservierte Proteindomäne, die so genannte SAF-Box, an DNA. Obwohl SAF-A ein generelles Nukleinsäure-bindendes Protein ist, wurde in Konkurrenzexperimenten gezeigt, dass eine stärkere Affinität zu SAR/MAR-DNA besteht (Romig et al., 1992; Tsutsui et al., 1993; von Kries et al., 1994). Die DNA- bzw. SAR/MAR-Bindung des SAF-A ist eine Voraussetzung für die postulierte Rolle des Proteins bei der räumlichen Chromatinorganisation im Zellkern. Um die genaue Funktion des SAF-A zu verstehen, ist eine Untersuchung der SAF-Box und ein Vergleich mit anderen SAF-Box-Proteinen notwendig. Datenbankvergleiche zeigen die Existenz zahlreicher SAF-Box-Proteine in eukaryotischen Zellen, von denen mindestens fünf eine vollständig konservierte SAF-Box besitzen (Kipp et al., 2000). Zudem konnte ein fast identisches Motiv, die so genannte SAP-Domäne identifiziert werden. Die SAP-Domäne ist ein 35mer, das nach den drei Proteinen SAF-A/B, Acinus und Pias benannt wurde, die diese Domäne enthalten. Es stellt ein SAF-Box-Motiv dar, das nicht in allen Positionen mit denen der SAF-Box übereinstimmt, und konnte in einer Reihe von Kernproteinen gefunden werden, die an Transkription, DNA-Reparatur, RNA-Prozessierung oder apoptotischer Chromatindegradation beteiligt sind (Aravind & Koonin, 2000). Während dieser Arbeit wurde ein Aminosäuresequenzvergleich humaner Proteine erstellt, die SAF-Boxen oder SAP-Domänen tragen. Bei allen untersuchten Proteinen konnten hochkonservierte Aminosäurepositionen gefunden werden, die in einem Teil dieser Arbeit auf ihre Bedeutung für die DNA-Bindung durch die SAF-Box untersucht wurden. Während der Arbeiten mit der SAF-Box-Sequenz wurde eine weitere Sequenzauffälligkeit entdeckt: Eine Aminosäuresequenz mit vielen basischen Resten (${}_{9}\text{KKLKVSELKEELKKRR}_{24}$) erinnerte an ein zweiteiliges Kernlokalisierungssignal, das dem Typ der Nucleoplasmin-NLS stark ähnelt (Robbins et al., 1991). Spezielle Suchprogramme für Kernlokalisierungssignale (unter anderem Scan Prosite) konnten in der Aminosäuresequenz der SAF-Box ebenfalls dieses potentielle Kernlokalisierungssignal (hier als NLS 2 bezeichnet) vorhersagen. Interessanterweise wurde für SAF-A in früheren Arbeiten ein potentielles, neun Aminosäuren (${}_{241}\text{KKRGVKKRPR}_{249}$) großes Signal (hier als NLS 1 bezeichnet) im aminoterminalen Drittel des Proteins vorhergesagt (Kiledjian und Dreyfuss, 1992), das von den verwendeten Algorithmen nicht gefunden werden konnte.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde eine Mutationsanalyse der SAF-Box durchgeführt, um die Rolle unterschiedlicher Aminosäurepositionen in der SAF-Box bei der DNA-Bindung und bei der Kernlokalisierung des SAF-A zu untersuchen.

5.1.1. Die Kernlokalisierung des SAF-A

Aus der Sequenz des humanen Kernproteins SAF-A wurden zwei potentielle Kernlokalisierungssignale vorhergesagt. Um zu klären, welches der beiden Kernlokalisierungssignale für die Lokalisierung des SAF-A im Zellkern verantwortlich ist, wurden in einem Teilprojekt dieser Arbeit beide potentiellen Signale auf ihre Funktionalität überprüft.

Zunächst wurde das potentielle, zweiteilige Signal (NLS 2) innerhalb der SAF-Box untersucht. Die SAF-Box bildet nach Strukturvorhersagen eine dreidimensionale Struktur mit zwei α -Helices, die der Struktur der Homeobox mit drei α -Helices stark ähnelt (Kipp et al., 2000). Die basischen Aminosäuren der NLS 2 liegen teilweise in den Helices der SAF-Box. Dies entspricht etwa der Situation des Homeoboxproteins PDX-1, bei dem die NLS mit Helix 3 überlappt (Hessabi et al., 1999).

5.1.1.1. Analyse der potentiellen zweiteiligen NLS 2

Zur Mutationsanalyse der SAF-Box wurden die ersten 45 Aminosäuren des SAF-A, die für die SAF-Box mit der NLS 2 kodieren, an die fluoreszierende Proteine GFP (N45grün) und DsRed (N45rot) fusioniert. Beide Fusionsproteine lokalisieren im Zellkern, ohne dass die NLS 1 notwendig ist. N45rot akkumuliert ausschließlich im Zellkern, während ein geringer Teil des N45grün auch im Cytoplasma vorhanden ist. Die beiden Fusionsproteine sind mit einer Größe von ungefähr 35 kDa nicht groß genug, um eine freie Diffusion durch die Kernporen auszuschließen (Macara, 2001; Rout et al., 2003). Bei freier Diffusion durch die Poren wäre eine Akkumulation der N45-Proteine im Kern nur dann erklärbar, wenn sie durch die Bindung an eine Kernstruktur im Kern zurückgehalten werden. Dies ist jedoch nicht der Fall, wie im weiteren Verlauf der Diskussion deutlich werden wird. Für die Überprüfung der potentiellen, zweiteiligen NLS 2 durch eine Mutationsanalyse wurde N45rot aufgrund der ausschließlich nukleären Lokalisation im Zellkern ausgewählt.

Um zu untersuchen, welche Bedeutung die basischen Aminosäuren im Bereich der SAF-Box auf die Kernlokalisierung des Proteins haben, wurden geladene Aminosäuren (Lysine und Arginine) gegen ungeladene Alaninreste ausgetauscht. Die fluoreszenz-

mikroskopische Analyse mutierter, konstitutiv exprimierter SAF-Box-Proteine zeigte, dass nur der Wildtyp (N45rot) und die Mutante K22A ausschließlich im Zellkern lokalisieren. Bei den anderen Mutanten kann man teilweise deutliche Defekte bei der Kernlokalisierung beobachten, die sich durch eine Anreicherung der Proteine im Cytoplasma bemerkbar machen. Besonders auffallend bei der Analyse der Lokalisationsmuster war, dass eine Mutante mehrere unterschiedliche Lokalisationen aufweisen kann (siehe Abb. 16). Es war zwar für die meisten Mutanten möglich, das typische Lokalisationsmuster zu bestimmen, dennoch ließen sich zum Beispiel bei überwiegend nukleärer Lokalisation eines Proteins auch Zellen finden, bei denen das Protein zusätzlich im Cytoplasma zu sehen ist.

Über eine Einzelzellsortierung wurde untersucht, ob die beobachtete Lokalisation für ein bestimmtes Protein typisch ist, oder ob die unterschiedlichen Phänotypen auf die Heterogenität der exprimierenden Mischpopulation zurückzuführen ist. Die hergestellten Einzelklone aller Zelllinien zeigten wieder die unterschiedlichen Lokalisationsmuster in verschiedenen Zellen. Offenbar wirkt sich ein Aminosäureaustausch nicht in jeder Zelle gleich aus. Vergleichbare Ergebnisse wurden in zahlreichen Publikationen auch von anderen Proteinen berichtet (Brownawell et al., 2001; Quadrini & Bieker, 2002; Pandya & Townes, 2002). Der überwiegende Effekt einer Mutation auf die Lokalisation der SAF-Box-Mutanten wurde ermittelt, indem die unterschiedlichen Lokalisationsmuster der elf mutierten Proteine in jeweils 150-180 Zellen statistisch erfasst wurden (Abb. 16 und Abb. 17). Die Mutationsanalyse zeigte, dass der zweite Bereich basischer Aminosäuren der potentiell zweiteiligen NLS 2 offenbar nicht an der Kernlokalisierung des Proteins beteiligt ist. Proteine mit Mutationen in diesem Bereich akkumulieren weiterhin überwiegend im Zellkern, während Mutationen im ersten Bereich basischer Aminosäuren dagegen eine überwiegend cytoplasmatische Lokalisation aufweisen. Die Analyse der Mutante N45 Δ aa21-24, bei der der zweite Bereich basischer Aminosäuren komplett deletiert wurde, bestätigte diese Ergebnisse. Dies bedeutet, dass die Kernlokalisierung des Wildtyps auf dem ersten Teil der NLS 2 beruht. Eine ähnliche NLS wurde im Proto-Onkogen c-Myc identifiziert (Dang & Lee, 1988). Die NLS des c-Myc (PAAKRVKLD) ähnelt stark dem ersten Teil basischer Aminosäuren in der SAF-Box (${}_{9}$ KKLKV ${}_{13}$), allerdings fehlen hier die für die Kernlokalisierung des c-Myc essentiellen Prolin- und Aspartatreste. Mittlerweile ist eine Vielzahl unterschiedlicher Kernlokalisierungssignale bekannt, von denen die meisten durch eine Anhäufung basischer Aminosäuren gekennzeichnet sind, jedoch von den beiden klassischen NLS-Typen abweichen (DeVries et al., 2002; Koike et al., 1999; Pokorska et al., 2000). Zudem werden immer häufiger Kernlokalisationssequenzen identifiziert, die keine oder

wenig basische Aminosäuren für den Kernimport benötigen (Romanelli & Morandi, 2002; Dang & Lee, 1988; Mo et al., 2000).

5.1.1.2. NLS 1 ist das funktionelle Kernlokalisierungssignal des SAF-A

Das Vorhandensein von zwei oder mehreren Kernlokalisierungssignalen in einem Protein ist durchaus keine Seltenheit. Im menschlichen Thyroid-Transkriptionsfaktor 2 konnten zwei identische Kernlokalisierungssignale identifiziert werden (Romanelli et al., 2003). Weitaus häufiger werden allerdings zwei unterschiedliche Signale innerhalb eines Proteins beschrieben (Shields & Yang, 1997; Quadrini & Bieker, 2002; Abramovich et al., 2002; Bäuerle et al., 2002). In Versuchen mit verschiedenen Deletionskonstrukten wurde untersucht, ob auch SAF-A zwei unterschiedliche, funktionelle Kernlokalisierungssignale trägt. Die potentielle NLS 2 in der SAF-Box wurde bisher isoliert in einem lediglich 45 Aminosäuren großen Teilbereich des SAF-A untersucht. Um die Funktionalität des Kernlokalisierungssignals im Gesamtprotein zu untersuchen, wurde die NLS 1 mittels PCR deletiert, wodurch gleichzeitig die Überprüfung der Funktionalität der deletierten NLS 1 ermöglicht wurde. Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen des entstandenen Proteins SAF-A Δ NLS zeigten, dass es, wie das Kontrollprotein Δ N45 Δ NLS, ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert (Abb. 19). Um die Wirkung der NLS 2 auf die Lokalisation eines weiteren großen Proteins in der Zelle beobachten zu können, wurde die SAF-Box mit der NLS 2 zwischen die 120 kDa große β -Galaktosidase und GFP kloniert. Auch dieses Protein konnte in transient transfizierten Zellen nicht im Zellkern angereichert werden (Daten wurden hier nicht gezeigt). Das heißt, die potentielle NLS 2 in der SAF-Box ist nicht ausreichend, um das gesamte SAF-A, oder ein ähnlich großes, heterologes Protein, in den Zellkern zu transportieren. Für die Kernlokalisation des gesamten SAF-A ist nach diesen Ergebnissen ausschließlich die NLS 1 (${}_{241}$ KKRGVKRPR ${}_{249}$) verantwortlich.

Wenn der Kernimport eines Proteins über Carrierproteine vermittelt wird, ist die Exposition des Kernlokalisierungssignals an der Oberfläche eines Proteins von großer Bedeutung (La Casse & Lefebvre, 1995). Das Zinkfingerprotein EKLF/KLF-1, bei dem eine DNA-bindende Domäne mit einem Kernlokalisierungssignal überlappt, konnte nur dann effizient in den Kern transportiert werden, wenn die korrekte Ausbildung der DNA-bindenden Domäne gegeben war (Quadrini & Bieker, 2002). Besonders deutlich wird die Rolle exponierter Aminosäuren in Kernlokalisierungssignalen an Beispielen des regulierten Kernimports: Bei einigen Proteinen wird die NLS durch die Bindung anderer

Proteine maskiert und ist nicht mehr zugänglich für Transportproteine wie Importin (Arenzana-Seisdedos et al., 1997; Wu et al., 2003; Gurbuxani et al., 2003). Die NLS 2 in der SAF-Box könnte also wegen der dreidimensionalen Struktur des gesamten SAF-A, im Gegensatz zum kurzen SAF-Box-Protein N45rot, nicht frei zugänglich sein und dadurch von Importfaktoren nicht erkannt werden. Um dies zu untersuchen, wurden mehrere unterschiedlich lange aminoterminalen Teilbereiche des SAF-A hergestellt und an ein Fluoreszenzprotein fusioniert. Die Analyse transfizierter HEK 293-Zellen zeigte, dass bei fortschreitender Verkürzung der Proteine eine immer stärkere Akkumulation der Proteine im Zellkern zu beobachten ist (Abb. 20 und 21). Es sieht also so aus, als wäre ein Kernimport kurzer Proteinbereiche möglich, wenn die Größe von ~230 Aminosäuren nicht überschritten wird.

5.1.1.3. Unspezifische Kernlokalisierung durch NLS 2

Die Untersuchungen zur Kernlokalisierung durch die NLS 2 weisen alle auf eine unspezifische Lokalisation der Proteine im Kern hin. N45rot könnte aufgrund seiner Größe frei in den Zellkern diffundieren und dort an Kernstrukturen binden, was zu einer Anreicherung der Proteine im Zellkern führen würde. Mehrere Experimente mit den mutierten SAF-Box-Proteinen zeigen allerdings, dass diese Erklärung für die deutliche Kernlokalisierung des N45rot nicht herangezogen werden kann: Eine Bindung an DNA kann ausgeschlossen werden, da die Mutanten G29A, L34A und L38A nicht mehr an DNA binden können, aber dennoch überwiegend im Zellkern lokalisieren (Abb. 22). Eine feste Bindung an andere Proteine oder Kernmatrixstrukturen findet bei diesen Proteinen ebenfalls nicht statt, wie in Fraktionierungsexperimenten gezeigt werden konnte. Die Proteine konnten, im Gegensatz zum Wildtyp oder der Mutante K22A, nach Permeabilisierung der Kernmembran nicht mehr im Zellkern detektiert werden (Abb. 23). FRAP-Experimente bestätigen zudem, dass die Mutanten G29A, L34A und L38A zu 100% mobil sind (Abb. 26). Für die Kernlokalisierung des N45rot muss es demnach eine andere Erklärung geben.

Möglicherweise kommt es bei dem kurzen SAF-Box-Protein zur Exposition von Aminosäuren, die normalerweise im gesamten SAF-A strukturell nicht zugänglich sind. Carrierproteine erkennen diese Sequenz als Kernlokalisierungssignal und transportieren das Protein „versehentlich“ in den Zellkern. Interessanterweise konnte während dieser Arbeit auch der umgekehrte Fall beobachtet werden: Die unspezifische DNA-Bindung eines Fluoreszenzproteins durch Fusion mit einem Kernlokalisierungssignal. Das Protein DsRed/NLS, bei dem lediglich die SV40 NLS an DsRed fusioniert wurde, bindet in

transfizierten Zellen während der Mitose an kondensierte Chromosomen, während die Chromosomen in DsRed-transfizierten Zellen kein assoziiertes Protein aufweisen. Bestätigt wurde diese Beobachtung durch FRAP-Experimente, die zeigen, dass DsRed/NLS im Vergleich zu DsRed deutlich immobil ist. (Die Daten dazu wurden hier nicht gezeigt, aber mit dem Protein GFP/NLS bestätigt.)

Cokol und Mitarbeiter (2000) untersuchten 736 DNA-bindende Proteine mit bekannter NLS und konnten zeigen, dass bei 90% der untersuchten Proteine eine Überlappung des Kernlokalisationsignals mit dem DNA-bindenden Motiv vorliegt. Die oft beobachtete Überlappung von NLS und DNA-bindenden Regionen legt nahe, dass DNA und Shuttle-Proteine wie Importin dieselben Aminosäurereste zur Bindung verwenden (LaCasse & Lefebvre, 1995). Bei der Entwicklung des Zellkerns kann es nützlich gewesen sein, dieselben Sequenzen für beide Funktionen zu benutzen, da viele Proteine im Zellkern an DNA binden, und so über diese spezielle Funktion auch ihren Tätigkeitsort zugewiesen bekommen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Kernlokalisierung des humanen SAF-A durch die NLS 1 im aminoterminalen Drittel des Proteins vermittelt wird. Die NLS 2 innerhalb der SAF-Box reicht dagegen nur aus, kürzere aminoterminalen Bereiche des SAF-A im Zellkern anzureichern. Dabei handelt es sich nach den vorliegenden Daten vermutlich um die unspezifische Erkennung basischer Aminosäuren durch Importproteine, und zumindest für SAF-A nicht um ein funktionelles, unabhängiges Kernlokalisierungssignal. Nicht auszuschließen ist allerdings die Möglichkeit, dass dieses Signal bei der Kernlokalisierung anderer SAF-Box-Proteine (vergl. Abb. 6) eine Rolle spielt.

5.1.2. Die konservierten Aminosäuren der SAF-Box sind notwendig für die DNA-Bindung des SAF-A

Die SAF-Box konnte in vielen eukaryotischen Organismen identifiziert werden (Kipp et al., 2000; vergl. auch Abb. 6). Eine Mutationsanalyse der SAF-Box, durch die bereits die Untersuchung des Kernlokalisierungssignals in diesem Proteinabschnitt ermöglicht wurde, wird in diesem Teilprojekt verwendet, um den Einfluss einzelner Aminosäuren auf die DNA-Bindung der Domäne zu untersuchen. SAF-A benötigt zur spezifischen und festen DNA-Bindung neben der SAF-Box auch die Multimerisierung mehrerer SAF-A-Moleküle. Isolierte SAF-Box-Proteine zeigten eine kaum nachweisbare DNA-Bindung, wenn sie nicht an eine Festphase gekoppelt werden, wodurch die benötigte Multimerisierung initiiert wird (Kipp et al., 2000). Um die Auswirkungen der Mutationen auf die DNA-

Bindung der isolierten SAF-Box verfolgen zu können, wurde die SAF-Box an DsRed fusioniert. DsRed ermöglicht aufgrund seiner Fähigkeit zur Bildung von Tetrameren und größeren Komplexen (Baird et al., 2000) die benötigte Multimerisierung, und damit eine deutliche Bindung an DNA. Das Fluorophor erlaubt außerdem die Untersuchung der Bindung an kondensierte Chromosomen *in vivo*. Alle elf Mutanten der SAF-Box, der Wildtyp und DsRed wurden auf die Fähigkeit zur Assoziation mit mitotischen Chromosomen untersucht. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass die meisten Mutationen in der SAF-Box zu einem totalen Verlust der Bindung an mitotische Chromosomen führen (Abb. 22). Der Wildtyp lokalisiert in jeder Phase der Zellteilung an den Chromosomen, wie es auch für das SAF-A-Gesamtprotein bekannt ist (Kipp et al., 2000). Außer K22A, das in der sehr späten Anaphase oder Telophase an mitotischen Chromosomen gebunden ist, weist nur noch die Mutante K9/10A eine schwache Assoziation mit den Chromosomen auf. Die anderen neun Mutanten können nicht mehr an kondensierte Chromosomen binden.

Über biochemische Versuchsansätze wurde überprüft, ob die mutierten SAF-Box-Proteine noch an Chromatin in Interphasezellen binden, und welche Chromatinfraction zur Bindung bevorzugt wird. In einem ersten Schritt wurden die Zellkerne sämtlicher mutierter SAF-Box-Proteine permeabilisiert. Proteine, die nach diesem Schritt nicht mehr im Zellkern detektiert werden konnten, wurden nicht weiter behandelt, da sie ungebunden vorliegen. Nur die Mutanten K22A, K9/10A und der Wildtyp konnten nach Permeabilisierung im Zellkern detektiert werden und wurden in einem weiteren Schritt mit DNase behandelt. K22A und N45rot konnten beide nach DNase-Verdau freigesetzt werden, was eine Bindung an Chromatin nahe legt. Die Vermutung, dass K9/10A nur in sehr geringem Umfang an DNA binden kann, bestätigt sich durch diese Fraktionierungen. Das Protein wird zwar ebenfalls nach Zerstörung der DNA freigesetzt, aber die eluierte Proteinmenge ist bei gleicher Ausgangsmenge wesentlich geringer als bei K22A und dem Wildtyp (Abb. 23). Sehr viel K9/10A-Protein geht schon nach Permeabilisierung der Zellkerne verloren, liegt also ungebunden vor. Die Bindung der Proteine N45rot, K22A und K9/10A an Chromatin wurde über eine Chromatinfractionierung näher untersucht. Durch die gewählte Fraktionierungsmethode mit *Micrococcus* Nuklease lassen sich transkriptionell aktives, inaktives oder Matrix-gebundenes Chromatin voneinander trennen. Der Vergleich der Proteine N45rot, K22A und K9/10A zeigte allerdings keinen Unterschied bei der Bevorzugung einer speziellen Chromatinfraction auf (Abb. 24).

Interessanterweise sind nicht nur hochkonservierte Aminosäurereste (zum Beispiel Glycin 29 oder Lysin 34), sondern ebenso die weniger konservierten Reste (zum Beispiel

die Lysine an den Positionen 12 und 17) für die DNA-Bindung von Bedeutung. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, werden nach Strukturvorhersagen im Bereich der SAF-Box zwei α -Helices ausgebildet (Kipp et al., 2000), die vermutlich die DNA-Bindung vermitteln. Möglicherweise wird durch die meisten Mutationen der SAF-Box die korrekte Ausbildung der dreidimensionalen Struktur gestört und führt so zum Verlust der DNA-Bindfähigkeit. Die DNA-Bindfähigkeit des K9/10A scheint stark beeinträchtigt, aber nicht vollkommen zerstört zu sein. Das Lysin 9 liegt direkt vor der ersten α -Helix, wogegen Lysin 10 schon ein Teil dieser Helix in der vorhergesagten SAF-Box-Struktur ist (Kipp et al., 2000). Durch den Verlust der positiven Ladungen kann es zu Schwierigkeiten bei der Ausbildung der dreidimensionalen Struktur der SAF-Box kommen. Bei der Mutante K9/10A ist der Effekt auf die Struktur möglicherweise nicht so einschneidend, da die betroffenen Aminosäuren am Anfang der ersten α -Helix liegen und nicht, wie andere mutierte Aminosäuren, mitten in den Helices.

Die Mobilität von Proteinen im Zellkern wird zu einem Großteil durch ihre Interaktion mit immobilen Bestandteilen bestimmt. Da Chromatin verhältnismäßig immobil ist (Abney et al., 1997; Kanda et al., 1998), verringert sich die Mobilität von Proteinen, wenn sie an DNA binden (Houtsmuller et al., 1999, 2001; Lever et al., 2000). Die Bestimmung der Mobilität eines Proteins in FRAP-Experimenten stellt demnach eine geeignete Methode dar, DNA-bindende Proteine und deren Mutanten *in vivo* zu analysieren. In einem weiteren Versuch zur DNA-Bindung der SAF-Box-Mutanten wurden FRAP-Experimente mit allen Proteinen durchgeführt, die deutlich im Zellkern lokalisieren (K22A, G29A, L34A, L38A und der Wildtyp). Die ausgewerteten Daten zeigen, dass die Mobilität des Wildtyps und der Mutante K22A im Vergleich mit den anderen drei Proteinen stark eingeschränkt ist (Abb. 26). Dabei scheint die Mutante K22A etwas mobiler zu sein als der Wildtyp, was sich auch in der niedrigeren Diffusionszeit ($t_{1/2}$) des Proteins widerspiegelt. Möglicherweise deutet die leicht erhöhte Mobilität der Mutante K22A eine Einschränkung der DNA-Bindfähigkeit an, die auch schon bei der Bindung des Proteins an kondensierte Chromosomen beobachtet werden konnte. Um zu klären, ob die Mutante K22A wirklich eine größere mobile Fraktion aufweist als der Wildtyp, wären allerdings weitere Messungen oder eine Messung über einen längeren Zeitraum nötig. Die FRAP-Experimente der Mutanten L34A, L38A und G29A bestätigten die Ergebnisse der DNA-Bindungs-Assays, die zeigen, dass die Mutation an einer der konservierten Aminosäuren zum totalen Verlust der DNA-Bindfähigkeit führt. Dadurch erreichen die Proteine eine Mobilität von 100%. Diese Proteine sind weder an DNA noch an andere Proteine oder Kernmatrix gebunden und können frei im Zellkern diffundieren.

Zur Vervollständigung dieser Ergebnisse muss nun in weiteren Versuchen die Spezifität der Mutanten bei der SAR/MAR-Bindung überprüft werden. Mit der Herstellung bakterieller Expressionsklone, welche die Untersuchung der *in vitro* Bindung an spezielle DNA-Substrate erlauben, wurde bereits begonnen. Bei diesen Versuchen ist besonders interessant, ob sich die Affinität des Wildtyps zu bestimmten DNA-Substraten von der der Mutante K22A unterscheidet.

5.2. Auswirkungen einer defekten SAF-Box auf Gesamt-SAF-A

Die DNA-Bindung der SAF-Box hängt, wie an der Mutationsanalyse der isolierten SAF-Box gezeigt werden konnte, stark von der Aminosäuresequenz der Domäne ab. Die Mutation einer einzigen Aminosäure reicht aus, um die DNA-Bindung durch die SAF-Box zu verhindern. Um die Auswirkungen einer funktionsunfähigen SAF-Box im gesamten SAF-A auf die Lokalisation und die Funktion des Proteins bei der Chromatinorganisation beobachten zu können, wurde exemplarisch eine hochkonservierte Aminosäure mutiert, das Glycin an Position 29 des SAF-A (Kipp et al., 2000; Aravind & Koonin, 2000; vergl. auch Abb. 6).

5.2.1. Charakterisierung des SAFG29A

Die Punktmutation an dieser Aminosäure wurde über PCR-basierte Mutagenese in SAF-A/GFP eingeführt. Die Analyse transient und stabil mit SAFG29A transfizierter Zellen zeigte, dass im Gegensatz zum Wildtyp eine DNA-Bindung des SAFG29A an mitotische Chromosomen nicht mehr stattfinden kann: Die Bereiche der kondensierten Chromosomen sind von dem mutierten Protein vollkommen ausgespart. Die Mutation einer einzigen Aminosäure innerhalb der SAF-Box im gesamten SAF-A zerstört die Fähigkeit zur DNA-Bindung des Proteins. Dies bestätigt die Ergebnisse, die in den oben beschriebenen Experimenten mit der isolierten SAF-Box erhalten wurden. Während der Interphase SAFG29A exprimierender Zellen kann ebenfalls eine deutlich veränderte Chromatinstruktur beobachtet werden: Bereiche, in denen SAFG29A akkumuliert, sind frei von DNA, während SAF-A transfizierte Zellen keine Veränderungen gegenüber untransfizierten Kontrollzellen zeigen.

Die Lokalisation des SAFG29A in Interphasezellen erinnert stark an die des $\Delta N45$, einem SAF-A/GFP-Protein, dem die gesamte SAF-Box fehlt (Kipp et al., 2000). Über FRAP-

Analysen wurden diese beiden Proteine miteinander verglichen und die Auswirkungen einer mutierten/deletierten SAF-Box auf die Mobilität des gesamten SAF-A bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass SAF-A/GFP mit defekter oder fehlender SAF-Box mehr als zweimal mobiler ist als der Wildtyp (Abb. 29). Die Proteine SAFG29A und $\Delta N45$ sind bezüglich des Kurvenverlaufs und des Anteils mobiler Proteine dagegen nahezu identisch.

Die Rückstromkurven der drei Proteine haben nach 49 Sekunden noch kein Plateau erreicht, was bedeutet, dass noch kein vollständiger Ausgleich zwischen dem geblichenen Bereich und dem nicht-geblichenen Bereich stattgefunden hat. Daher wurde für SAFG29A und SAF-A/GFP eine Langzeitmessung über einen Zeitraum von 335 Sekunden durchgeführt (Abb. 30). Diese FRAP-Experimente zeigen, dass SAF-A ein relativ immobiles Protein ist, und die SAF-Box durch Bindung an DNA an dieser Immobilität beteiligt ist. Die erhaltenen Kurven stellen, deutlicher sichtbar für SAF-A, vermutlich die Überlagerung einer klassischen Rückstromkurve mit einem linearen Anstieg über die Zeit dar.

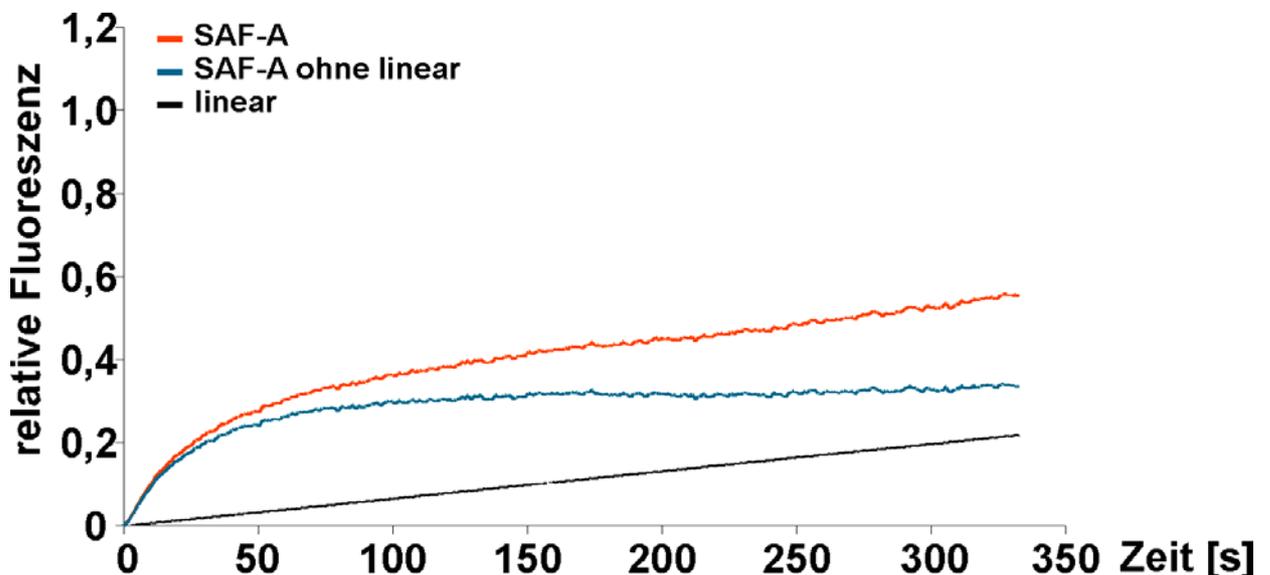


Abb. 43: Interpretation der SAF-A-Rückstromkurve

Die gemessene SAF-A-Rückstromkurve kann beschrieben werden als die Summe einer typischen Rückstromkurve (SAF-A ohne den linearen Anteil) und einer linearen Komponente (linear). Dies könnte bedeuten, dass es zu einem kontinuierlichen Austausch zwischen der löslichen und der unlöslichen Proteinfraction kommt.

SAF-A enthält eine geringere mobile Fraktion (~33%) und eine größere Fraktion (~67%), die transient an Strukturen gebunden ist und von dort mit einer konstanten Nettorate von 5%/min dissoziiert (Abb. 43). Die Mobilitätsmessungen von SAF-A/GFP bestätigen erstmals in lebenden Zellen frühere Beobachtungen, die bei *in situ* Kernfraktionierungen dieses Proteins gemacht werden konnten. Dabei war bestimmt worden, dass SAF-A zu etwa 25% frei, und zu 75% (25% an DNA und 50% an Kernmatrixstrukturen) gebunden vorliegt (Fackelmayer et al., 1994; Mattern et al., 1996).

Die SAF-Box allein ist aber nicht für die Immobilität des SAF-A verantwortlich, da SAFG29A und $\Delta N45$ immer noch eine immobile Fraktion von 30-40% aufweisen. Um die Bindung des SAFG29A an Kernmatrixstrukturen zu überprüfen, wurde eine *in situ* Matrixpräparation durchgeführt. Die Fraktionierung transient mit SAFG29A transfizierter HEK 293-Zellen zeigt, dass das Protein sämtlichen Fraktionierungsschritten widersteht und auch durch Hochsalzextraktion nicht aus dem Zellkern herauszulösen ist. Lediglich nach Permeabilisierung der Membranen wurde eine geringe Menge SAFG29A freigesetzt. Während der folgenden Fraktionierungsschritte, dem DNase-Verdau und der Extraktion mit 2 M NaCl verändert sich die schwammartige Lokalisation des SAFG29A wenig. Der Vergleich zu SAF-A/GFP, bei dem 25-30% der Moleküle an DNA gebunden vorliegen (Fackelmayer et al., 1994), erklärt die geringe Veränderung der SAFG29A-Struktur, da dieser Proteinanteil bei SAFG29A nach DNase-Verdau nicht eluiert wird. Die Immobilität des SAFG29A durch dessen Bindung an Kernmatrixstrukturen wird, wie beim Wildtyp, vermittelt vom Carboxyterminus des SAF-A, der in Zellfraktionierungen auch isoliert an Kerngerüststrukturen bindet (Herrmann, 2002). Interessanterweise sieht man die dreidimensionale, schwammartige Struktur des SAFG29A schon in unfraktionierten, stärker exprimierenden Zellen, wobei die Strukturen wesentlich größer sind, als sie bei Matrixpräparationen des SAF-A/GFP beobachtet werden können (Herrmann, 2002). Das Fehlen der DNA-Bindung scheint die normale Verteilung des Proteins so zu stören, dass es zu Verklumpungen des SAFG29A kommt.

5.2.2. Die Expression des SAFG29A behindert Replikation und Zellproliferation

Bei der Etablierung konstitutiv SAFG29A-exprimierender HEK 293-Zelllinien zeigte sich, dass nur geringe Mengen des Proteins von den Zellen toleriert wurden, eine stärkere Expression führte zum Absterben der Zellen. Außerdem konnten die stabil SAFG29A exprimierenden Zellen nicht über einen längeren Zeitraum in Kultur gehalten werden,

ohne dass es zu einer Zunahme von Zellen kam, die kaum oder kein fluoreszierendes Protein mehr exprimierten. Die Analyse des Proteins in diesen Zellen über einen Westernblot bestätigte diese Beobachtung, da nur noch eine geringe Menge des mutierten Proteins im Vergleich zu endogenem SAF-A detektiert werden konnte. Um die Expression des SAFG29A mit der des SAF-A/GFP vergleichen zu können, wurde der Proteingehalt des Wildtyps in Ganzzellextrakten transient und stabil transfizierter HEK 293-Zellen ermittelt, ohne dabei einen deutlichen Unterschied zwischen beiden Proteinen festzustellen. Für die Versuche mit den stabilen Zelllinien wurde eine Population schwach fluoreszierender SAF-A/GFP exprimierender Zellen ausgewählt, damit sie mit den ebenfalls schwach fluoreszierenden SAFG29A-Zellen vergleichbar sind. Für SAF-A/GFP ist es aber im Gegensatz zu SAFG29A möglich, stärker fluoreszierende stabile Zelllinien zu etablieren und diese auch über einen längeren Zeitraum zu kultivieren.

Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Expression des SAFG29A einen negativen Einfluss auf die Zellproliferation ausübt. Interessanterweise konnte für das Protein $\Delta N45$, dem die komplette SAF-Box fehlt, gezeigt werden, dass die DNA-Replikation in $\Delta N45$ transfizierten Zellen sehr stark eingeschränkt wird (Kipp et al., 2000). Wie eben beschrieben weist $\Delta N45$ eine ähnliche Lokalisation wie SAFG29A auf und zeigt ein vergleichbares Verhalten in FRAP-Experimenten. Diese Anhäufung von Hinweisen führte zu einem Experiment, bei dem die Auswirkung des SAFG29A auf die DNA-Replikation verfolgt werden konnte. Dazu wurde replizierte DNA durch den Einbau von BrdU und Immunfärbung visualisiert und mit der Lokalisation des SAFG29A verglichen. Die Ergebnisse (Abb. 33) sind sehr deutlich und liefern gleichzeitig eine Erklärung für die Beobachtungen bei der Etablierung stabiler Zelllinien: Je mehr SAFG29A in den Zellen exprimiert wird, desto weniger DNA wird repliziert. In stark exprimierenden Zellen konnte keine replizierte DNA mehr detektiert werden.

Da für $\Delta N45$ ebenso eine gestörte Replikation und Zellproliferation gezeigt werden konnte, scheint die Beeinträchtigung der Replikation auf dem Fehlen einer funktionsfähigen DNA-bindenden Domäne zu beruhen. Die beobachtete Verdrängung des Chromatins in SAFG29A-freie Bereiche in Interphasekernen scheint die Folge großer struktureller Veränderungen im Zellkern zu sein. Eine weit verbreitete Modellvorstellung geht davon aus, dass die 30 nm Fasern des Chromatins im Interphasekern schleifenartig organisiert sind (Abb. 4). Diese Schleifen sind 20.000 bis 80.000 bp lang (Gasser et al., 1989) und stellen *in vivo* vermutlich jeweils eine unabhängige funktionelle Einheit dar (Goldman, 1988). Unter Berücksichtigung dieses

Modells, bei dem SAF-A durch die Bindung an SAR-DNA und die Assoziation an Kernmatrixstrukturen an der Chromatinorganisation und der Kompartimentierung des Zellkerns beteiligt ist (Fackelmayer, 2000), könnte der Verlust der DNA-Bindung des SAF-A zu einer kollabierten Chromatinstruktur führen.

Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der hochkonservierten SAF-Box für die Aufrechterhaltung elementarer Zellfunktionen. Das Fehlen einer funktionsfähigen SAF-Box äußert sich in einer gestörten DNA-Replikation und dadurch eingeschränkter Zellproliferation. Zur Absicherung dieser Ergebnisse wäre es sinnvoll, durch etablierte Methoden, wie FACS-Analysen und Messung der DNA-Replikation über Tritium-Thymidin, den Einfluss des SAFG29A auf die Zellproliferation zu quantifizieren.

5.3. Identifizierung der Multimerisierungsdomäne des SAF- A

Zur spezifischen und stabilen Bindung des SAF-A an DNA wirken zwei Effekte zusammen: Zum einen bindet die konservierte SAF-Box an ‚A-Tracts‘ in der Zielsequenz. Um die Bindung der SAF-Box zu stärken, ist des Weiteren eine Multimerisierung des SAF-A erforderlich (Kipp et al., 2000). Schon früh konnte beobachtet werden, dass die DNA-Bindung des SAF-A einhergeht mit einer Selbstorganisation von filamentösen Multimeren des Proteins (Fackelmayer & Richter, 1994 b). Die Spezifität der Bindung an SAR-DNA ergibt sich erst durch eine kooperative Bindung von mindestens fünf ‚A-Tracts‘ in einer Sequenz von 200 oder mehr Basenpaaren (Kipp et al., 2000). Interessanterweise benötigen auch andere SAR/MAR-Bindeproteine wie Histon H1, Topoisomerase II und Lamine zur Bindung an SAR/MAR-DNA eine Multimerisierung (Izaurralde et al., 1989; Adachi et al., 1989; Luderus et al., 1994). Zur Untersuchung des DNA-Bindungsmodus des SAF-A genügt es also nicht, lediglich auf die SAF-Box zu fokussieren, da auch der für die Selbstorganisation des Proteins verantwortliche Proteinabschnitt ein notwendiger Bestandteil der DNA-Bindung ist. Die Identifizierung der Multimerisierungsdomäne des SAF-A war daher das Ziel eines weiteren Teilprojektes dieser Arbeit.

5.3.1. Die Multimerisierungsdomäne liegt im Carboxyterminus des SAF-A

Zum Nachweis der SAF-A/SAF-A-Interaktion *in vivo* wurden verschiedene Immunfällungs-Experimente durchgeführt. Dazu wurden zunächst Ganzzellextrakte von

HEK 293-Zellen, die mit GFP-fusionierten Teilkonstrukten des SAF-A transfiziert wurden, mit α -GFP Antikörpern immungefällt und im Westernblot auf endogenes, copräzipitiertes SAF-A überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass endogenes SAF-A mit C280, dem carboxyterminalen Drittel des SAF-A, copräzipitiert (Abb. 34). Das aminoterminalen Drittel (N280) und der mittlere Bereich (I280) zeigten keine Wechselwirkung mit endogenem SAF-A. Mit C280 wurden in den Immunfällungen transfizierter Zellen neben SAF-A außerdem die Proteine hnRNP-C1/C2 und hnRNP-A copräzipitiert. Eine Wechselwirkung der Proteine hnRNP-C1/C2, SAF-A und C280 konnte in weiteren Immunfällungen bestätigt werden. Dazu wurde endogenes SAF-A über einen monoklonalen SAF-A-spezifischen Antikörper aus Ganzzellextrakten C280 transfizierter 293-Zellen gefällt. Da das Epitop dieses Antikörpers nicht in den carboxyterminalen 280 Aminosäuren des SAF-A liegt, wurde gewährleistet, dass C280 nur über eine Interaktion mit endogenem SAF-A copräzipitiert werden kann. In einem zweiten Versuch wurden die hnRNP-Proteine C1/C2 über einen spezifischen, monoklonalen Antikörper gegen hnRNP-C1/C2 gefällt. Bei beiden Versuchen konnten Komplexe aus SAF-A, C280 und den hnRNP-Proteinen C1/C2 gefällt werden. Diese Versuche zeigen eindeutig, dass die Multimerisierung des SAF-A vom carboxyterminalen Drittel des Proteins vermittelt wird. Die Immunfällungen des C280 zeigten in den Proteingelen einige nicht-identifizierte Banden copräzipitierter Proteine. Da verschiedene Proteine als Interaktionspartner des SAF-A identifiziert werden konnten (Eggert et al., 1997, 2001; Martens et al., 2002; Kim & Nikodem, 1999; Taniura & Yoshikawa, 2002; Davis et al., 2002), wäre es interessant zu untersuchen, ob der carboxyterminale Bereich des SAF-A auch für Wechselwirkungen des SAF-A mit anderen Proteinen verantwortlich ist.

5.3.2. Die Multimerisierung des SAF-A ist unabhängig von RNA

SAF-A ist als größtes hnRNP-Protein Bestandteil von hnRNP-Partikeln (Kiledjian & Dreyfuss, 1992). In den Immunfällungen mit C280 konnte gezeigt werden, dass SAF-A mit den hnRNP-Proteinen C1/C2 und A copräzipitiert. Über Immunfärbungen mit monoklonalen α -hnRNP-C1/C2 Antikörpern konnte außerdem die Kolokalisation des endogenen SAF-A mit hnRNP-C1/C2 *in situ* gezeigt werden (Abb. 36). Für C280, das carboxyterminale Protein des SAF-A, wäre nach den Ergebnissen der Immunfällungen ebenfalls eine Kolokalisation zu erwarten gewesen, da C280 an endogenes SAF-A gebunden ist. Tatsächlich überlappt die Lokalisation des C280 nur in schwach exprimierenden Zellen mit der von hnRNP-C1/C2 komplett. Stärker exprimierende Zellen, die das typische schwammartige Lokalisationsmuster des C280/GFP zeigen,

weisen keine perfekte Kolo­kalisierung mit den hnRNP-Proteinen auf, jedoch überlappen auch bei diesen Zellen weite Bereiche. Die Nukleoli sind frei von endogenem SAF-A und hnRNP-Proteinen, bei C280 transfizierten Zellen dagegen konnte beobachtet werden, dass bei den meisten Zellen die Nukleoli im Gegensatz zu den hnRNP-Proteinen ebenfalls GFP-markiertes C280 aufweisen. Vermutlich ist die Akkumulation des C280 in Nukleoli dadurch zu erklären, dass unvollständig gefaltete Proteine oder Abbauprodukte zu Nukleoli transportiert werden (Nollen et al., 2001).

Da die RNA-bindende Domäne des SAF-A innerhalb des C280 liegt, wäre es möglich, dass die beobachtete Interaktion des endogenen SAF-A mit C280 über RNA vermittelt wird. Um auf eine direkte Wechselwirkung des C280 mit SAF-A zu testen, wurde eine Immunpräzipitation RNase-behandelter Ganzzelextrakte durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Fällung zeigen deutlich, dass die copräzipitierte Menge endogenes SAF-A nicht von der RNase-Behandlung beeinflusst wird, das heißt die Interaktion des C280 mit SAF-A beruht nicht auf einer Bindung an RNA. Die Ergebnisse sprechen außerdem für einen stöchiometrischen Bindungsmodus, da endogenes SAF-A nach RNase-Verdau in gleichen Mengen copräzipitiert wie C280.

Die Menge des copräzipitierten hnRNP-C1/C2 ist in RNase-behandelten Zellextrakten deutlich reduziert, während hnRNP-A nicht mehr im Präzipitat vorhanden ist (Daten hier nicht gezeigt). In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass SAF-A-Moleküle direkt über den Carboxyterminus interagieren. SAF-A selbst ist Bestandteil von hnRNP-Komplexen, weswegen die hnRNP-Proteine C1, C2 und A hauptsächlich über die Bindung an RNA mit SAF-A copräzipitieren.

5.3.3. Die carboxyterminalen 84 Aminosäuren des SAF-A sind für die Multimerisierung ausreichend

In den vorausgegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Interaktion des SAF-A mit C280 von RNA unabhängig ist. Die RGG-Box liegt zwischen den Aminosäuren 695-757 des SAF-A (Kiledjian & Dreyfuss, 1992), scheint aber für die Multimerisierung des SAF-A nicht benötigt zu werden. Über weitere Immunpräzipitationen mit kürzeren Teilbereichen des C280, denen die RNA-bindende Domäne fehlt, war es deshalb möglich, die Multimerisierungsdomäne des SAF-A einzugrenzen. In Immunpräzipitationen des CC140, einem Protein, das aminoterminal die RGG-Box noch enthält, konnte endogenes SAF-A ebenso wie die hnRNP-Proteine detektiert werden. Durch weiter verkürzte carboxyterminale Proteine, denen die RGG-Box fehlt, konnte die Interaktion mit endogenem SAF-A auf die letzten 84 Aminosäuren

des Proteins eingegrenzt werden. Eine weitere Eingrenzung der Multimerisierungsdomäne war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, da kleinere Proteine sehr schnell abgebaut wurden. Die starke Degradation dieser drei Proteine erklärt auch deren cytoplasmatische Lokalisation, da die carboxyterminalen Abbauprodukte der Proteine mit dem Fluorophor nicht mehr über die am Aminoterminus eingefügt SV40 NLS verfügen. Die letzten carboxyterminalen Aminosäuren des SAF-A scheinen, zumindest bei Fusionen mit GFP, für die Stabilität der Proteine sehr wichtig zu sein, da nicht nur die sehr kurzen Proteine C64 Δ v und C64 Δ h sehr schnell degradieren, sondern ebenso das Protein C280 Δ h20 und ein vor kurzem in unserem Labor hergestelltes Protein SAF-A Δ 20. Die Fähigkeit des C84, ohne RGG-Box endogenes SAF-A zu fällen, bestätigt erneut, dass die Bindung des SAF-A an C280 RNA-unabhängig ist. Wie die Interaktion der SAF-A-Moleküle stattfindet, ist noch nicht klar. Innerhalb des C84 findet sich eine Anhäufung von Tryptophanen, die über hydrophobe Wechselwirkungen mit anderen Proteinen oder SAF-A selbst eine Bindung vermitteln könnten. Zur Zeit wird in unserem Labor an einer Punktmutationsanalyse dieser Tryptophane gearbeitet, um die Auswirkungen dieser Aminosäuren auf die Wechselwirkung mit SAF-A zu analysieren.

Zusammenfassend konnte in diesen Experimenten gezeigt werden, dass die Multimerisierung des SAF-A von den carboxyterminalen 84 Aminosäuren des Proteins vermittelt wird. Die Interaktion des Carboxyterminus mit endogenem SAF-A ist dabei nicht RNA-abhängig, sondern beruht auf einer direkten Bindung der Proteine.

5.4. SAF-A benötigt die Multimerisierungsdomäne zur Kernmatrixbindung

Die Identifizierung und Eingrenzung der Multimerisierungsdomäne im Carboxyterminus von SAF-A führte zur Frage, ob ein Zusammenhang zwischen dieser Domäne und der Bindung des SAF-A an Kernmatrixstrukturen besteht. Innerhalb des Carboxyterminus des SAF-A konnten mehrere funktionelle Bereiche identifiziert werden: Die RGG-Box, die die Bindung an RNA vermittelt (Kiledjian & Dreyfuss, 1992), der Proteinabschnitt, der für die Assoziation mit Kernmatrixstrukturen verantwortlich ist (Herrmann, 2002) und, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, die Multimerisierungsdomäne des SAF-A. Klassische *in situ* Kernmatrixpräparationen zeigten, dass C280 salzstabil an Kernmatrixstrukturen bindet. Der für diese Bindung verantwortliche Proteinabschnitt konnte des Weiteren auf die

letzten 210 Aminosäuren des SAF-A eingegrenzt werden (Herrmann, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Assoziation des C280 mit unlöslichen Zellkernbestandteilen durch Chromatinfractionierungen bestätigt, bei denen C280 in Fraktionen mit fest assoziierter Matrix-DNA akkumuliert (Abb. 39). Die Immunfärbung des Lamin B, das an Kernlamina gebunden und gänzlich immobil ist (Mearini et al., 2004), zeigte, dass dieses Protein in denselben Fraktion detektiert werden kann wie C280. Um diese Ergebnisse mit der Multimerisierungsdomäne des SAF-A in Zusammenhang zu bringen, wurde überprüft, ob C84 ebenfalls an Kerngerüststrukturen assoziiert oder ob diese Eigenschaft des SAF-A in einem weiter aminoterminal gelegenen Abschnitt des C280 liegt. Die *in situ* Kernmatrixpräparation des C84 zeigte deutlich, dass auch dieses Protein salzstabil an Kerngerüststrukturen binden kann (Abb. 40).

Die biochemische Fraktionierung von Zellen zur Präparation von Kernmatrixstrukturen wird von einigen Autoren kontrovers diskutiert (Peterson, 2000 b; Hancock, 2000). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen allerdings am Beispiel des SAF-A, dass die Beobachtungen einer *in situ* Matrixpräparation durchaus mit dem Verhalten der Proteine *in vivo* übereinstimmen können (Kapitel 5.2.1.). Daher wurden auch für die carboxyterminalen Teilkonstrukte Mobilitätsbestimmungen über FRAP-Experimente durchgeführt. Die Mobilität der carboxyterminalen Teilkonstrukte C280, CC140 und C84 wurde in lebenden Zellen analysiert, wodurch Rückschlüsse gezogen werden können, ob die Proteine im Zellkern frei oder ungebunden vorliegen. Nach den Ergebnissen der Immunpräzipitationen, wäre bei Mobilitätsbestimmungen des C280 eine ähnlich große immobile Fraktionen zu erwarten gewesen wie beim gesamten SAF-A. Tatsächlich ist die immobile Fraktion des C280 etwas geringer als die des SAF-A. Unter Berücksichtigung der Instabilität dieses Proteins und dem damit verbundenen Auftreten von Abbauprodukten mit GFP, ist die Immobilität des C280 allerdings wahrscheinlich größer, als es in diesen Versuchen deutlich wird. Die Mobilitätsbestimmungen dieser Proteine in der vorliegenden Arbeit und in vergleichbaren Experimenten unseres Labors sprechen eindeutig dafür, dass der Carboxyterminus des SAF-A durch die Assoziation mit der Kernmatrix für die Immobilität des Proteins hauptsächlich verantwortlich ist. Die Mobilität der verkürzten carboxyterminalen Konstrukte nimmt mit der Abnahme der Größe zu. CC140 ist im Rahmen dieser Messung noch nicht vollständig in den geblichenen Bereich zurückgekehrt, C84 ist dagegen nach 39 Sekunden wieder vollständig homogen im Zellkern verteilt. Der vollständige Rückstrom der Proteine in den geblichenen Bereich bedeutet aber nicht, dass das Protein vollkommen ungebunden vorliegt. Dies wird deutlich, wenn man die Halbwertszeiten des C84 mit der eines Proteins vergleicht, das

im Zellkern frei diffundieren kann: C84 ist um den Faktor 36 langsamer als L34A (Abb. 26), da es vermutlich transient an Kernstrukturen immobilisiert ist. Durch die transiente Bindung von Proteinen an Kernmatrixstrukturen kann die Mobilität von Proteinen deutlich gesenkt werden (Shopland & Lawrence, 2000; Kruhlak et al., 2000). Die beobachtete Bindung des C84 an Kernmatrix bei einer klassischen Matrixpräparation bestätigt diese Ergebnisse (Abb. 40).

Die verringerte Mobilität des CC140 im Vergleich zu C84 ist nicht allein auf den Größenunterschied der beiden Proteine zurückzuführen, sondern deutet darauf hin, dass neben der Multimerisierungsdomäne ein weiterer Teil, vermutlich die RNA-bindende Domäne, an der Matrixbindung beteiligt ist. Die Untersuchung einer neuen Mutante SAF-A Δ 84 könnte interessante Hinweise liefern, ob ausschließlich die letzten 84 Aminosäuren des SAF-A die Matrixbindung vermitteln, oder weitere Bereiche an der Bindung beteiligt sind. Erste Experimente zeigen, dass dieses Protein in Matrixpräparationen auch nach Hochsalzextraktion detektiert werden kann. Allerdings ist SAF-A Δ 84 dabei hauptsächlich an den Nukleoli assoziiert, und zeigt nicht die schwammartige Verteilung des C280, SAFG29A oder C84 nach Matrixpräparation.

Nach den vorliegenden Ergebnissen ist die Multimerisierungsdomäne innerhalb der letzten 84 Aminosäuren des SAF-A durch die Interaktion mit anderen SAF-A-Molekülen maßgeblich an der Assoziation des Proteins mit Kernmatrixstrukturen beteiligt, aber vermutlich nicht ausschließlich für die Kernmatrixbindung verantwortlich.

5.5. Bedeutung dieser Ergebnisse für Gesamt-SAF-A

SAF-A ist ein multifunktionelles Kernprotein, das durch seine vielfältigen Eigenschaften – DNA- bzw. SAR/MAR-Bindung, RNA-Bindung, Assoziation mit Kerngerüststrukturen sowie Proteininteraktionen – eine bedeutende Rolle bei architektonischen Prozessen im Zellkern einnehmen kann. Die Möglichkeiten des SAF-A zwischen DNA, Kernmatrix und Proteinen zu vermitteln, macht es zu einem geeigneten Instrument für spezifische, regulatorische Interaktionen. Um eine Vorstellung zu bekommen, wie diese Prozesse tatsächlich ablaufen, ist es nötig, die Struktur des SAF-A und seine funktionellen Domänen zu kennen. In dieser Arbeit wurde die DNA-bindende Domäne untersucht, sowie die Multimerisierungsdomäne des Proteins identifiziert. Des Weiteren wurde versucht, die Multimerisierungsdomäne mit der ebenfalls im Carboxyterminus lokalisierten Kernmatrix-bindenden Eigenschaft des SAF-A in Verbindung zu bringen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen das schon früher postulierte Schleifenmodell (Fackelmayer, 2000), bei dem SAR-DNA über Proteinkomponenten an das Kerngerüst gebunden ist. Bei SAF-A, einer dieser Komponenten, spielt die DNA-Bindeaktivität eine entscheidende Rolle bei der Lokalisation des Proteins. Bereits eine einzige Punktmutation in der DNA-Bindedomäne des SAF-A führt zu einer Strukturveränderung des Chromatins, und in der Folge zu Defekten der DNA-Replikation und Zellproliferation. Die schwammartige Lokalisation dieses Proteins deutet, im Vergleich zum Wildtyp, auf einen Verlust feiner Strukturen des Kerngerüsts hin.

Diese Lokalisation des SAFG29A in Interphasezellen ähnelt sehr der Lokalisation des carboxyterminalen GFP-Fusionsproteins C280. Interessanterweise übt auch dieses Protein einen negativen Effekt auf die Replikation und Zellproliferation aus (unveröffentlichte Daten). C280 stellt den Proteinbereich des SAF-A dar, der die Matrixbindung vermittelt (Hermann, 2002). Dabei ist es nach den vorliegenden Ergebnissen wahrscheinlich nicht so zu verstehen, dass C280 eine unabhängige Domäne beinhaltet, die an bestehende Kernmatrixstrukturen bindet. Die Versuche zur Multimerisierungsdomäne über Immunpräzipitationen und die Analyse unterschiedlicher carboxyterminaler Bereiche zeigen vielmehr, dass SAF-A wahrscheinlich mit anderen hnRNP-Proteinen und RNA ein „bildender Bestandteil“ der Kernmatrixstrukturen ist. Arbeiten von Tan et al. (2000) unterstützen diese Vermutung, da unter den typischen Bedingungen zur Präparation der Kernmatrix, hnRNP-Proteine *in vitro* zu salzstabilen Filamenten aggregieren, die den Filamenten der Kernmatrixpräparationen sehr stark ähneln. Bei der Ausbildung der Kerngerüststrukturen wurde den hnRNP-Proteinen schon früh eine bedeutende Rolle zugeordnet (Fey et al., 1986). Die Beteiligung des SAF-A an der Ausbildung eines Netzwerks, das hauptsächlich aus hnRNP-Proteinen, RNA und anderen Proteinen gebildet wird, erscheint durch einige Ergebnisse dieser Arbeit nahe liegend. Die Multimerisierungsdomäne des SAF-A führt – bei Vorhandensein von DNA – zu filamentösen Multimeren des Proteins. Da in den Immunpräzipitationen gezeigt werden konnte, dass SAF-A über die RNA-bindende Domäne zusätzlich mit anderen hnRNP-Proteinen komplexiert, scheinen sowohl die Multimerisierung von SAF-A-Proteinen als auch die Bindung an hnRNP-Proteine an der Assoziation an Kernmatrixstrukturen beteiligt zu sein. Die Analyse des SAF-A in lebenden Zellen zeigte in FRAP-Experimenten, dass dieses Protein eine große immobile Proteinfraction enthält – eine notwendige Bedingung für ein Kernmatrixprotein. Interessanterweise stimmen die Anteile der immobilen und mobilen Fraktion des Proteins *in vivo* ziemlich genau mit denen der biochemischen *in situ* Matrixpräparationen überein.

Die Vorstellung, dass es sich bei der Kernmatrix um ein starres Gerüst handelt, ist vermutlich nicht zutreffend und hinderlich bei der Vorstellung eines *in vivo* existierenden Kerngerüsts. Unter Berücksichtigung des SAF-A als häufigstes SAR/MAR-bindendes Kernmatrixprotein kann man sich ein wesentlich flexibleres Kerngerüst vorstellen. Matrixpräparationen, bei denen durch harsche, biochemische Schritte Proteinkomplexe und andere angeheftete Proteine vom Kerngerüst entfernt wurden, zeigen ein relativ feines Netzwerk von Fasern mit 2-3 nm Durchmesser, welches hauptsächlich aus heterogener nukleärer RNA (hnRNA) und Proteinen besteht. Die immobile Fraktion der SAF-A-Moleküle könnte mit anderen hnRNP-Proteinen und Matrixproteinen einen Bestandteil dieser Struktur darstellen. Die Daten der FRAP-Experimente des SAF-A und der Immunpräzipitationen unterstützen diese Vermutung. Die weitere Behandlung einer Kernmatrixpräparation mit RNase zerstört das Fasergeflecht und führt zur Auflösung von Chromosomenterritorien (Ma et al., 1999). Diese Ergebnisse passen sehr gut zu den Beobachtungen bei SAFG29A exprimierenden Zellen: Bei diesen Zellen wurde das Kerngerüst nicht direkt zerstört, sondern durch den Verlust der Fähigkeit DNA an das Kerngerüst anzuheften strukturell verändert. Freie SAF-A-Moleküle binden möglicherweise erst schwach an SAR-DNA. Durch die Anlagerung weiterer SAF-A-Moleküle, die mit dem ersten interagieren, wird die Bindung stabilisiert und gleichzeitig spezifischer (Kipp et al., 2000). Dieser Komplex kann dann durch die Multimerisierung mit immobilem SAF-A und anderen hnRNP-Proteinen über RNA an der Kernmatrix verankert werden. Der Proteinkomplex mit der „fixierten“ DNA bietet dann eine Plattform für unterschiedliche Prozesse, wie Transkription oder Replikation. Eine schonende Präparation der Kernmatrix ohne abschließende Hochsalzextraktion zeigt 20-50 nm dicke polymorphe Fasern, an denen Proteinkomplexe angelagert sind (He et al., 1990). Diese Proteinkomplexe stellen vermutlich „molekulare Fabriken“ der DNA-Replikation oder Transkription dar (Hassan & Cook, 1993; Hozak et al., 1993; Jackson et al., 1993). SAR/MAR-Elemente, die von SAF-A bevorzugt gebunden werden, liegen häufig in der Nähe von regulatorischen Sequenzen wie Enhancer-Elementen oder Promotoren und flankieren transkribierte Gene oder Gengruppen (Gasser & Lämmli, 1986; Blasquez et al., 1989). Bekannte Interaktionen mit verschiedenen Proteinen zeigen, dass SAF-A unter anderem regulatorische Prozesse auf der Ebene der Transkription beeinflussen kann (Eggert et al., 1997, Kim & Nikodem, 1999). Nach den vorliegenden Daten zu SAF-A ist eine architektonische Funktion des Proteins bei diesen Vorgängen vorstellbar, bei der sowohl Proteine als auch DNA an der Kernmatrix in räumliche Nähe zueinander gebracht werden können. Eine direkte Korrelation zwischen Transkription und Kernmatrix konnte nach Behandlung von Zellen mit Transkriptionshemmstoffen

beobachtet werden, die zu einem Zusammenbruch der Kernmatrix führten (Fey et al., 1986; Nickerson et al., 1989).

Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen sehr gut mit den bislang bekannten Eigenschaften und Funktionen des SAF-A überein, und zeigen wie ein immobiles Kerngerüst an der höheren Chromatinstruktur beteiligt sein könnte. Das durch diese Arbeit erweiterte Verständnis der Domänenstruktur des SAF-A unterstreicht die elementare Bedeutung des humanen SAF-A bei der Organisation des Chromatins im humanen Zellkern und bildet die Grundlage, mögliche weitere Aufgaben und Interaktionen des Proteins zu verstehen.

6. Zusammenfassung

Das humane Kernprotein ‚Scaffold Attachment Factor A‘ (SAF-A) ist ein multifunktionelles Zellkernprotein, das sowohl an der mRNA-Reifung als auch an der DNA-Replikation beteiligt ist. Aufgrund seiner Lokalisation in Kernmatrixstrukturen und seiner spezifischen Bindung an SAR/MAR-DNA nimmt SAF-A vermutlich eine strukturierende Aufgabe bei der Organisation des Chromatins im Zellkern ein. In dieser Arbeit wurden drei funktionelle Domänen des Proteins detailliert untersucht, die für die Kernlokalisierung, die spezifische DNA-Bindung und die Multimerisierung des Proteins verantwortlich sind.

In dieser Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass die Kernlokalisierung des SAF-A von einer neun Aminosäuren großen NLS im aminoterminalen Drittel des Proteins vermittelt wird. Ein zweites vorhergesagtes Signal innerhalb der SAF-Box ist nicht funktionell für Gesamt-SAF-A, wie durch fluoreszenzmikroskopische Analysen mutierter SAF-Box- und SAF-A-Proteine gezeigt werden konnte.

Durch Mutationsanalysen der evolutionär konservierten SAF-Box wurden die für die DNA-Bindung des Proteins notwendigen Aminosäurereste bestimmt. Über verschiedene experimentelle Ansätze konnte gezeigt werden, dass bis auf zwei, alle der elf SAF-Box-Mutanten die Fähigkeit zu DNA-Bindung verloren haben. Auf diese Ergebnisse aufbauend wurde die Rolle der DNA-Bindung für die Funktion des Gesamtproteins untersucht. Als Ergebnis dieser Arbeiten konnte ein dominant negatives SAF-A-Konstrukt hergestellt werden, bei dem eine einzige Punktmutation nicht nur zum Verlust der DNA-Bindung, sondern darüber hinaus zu einer Umgestaltung des Kerngerüsts und einer Blockade der DNA-Replikation führt.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde die Domäne charakterisiert, die für die Multimerisierung von SAF-A verantwortlich ist. Es zeigte sich, dass die Multimerisierung von SAF-A durch eine direkte Interaktion der carboxyterminalen 84 Aminosäuren vermittelt wird. Vergleichende Analysen mit weiteren carboxyterminalen Teilkonstrukten des SAF-A zeigten, dass die Multimerisierungsdomäne maßgeblich an der Bindung des SAF-A an Kerngerüststrukturen beteiligt ist.

Diese Ergebnisse belegen zum ersten Mal die funktionelle Relevanz der DNA-Bindung und Multimerisierung von SAF-A für die DNA-Replikation und Zellproliferation. Dies stärkt die kontrovers diskutierte Hypothese, dass Gerüststrukturen des Zellkerns in der lebenden Zelle an essentiellen genetischen Prozessen beteiligt sind.

7. Literaturverzeichnis

- Abney, J.R., Cutler, B., Fillbach, M.L., Axelrod, D. and Scalettar, B.A.** (1997) Chromatin dynamics in interphase nuclei and its implication for nuclear structure. *J. Cell Biol.* **137**(7): 1459-68.
- Abramovich, C., Chavez, E.A., Landsdorp, P.M. and Humphries, R.K.** (2002) Functional characterization of multiple domains involved in the subcellular localization of the hematopoietic Pbx interacting protein (HPIP). *Oncogene* **21**: 6766-71.
- Adachi, U., Käs, E. and Laemmli, U.K.** (1989) Preferential cooperative binding of DNA topoisomerase II to scaffold-associated regions. *EMBO J.* **8**(13): 3997-4006.
- Aebi, U., Buhle, L., Cohn, J. and Gerace, L.** (1986) The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type-filaments. *Nature* **323**(6088): 560-64.
- Akey, C.W. and Radermacher, M.** (1993) Architecture of the *Xenopus* nuclear pore complex revealed by three-dimensional cryo-electron microscopy. *J. Cell Biol.* **122**(1):1-19.
- Aravind, L. and Koonin, E.V.** (2000) SAP - a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization. *Trends Biochem. Sci.* **25**(3):112-4.
- Arenzana-Seisdedos, F., Turpin, P., Rodriguez, M., Thomas, D., Hay, R.T., Virelizier, J.L. and Dargemont, C.** (1997) Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *J. Cell Sci.* **110** (Pt3): 369-78.
- Aris, J. P. and Blobel, G.** (1991) cDNA cloning and sequencing of human fibrillarin, a conserved nucleolar protein recognized by autoimmune antisera. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**(3): 931-35.
- Baird, G.S., Zacharias, D.A. and Tsien, Y.** (2000) Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *PNAS* **97**(22): 11984-89.
- Bannister, A. J. and Kouzarides, T.** (1996) The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* **384**(6610): 641-3.
- Bäuerle, M., Doenecke, D. and Albig, W.** (2002) The requirement of H1 histones for a heterodimeric nuclear import receptor. *J. Biol. Chem.* **227**(36): 32480-89.
- Berezney, R. and Coffey, D.S.** (1974) Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **60**(4): 1410-17.
- Berezney, R.** (1991) The nuclear matrix: a heuristic model for investigating genomic organization and function in the cell nucleus. *J. Cell. Biochem.* **47**: 109-123.
- Bickmore, W. A. and Sutherland, H. G.** (2002) Addressing protein localization within the nucleus. *Embo J.* **21**(6): 1248-54.
- Birnboim, H. C. and Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**(6): 1513-23.

- Blasquez, V.C., Xu, M., Moses, S.C. and Garrard, W.T.** (1989) Immunoglobulin kappa gene expression after stable integration. I. Role of the intronic MAR and enhancer in plasmacytoma cells. *J. Biol. Chem.* **264**(35): 21183-9.
- Bradford, M. M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-54.
- Bridger, J.M., Herrmann, H., Munkel, C. and Lichter, P.** (1998) Identification of an interchromosomal compartment by polymerisation of nuclear targeted vimentin. *J. Cell Sci.* **111**(Pt9): 1241-53.
- Brownawell, A.M., Kops, G.J.P.L., Macara, I.G. and Burgering B.M.T.** (2001) Inhibition of nuclear import by protein kinase B (Akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor AFX. *Mol. Cell Sci.* **21**(10): 3534-546.
- Calapez, A., Pereira, H.M., Calado, A., Braga, J., Rino, J., Carvalho, C., Tavanez, J.P., Wahle, E., Rosa, A.C. and Carmo-Fonseca, M.** (2002) The intranuclear mobility of messenger RNA binding proteins is ATP dependent and temperature sensitive. *J. Cell Biol.* **159**(5): 795-805.
- Choi, Y. D. and Dreyfuss, G.** (1984) Isolation of the heterogeneous nuclear RNA-ribonucleoprotein complex (hnRNP): a unique supramolecular assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**(23): 7471-5.
- Cokol, M., Nair, R. and Rost, B.** (2000) Finding nuclear localisation signals. *EMBO reports* **1**(5): 411-15.
- Cook, P.R.** (1988) The nucleoskeleton: artefact, passive framework or active site? *J. Cell Sci.* **90**: 1-6.
- Cremer, T. and Cremer, C.** (2001) Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature* **2**(4): 292-301.
- Croft, J.A., Bridger, J.M., Boyle, S., Perry, P., Teague, P. and Bickmore, W.A.** (1999) Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J. Cell Biol.* **145**(6): 1119-131.
- Dang, C.V. and Lee, W.M.** (1988) Identification of the human c-myc protein nuclear translocation signal. *Mol. Cell Biol.* **8**(10): 4048-54.
- Davis, M., Hatzubai, A., Andersen, J.S., Ben-Shushan, E., Fisher, G.Z., Yaron, A., Bauskin, A., Mercurio, F., Mann, M. and Ben-Neriah, Y.** (2002) Pseudosubstrate regulation of the SCF(beta-TrCP) ubiquitin ligase by hnRNP-U. *Genes Dev.* **16**(4): 439-51.
- DeVries, T.A., Neville, M.C. and Reyland, M.E.** (2002) Nuclear import of PKC δ is required for apoptosis: identification of a novel nuclear import sequence. *EMBO J.* **21**(22): 6050-60.
- Dickinson, L.A., Joh, T., Kohwi, Y. and Kohwi-Shigematsu, T.** (1992) A tissue-specific MAR/SAR DNA-binding protein with unusual binding site recognition. *Cell* **70**(4): 631-45.

- Dickinson, L.A. and Kohwi-Shigematsu, T.** (1995) Nucleolin is a matrix attachment region DNA-binding protein that specifically recognizes a region with high base-unpairing potential. *Mol. Cell Biol.* **15**(1): 456-65.
- Dingwall, C., Sharnick, S.V. and Laskey, R.A.** (1982) A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus. *Cell* **30**(2): 449-58.
- Dreyfuss, G.** (1986) Structure and function of nuclear and cytoplasmic ribonucleoprotein particles. *Annu. Rev. Cell Biol.* **2**: 459-98.
- Dreyfuss, G., Choi, Y.D. and Adam, S.A.** (1984) Characterization of heterogeneous nuclear RNA-protein complexes in vivo with monoclonal antibodies. *Mol. Cell Biol.* **4**(6): 1104-14.
- Dreyfuss, G., Swanson, M.S. and Pinol-Roma, S.** (1988) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles and the pathway of mRNA formation. *Trends Biochem. Sci.* **13**(3): 86-91.
- Dreyfuss, G., Matunis, M.J., Pinol-Roma S. and Burd C.G.** (1993) HnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu. Rev. Biochem.* **62**: 289-321.
- Dundr, M. and Misteli, T.** (2001) Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem. J.* **356**: 297-310.
- Eggert, M., Michel, J., Schneider, S., Bornfleth, H., Baniahmadet, A., Fackelmayer, F.O., Schmidt, S. and Renkawitz, R.** (1997) The glucocorticoid receptor is associated with the RNA-binding nuclear matrix protein hnRNP U. *J. Biol. Chem.* **272**(45): 28471-8.
- Eggert, H., Schulz, M., Fackelmayer, F.O., Renkawitz, R. and Eggert, M.** (2001) Effects of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (hnRNP U/SAF-A) on glucocorticoid-dependent transcription in vivo. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **78**(1): 59-65.
- Fackelmayer, F.O., Dahm, K., Renz, A., Rampsberger, U. and Richter, A.** (1994) Nucleic acid-binding properties of hnRNP-U/SAF-A, a nuclear matrix protein which binds DNA and RNA in vivo and in vitro. *Eur. J. Biochem.* **221**(2): 749-57.
- Fackelmayer, F. O. and A. Richter** (1994a) HnRNP-U/SAF-A is encoded by two differentially polyadenylated mRNAs in human cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1217**(2): 232-4.
- Fackelmayer, F.O., and Richter, A.** (1994b) Purification of two isoforms of hnRNP-U and characterization of their nucleic acid binding activity. *Biochemistry* **33**(34): 10416-22.
- Fackelmayer, F. O.** (2000) Die Architektur des Zellkerns. *Biospektrum* (6): 441-44.
- Fey, E. G., Krochmalnic, G. and Penman, S.** (1986) The nonchromatin substructures of the nucleus: the ribonucleoprotein (RNP)-containing and RNP-depleted matrices analyzed by sequential fractionation and resinless section electron microscopy. *J. Cell Biol.* **102**: 1654-65.
- Fey, E. G. and Penman, S.** (1988) Nuclear matrix proteins reflect cell type of origin in cultured human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**(1): 121-5.

- Finch, J. T. and Klug, A.** (1976) Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **73**(6): 1897-901.
- Gabler, S., Schutt, H., Groitl, P., Wolf, H., Shenk, T. and Dobner, T.** (1998) E1B 55-kilodalton-associated protein: a cellular protein with RNA-binding activity implicated in nucleocytoplasmic transport of adenovirus and cellular mRNAs. *J. Virol.* **72**(10): 7960-71.
- Garrard, W.T.** (1990) Chromosomal Loop Organization in Eucaryotic Genomes. *Nucleic Acids and Molecular Biology* **Vol.4**, Springer Verlag, Heidelberg
- Gasser, S. M. and Laemmli, U. K.** (1986) Cohabitation of scaffold binding regions with upstream/enhancer elements of three developmentally regulated genes of *D. melanogaster*. *Cell* **46**(4): 521-30.
- Goldman, M. A.** (1988) The chromatin domain as a unit of gene regulation. *Bioessays* **9**(2-3): 50-5.
- Gohring, F. and Fackelmayer, F. O.** (1997a) The scaffold/matrix attachment region binding protein hnRNP-U (SAF-A) is directly bound to chromosomal DNA in vivo: a chemical cross-linking study. *Biochemistry* **36**(27): 8276-83.
- Gohring, F., Schwab, B.L., Nicotera, P., Leist, M. and Fackelmayer, F.O.** (1997b) The novel SAR-binding domain of scaffold attachment factor A (SAF-A) is a target in apoptotic nuclear breakdown. *Embo J* **16**(24): 7361-71.
- Görlich, D. and Mattaj, I.W.** (1996) Nucleocytoplasmic Transport. *Science* **271**(5255): 1513-18.
- Görlich, D. and Kutay, U.** (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**: 607-60.
- Graziano, V., Gerchman, S.E., Schneider, D.K. and Ramakrishnan, V.** (1994) Histone H1 is located in the interior of the chromatin 30-nm filament. *Nature* **368**(6469): 351-4.
- Gurbuxani, S., Schmitt, E., Cande, C., Parcellier, A., Hammann, A., Daugas, E., Kouranti, I., Spahr, C., Pance, A., Kroemer, G. and Garrido, C.** (2003) Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor. *Oncogene* **22**(43): 6669-78.
- Hancock, R.** (2000) A new look at the nuclear matrix. *Chromosoma* **109**: 219-25.
- Hashemolhosseini, S., Kilian, K., Kardash, E., Lischka, P., Stamminger, T. and Wegner, M.** (2003) Structural requirements for nuclear localization of GCMa/Gcm-1. *FEBS Lett.* **553**: 315-20.
- Hassan, A. B. and Cook, P. R.** (1993) Visualization of replication sites in unfixed human cells. *J. Cell Sci.* **105**(Pt 2): 541-50.
- He, D. C., Nickerson, J. A. and Penman, S.** (1990) Core filaments of the nuclear matrix. *J. Cell Biol.* **110**(3): 569-80.
- Heng, H.H., Goetze, S., Ye, C.J., Liu, G., Stevens, J.B., Bremer, S.W., Wykes, S.M., Bode, J. and Krawetz, S.A.** (2004) Chromatin loops are selectively anchored using scaffold/matrix-attachment regions. *J. Cell Sci.* **117**(Pt 7): 999-1008

- Herrmann F.** (2002) Untersuchungen zu funktionellen Wechselwirkungen des Kernproteins SAF-A. Diplomarbeit, Universität Konstanz
- Hessabi, B., Ziegler, P., Schmidt, I. Hessabi, C. and Walther, R.** (1999) The nuclear localization signal (NLS) of PDX-1 is part of the homeodomain and represents a novel type of NLS. *Eur. J. Biochem.* **263**: 170-77.
- Houtsmuller, A.B., Rademakers, S., Nigg, A.L., Hoogstraten, D., Hoeijmakes, J.H. and Vermeulen, W.** (1999) Action of DNA repair endonuclease ERCC1/XPF in living cells. *Science* **284**(5416): 958-61.
- Houtsmuller, A.B and Vermeulen, W** (2001) Macromolecular dynamics in living cell nuclei revealed by fluorescence redistribution after photobleaching. *Histochem. Cell Biol.* **115**: 13-21.
- Hozak, P., Hassan, A.B., Jackson, D.A. and Cook P.R.** (1993) Visualization of replication factories attached to nucleoskeleton. *Cell* **73**(2): 361-73.
- Izaurralde, E., Käs, E. and Lemmli, U.K.** (1989) Highly preferential nucleation of histon H1 assembly on scaffold-assoziiated regions. *J. Mol. Biol.* **210**(3): 573-85.
- Jackson, D.A., Hassan, A.B., Errington, R.J. and Cook PR** (1993) Visualization of focal sites of transcription within human nuclei. *Embo J.* **12**(3): 1059-65.
- Jong A. Y., Clark, M.W., Gilbert, M., Oehm, A. and Campbell, J.L.** (1987) Saccharomyces cerevisiae SSB1 protein and its relationship to nucleolar RNA-binding proteins. *Mol. Cell Biol.* **7**(8): 2947-55.
- Käs, E., Izaurralde, E. and Laemmli, U.K.** (1989) Specific inhibition of DNA-binding to nuclear scaffold and histone H1 by distamycin. The role of oligo(dA)-oligo(dT) tracts. *J. Mol. Biol.* **210**(3): 587-99.
- Kalderon, D., Roberts, B.L., Richardson, W.D. and Smith, A.E.** (1984) A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* **39**: 499-509.
- Kanda, T., Sullivan, K.F. and Wahl, G.M.** (1998) Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in mammalian cells. *Curr. Biol.* **8**(7): 377-85.
- Kiledjian, M. and Dreyfuss, G.** (1992) Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *Embo J.* **11**(7): 2655-64.
- Kim, M. K. and Nikodem, V. M.** (1999) HnRNP U inhibits carboxy-terminal domain phosphorylation by TFIIH and represses RNA polymerase II elongation. *Mol. Cell Biol.* **19**(10): 6833-44.
- Kim, S., Nollen, E.A.A., Kitagawa, K., Bindokas, V.P. and Morimoto, R.I.** (2002) Polyglutamine protein aggregates are dynamic. *Nat. Cell Biol.* **4**(10): 826-31.
- Kipp, M., Gohring, F., Ostendorp, T., van Drunen, C.M., van Driel, R., Przybylski, M. and Fackelmayer, F.O.** (2000) SAF-Box, a conserved protein domain that specifically recognizes scaffold attachment region DNA. *Mol. Cell Biol.* **20**(20): 7480-9.

- Koike, M., Ikuta, T., Miyasaka, T. and Shiomi, T.** (1999) The nuclear localization signal of the human Ku70 is a variant bipartite type recognized by the two components of nuclear pore-targeting complex. *Exp. Cell Res.* **250**(2): 401-13.
- Kruhlak, M.J., Lever, M.A., Fischle, W., Verdin, E., Bazett-Jones, D.P. and Hendzel, M.J.** (2000) Reduced mobility of the alternative splicing factor (ASF) through the nucleoplasm and steady state speckle compartments. *J. Cell Biol.* **150**(1): 41-51.
- Kurz, A., Lampel, S., Nickolenko, J.E., Bradl, J., Benner, A., Zirbel, R.M., Cremer, T. and Lichter, P.** (1996) Active and inactive genes localize preferentially in the periphery of chromosome territories. *J. Cell Biol.* **135**(5): 1195-205.
- La Casse, E.C. and Lefebvre, Y.A.** (1995) Nuclear localisation signals overlap DNA- or RNA-binding domains in nucleic acid-binding proteins. *Nucleic Acids Res.* **23**(10): 1647-56.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(259): 680-5.
- Laemmli, U.K., Käs, E., Poljak, L. and Adachi, Y.** (1992) Scaffold-associated regions: cis-acting determinants of chromatin structure loops and functional domains. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2**(2): 275-85.
- Lamond, A.I. and Earnshaw, W.C.** (1998) Structure and function in the nucleus. *Science* **280**: 547-53.
- Lang, I., Scholz, M. and Peters, R.** (1986) Molecular mobility and nucleocytoplasmic flux in hepatoma cells. *J. Cell Biol.* **102**: 1183-190.
- Lever, M.A., Th`ng, J.P., Sun, X. and Hendzll, M.J.** (2000) Rapid exchange of histone H1.1 in chromatin in living cells. *Nature* **408**(6814): 873-76.
- Lichter, P., Cremer, T., Borden, J., Manuelidis, L. and Ward, D.C.** (1988) Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum. Genet.* **80**(3): 224-34.
- Lippincott-Schwartz, J., Snapp, E. and Kenworthy A.** (2001) Studying protein dynamics in living cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**(6): 444-56.
- Luderus, M.E., de Graaf, A., Mattai, E., den Blaauwen, J.L., Grande, M.A., de Jong, L. and van Driel, R.** (1992) Binding of matrix attachment regions to lamin B1. *Cell* **70**(6): 949-59.
- Luderus, M.E., den Blaauwen, J.L., de Smit, O.J., Compton, D.A. and van Driel, R.** (1994) Binding of matrix attachment regions to lamin polymers involves single-stranded regions and the minor groove. *Mol. Cell Biol.* **14**(9): 6297-305.
- Lukacs, G.L., Haggie, P., Seseek, O., Lechardeur, D. Freedman, N. and Verkman, A.S.** (2000) Size-dependent mobility in cytoplasm and nucleus. *J. Biol. Chem.* **275**(3): 1625-29.
- Ma, H., Siegel, A.J. and Berezney, R.** (1999) Association of chromosome territories with the nuclear matrix. Disruption of human chromosome territories correlates with the release of a subset of nuclear matrix proteins. *J. Cell Biol.* **146**(3): 531-42.

- Macara, I.G.** (2001) Transport into and out of the nucleus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**(4): 570-94.
- Mahy, N.L., Perry, P.E., Gilchrist, S., Baldock, R.A. and Bickmore, W.A.** (2002) Spatial organization of active and inactive genes and noncoding DNA within chromosome territories. *J. Cell Biol.* **157**(4): 579-89.
- Makkerh, J.P.S., Dingwall, C. and Laskey R.A.** (1996) Comparative mutagenesis of nuclear localisation signals reveals the importance of neutral and acidic amino acids. *Curr. Biol.* **6**(8): 615-23.
- Martens, J. H., Verlaan, M., Kalkhoven, E., Dorsman, J.C. and Zantema, A.** (2002) Scaffold/matrix attachment region elements interact with a p300- scaffold attachment factor A complex and are bound by acetylated nucleosomes. *Mol. Cell Biol.* **22**(8): 2598-606.
- Matera, A.G.** (1999) Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space. *Trends Cell Biol.* **9**: 302-9.
- Mattern, K.A., Humbel, B.M., Muijsers, A.O., De Jong, L. and Van Driel, R.** (1996) hnRNP proteins and B23 are the major proteins of the internal nuclear matrix of HeLa S3 cells. *J. Cell Biochem.* **62**(2): 275-89.
- McNally, J.G., Muller, W.G., Walker, D., Wolford, R. and Hager, G.L.** (2000) The glucocorticoid receptor: Rapid exchange with regulatory sites in living cells. *Science* **287**(5456): 1262-65.
- Mearini, G., Nielsen, P.E. and Fackelmayer, F.O.** (2004) Localisation and dynamics of small circular DNA in live mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* **32**(8): 2642-51.
- Mirkovitch, J., Mirault, M.E. and Laemmli, U.K.** (1984) Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold. *Cell* **39**(1): 223-32.
- Misteli, T., Gunjan, A., Hock, R., Bustin, M. and Brown, D.T.** (2000) Dynamic binding of Histon H1 to chromatin in living cells. *Nature* **408**(6814): 877-81.
- Misteli, T.** (2001) Protein dynamics: Implication for nuclear architecture and gene expression. *Science* **291**: 843-47.
- Mo, Y.-Y., Wang, C. and Beck, W.T.** (2000) A novel nuclear localisation signal in human DNA-Topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* **275**(52): 41107-13.
- Nakagomi, K., Kohwi, Y., Dickinson, L.A. and Kohwi-Shigematsu, T.** (1994) A novel DNA-binding motif in the nuclear matrix attachment DNA-binding protein SATB1. *Mol. Cell Biol.* **14**(3): 1852-60.
- Nickerson, J.A., Krockmalnic, G., Wan, K.M. and Penman, S.** (1997) The nuclear matrix revealed by eluting chromatin from a cross-linked nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**(6): 4446-50.
- Nigg, E.A.** (1997) Nucleocytoplasmatic transport: signals, mechanism and regulation. *Nature* **386**(6627): 779-86.

- Nollen, E.A.A., Salomons, F.A., Brunsting, J.F., van der Want, J.J.L., Sibon, O.C.M and Kampinga, H.H.** (2001) Dynamic changes in the localisation of thermally unfolded nuclear proteins associated with chaperone-dependent protection. *PNAS* **98**(21): 12038-43.
- Ogryzko, V. V., Schiltz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H. and Nakatani, Y.** (1996) The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* **87**(5): 953-9.
- Olson, M.O.J., Dundr M. and Szebeni A.** (2000) The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. *Trends Cell Biol.* **10**(5): 189-96.
- Ostendorp, T.** (2001) Untersuchungen zur Domänenstruktur des menschlichen Kernproteins SAF-A. Diplomarbeit, Universität Konstanz
- Paine, P.L., Moore, L.C. and Horowitz, S.B.** (1975) Nuclear envelope permeability. *Nature* **254**: 109-14.
- Pandaya, K. and Townes, T.M.** (2002) Basic residues within the kruppel zinc finger DNA binding domain are the critical nuclear localization determinants of EKLF/KLF-1. *J. Biol. Chem.* **277**(18): 16304-12.
- Pederson, T.** (2000a) Diffusional protein transport within the nucleus: a message in the medium. *Nat. Cell. Biol.* **2**(5): E73-E74.
- Pederson, T.** (2000b) Half a century of "the nuclear matrix". *Mol. Biol. Cell.* **11**(3): 799-805.
- Perche, P.Y., Vourc'h, C., Konecny, L., Souchier, C., Robert-Nicoud, M., Dimitrov, S. and Khochbin, S.** (2000) Higher concentration of histone macro-H2A in the Barr body are correlated with higher nucleosome density. *Curr. Biol.* **10**(23): 1531-34.
- Phair, R.D. and Misteli, T.** (2000) High mobility of proteins in the mammalian nucleus. *Nature* **404**(6778): 604-9.
- Pinol-Roma, S., Choi, Y., Matunis, M.J. and Dreyfuss, G.** (1988) Immunopurification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles reveals an assortment of RNA-binding proteins. *Genes Dev.* **2**(2): 215-27.
- Pokorska, A., Drevet, C. and Scazzocchio, C.** (2000) The analysis of the transcriptional activator PrnA reveals a tripartite nuclear localisation signal. *J. Mol. Biol.* **298**(4): 585-96.
- Politz, J.C., Tuft, R.A., Pederson, T. and Singer, R.H.** (1999) Movement of nuclear poly(A) RNA throughout the interchromatin space in living cells. *Curr. Biol.* **9**(6): 285-91.
- Quadrini, K.J. and Bieker, J.J.** (2002) Kruppel-like zinc fingers bind to nuclear import proteins and are required for efficient nuclear localization of erythroid Kruppel-like factor. *J. Biol. Chem.* **277**(35): 32243-52.
- Reichelt, R., Holzenburg, A., Buhle, E.L., Jarnik, M., Engel, A. and Aebi, U.** (1990) Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. *J. Cell Biol.* **110**(4): 883-94.

- Renz, A. and Fackelmayer, F. O.** (1996) Purification and molecular cloning of the scaffold attachment factor B (SAF-B), a novel human nuclear protein that specifically binds to S/MAR- DNA. *Nucleic Acids Res.* **24**(5): 843-9.
- Reyes, J.C., Muchardt, C. and Yaniv, M.** (1997) Components of the human SWI/SNF complex are enriched in active chromatin and are associated with the nuclear matrix. *J. Cell. Biol.* **137**(2): 263-74.
- Ribbeck K. and Gorlich, D.** (2001) Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *EMBO J.* **20**(6): 1320-30.
- Rigaud, G., Roux, J., Picet, R. and Grange, T.** (1991) *In vivo* footprinting of rat TAT gene: dynamic interplay between the glucocorticoid receptor and a liver-specific factor. *Cell* **67**(5): 977-86.
- Robbins, J. Dilworth, S.M., Laskey, R.A. and Dingwell, C.** (1991) Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: Identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* **64**(3): 615-23.
- Romanelli, G.R. and Morandi, C.** (2002) Importin α binds to unusual bipartite nuclear localisation signal in the heterogeneous ribonucleoprotein type I. *Eur. J. Biochem.* **296**(11): 2727-34.
- Romanelli, M.G., Tato, L., Lorenzi, P. and Morandi, C.** (2003) Nuclear localization domains in human thyroid transcription factor 2. *Biochim. Biophys. Acta.* **1643**(1-3): 55-64.
- Romig, H., Fackelmayer, F.O., Renz, A., Ramsperger, U. and Richter, A.** (1992) Characterization of SAF-A, a novel nuclear DNA binding protein from HeLa cells with high affinity for nuclear matrix/scaffold attachment DNA elements. *Embo J.* **11**(9): 3431-40.
- Rose, S.M. and Garrard, W.T.** (1984) Differentiation-dependent chromatin alterations precede and accompany transcription of immunoglobulin light chain genes. *J. Biol. Chem.* **259**(13): 8534-44.
- Rout M.P., Aitchison, J.D., Magnasco, M.O. and Brian, T.C.** (2003) Virtual gating and nuclear transport: The hole picture. *Trends Cell Biol.* **13**(12): 622-28.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, second ed.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **74**(12): 5463-7.
- Sesek, O., Bowers, J. and Verkman, A.S.** (1997) Translational Diffusion of Macromolecule-sized Solutes in Cytoplasm and Nucleus. *J. Cell Biol.* **138**(1): 131-42.
- Schreiber, V., Molinete, M., Boeuf, H., de Murcia, G. and Ménissier-de Murcia, J.** (1992) The human poly (ADP-Ribose) polymerase nuclear localization signal is a bipartite element functionally separate from DNA binding and catalytic activity. *EMBO J.* **11**(9): 3263-69.

- Shields, J.M. and Yang, V.M.** (1997) Two potent nuclear localization signals in the Gut-enriched Krüppel-like factor define a subfamily of closely related Krüppel proteins. *J. Biol. Chem.* **272**(29): 18504-07.
- Shopland, L.S. and Lawrence, J.B.** (2000) Seeking common ground in nuclear complexity. *J. Cell Biol.* **150**(1): 41-51.
- Spector, D.L.** (1993) Macromolecular domains within the cell nucleus. *Ann. Rev. Cell. Biol.* **9**: 265-315.
- Spector, D.L.** (2001) Nuclear domains. *J. Cell Sci.* **114** (Pt 16): 2891-3.
- Spector, D.L. and Gasser, S.M.** (2003) A molecular dissection of nuclear function. *EMBO rep.* **4**(1): 18-23.
- Stenoien, D.L., Patel, K., Mancini, M.G., Dutertre, M., Smith, C.L., O'Malley, B.W. and Mancini, M.A.** (2001) FRAP reveals that mobility of oestrogen receptor- α is ligand and proteasome dependent. *Nat. Cell Biol.* **3**(1): 15-23.
- Taniura, H. and Yoshikawa, K.** (2002) Necdin interacts with the ribonucleoprotein hnRNP U in the nuclear matrix. *J. Cell Biochem.* **84**(3): 545-55.
- Thoma, F., Koller, T. and Klug, A.** (1979) Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J. Cell Biol.* **83**(2 Pt 1): 403-27.
- Towbin, H., Staehelin and Gordon, J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**(9): 4350-4.
- Tsutsui, K., Tsutsui, K., Okada, S., Watarai, S., Seki, S., Yasuda, T. and Shohmori, T.** (1993) Identification and characterization of a nuclear scaffold protein that binds the matrix attachment region DNA. *J. Biol. Chem.* **268**(17): 12886-94.
- van Driel, R., Wansink, D.G., van Steensel, B., Grande, M.A., Schul, W. and de Jong, L.** (1995) Nuclear domains and the nuclear matrix. *Int. Rev. Cytol.* **162A**: 151-89
- van Drunen, C.M., Sewalt, R.G., Oosterling, R.W., Weisbeek, P.J., Smeekens, S.C. and van Driel, R.** (1999) A bipartite sequence element associated with matrix/scaffold attachment regions. *Nucleic Acids Res.* **27**(14): 2924-30.
- von Kries, J.P., Buck, F. and Stratling, W.H.** (1994) Chicken MAR binding protein p120 is identical to human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) U. *Nucleic Acids Res.* **22**(7): 1215-20.
- Verschure, P.J., Van Der Kraan, I. and Van Driel, R.** (1999) Spatial relationship between transcription sites and chromosome territories. *J. Cell Biol.* **147**: 13-24.
- Verschure, P.J., Van Der Kraan, I., Enserink, J.M., Mone, M.J., Manders, E.M. and Van Driel, R.** (2002) Large-scale chromatin organization and the localization of proteins involved in gene expression in human cells. *J. Histochem. Cytochem.* **50**(10): 1303-12.

- Weis, K.** (1998) Importins und exportins: how to get in and out of the nucleus. *Trends Biochem. Sci.* **23**(5): 185-189.
- Wessel, D. and Flugge, U. I.** (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* **138**(1): 141-3.
- Wray, W., Bouliskas, T., Wray, V. and Hancock, R.** (1981) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **118**(1): 197-203.
- Wu, X., Platt, J.L. and Cascalho, M.** (2003) Dimerization of MLH1 and PMS2 limits nuclear localization of MutL α . *Mol. Cell. Biol.* **23**(9): 3320-28.
- Yanagisawa, J., Ando, J., Nakayama, J., Kohwi, Y. and Kohwi-Shigematsu, T.** (1996) A matrix attachment region (MAR)-binding activity due to a p114 kilodalton protein is found in human breast carcinomas and not in normal and benign breast disease tissues. *Cancer R.* **56**(3): 457-62.
- Zbarskii, I.B. and Debov, S.S.** (1948) On the proteins of the cell nucleus. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **63**: 795-98.
- Zhao, K., Käs, E., Gonzales, E. and Laemmli, U.K.** (1993) SAR-dependent mobilisation of histone H1 by HMGI/Y in vitro: HMGI/Y is enriched in H1-depleted chromatin. *EMBO J.* **12**(8): 3237-47.
- Zuckerkindl, E. and Villet, R.** (1988) Generation of high specificity of effect through low-specificity binding of proteins to DNA. *FEBS Lett.* **231**(2): 291-98.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Andrea Schwander
Geburtsdatum und –ort: 29.7.1973 in Rheinfeldern
Staatsangehörigkeit: deutsch

Bildungsweg:

Mai 1993 Abitur am Ernährungswissenschaftlichen Gymnasium in Lörrach

seit WS1994/95 Diplomstudium der Biologie an der Albert-Ludwig-Universität in Freiburg im Breisgau

SS 1999 Erfolgreiche Durchführung der mündlichen Prüfungen in den Fächern Genetik und Molekularbiologie, Biochemie (der Pflanzen), Mikrobiologie und Klinische Chemie und Hämatologie

Dezember 1999-
Oktober 2000 Diplomarbeit am Institut III der Fakultät für Biologie der Universität Freiburg in der Arbeitsgruppe Klaus Grasser
Thema: Charakterisierung des HMG1/Y-Proteins und phosphorylierter HMG1-Proteine aus Mais

Dezember 2000
- August 2004 Promotion am Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunbiologie an der Universität Hamburg, Abteilung Molekulare Zellbiologie
Thema: Die funktionelle Domänenstruktur des humanen Kernproteins Scaffold Attachment Factor A